



**EFEK HEPATOPROTEKTIF EKSTRAK ETANOL BROKOLI  
(*Brassica oleracea* L.var *italica*) TERHADAP KERUSAKAN  
HISTOLOGIS SEL HATI TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG  
DIINDUKSI 7,12-DIMETILBENZ( $\alpha$ )ANTRASEN (DMBA)**

**SKRIPSI**

Oleh

**MUHTAR ADY KUSUMA  
NIM 122010101091**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**EFEK HEPATOPROTEKTIF EKSTRAK ETANOL BROKOLI  
(*Brassica oleracea* L.var *italica*) TERHADAP KERUSAKAN  
HISTOLOGIS SEL HATI TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG  
DIINDUKSI 7,12-DIMETILBENZ( $\alpha$ )ANTRASEN (DMBA)**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

**MUHTAR ADY KUSUMA  
NIM 122010101091**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

## **PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah SWT yang telah memberi hidayah dan nikmat sehat maupun sempat dalam setiap langkah pendidikan yang saya ambil;
2. Nabi Muhammad SAW beserta sahabatnya yang telah memberikan suri teladan yang baik bagi umat Islam;
3. Orang tua saya Bapak Bambang Setyo Budi dan Ibu Siti Syamsiah yang telah memberikan doa, dukungan, pengorbanan, kasih sayang, dan didikannya kepada saya;
4. Adik saya Rosita Febriani Fatikha, Razak Rais, dan Yusuf Yuda Tama;
5. Keluarga besar saya yang memberikan dukungan moril dan materi;
6. Teman-teman yang selalu saling menasihati dalam kebenaran dan saling menasihati dalam kesabaran;
7. Para pahlawan tanpa tanda jasa yang memberikan ilmunya dari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi;
8. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

## MOTO

Sesungguhnya, sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain, dan hanya kepada Rabb-mulah hendaknya kamu berharap.\*)

Dan barang siapa yang menyerahkan dirinya kepada Allah, sedang dia orang yang berbuat kebaikan, maka sesungguhnya ia telah berpegang kepada buhul (tali) yang kokoh. Dan hanya kepada Allah-lah kesudahan segala urusan.\*\*)

Cukup Allah sebagai penolong kami dan Dia sebaik-baik pelindung.\*\*\*)

Mintalah pertolongan dengan sabar dan shalat.\*\*\*\*)

---

\*) Qur'an Surat Al Insyirah 6-8

\*\*\*) Qur'an Surat Al Luqman ayat 22

\*\*\*\*) Qur'an Surat Al Imran ayat 173

\*\*\*\*\*) Qur'an Surat Al Baqarah 45

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Muhtar Ady Kusuma

NIM : 122010101091

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Efek Hepatoprotektif Ekstrak Etanol Brokoli (*Brassica oleracea* L.var *italica*) terhadap Kerusakan Histologis Sel Hati Tikus (*Rattus novergicus*) yang Diinduksi 7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )anthracene (DMBA)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali dalam pengutipan substansi yang sudah disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 5 Januari 2015

Yang menyatakan,

Muhtar Ady Kusuma

NIM 122010101091

**SKRIPSI**

**EFEK HEPATOPROTEKTIF EKSTRAK ETANOL BROKOLI  
(*Brassica oleracea* L.var *italica*) TERHADAP KERUSAKAN  
HISTOLOGIS SEL HATI TIKUS (*Rattus novergicus*) YANG  
DIINDUKSI 7,12-DIMETILBENZ( $\alpha$ )ANTRASEN (DMBA)**

Oleh

Muhtar Ady Kusuma  
NIM 122010101091

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Rosita Dewi

## PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Hepatoprotektif Ekstrak Etanol Brokoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*) terhadap Kerusakan Histologis Sel Hati Tikus (*Rattus novergicus*) yang Diinduksi 7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )anthracene (DMBA)” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Selasa, 5 Januari 2015

Tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

### Tim Penguji

Penguji I,

dr. Jane Kosasih, Sp. PA  
NIP 19800520 201412 2 001

Penguji III,

dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si  
NIP 19840916 200801 2 003

Penguji II,

dr. Ulfa Elfiah, M.Kes., Sp.BP-RE  
NIP 19760719 200112 2 001

Penguji IV,

dr. Rosita Dewi  
NIP 19840428 200912 2 003

Mengesahkan,  
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dr. Enny Suswati, M.Kes  
NIP 19700214 199903 2 001

## RINGKASAN

**Efek Hepatoprotektif Ekstrak Etanol Brokoli (*Brassica oleracea* L.var *italica*) terhadap Kerusakan Histologis Sel Hati Tikus (*Rattus novergicus*) yang Diinduksi 7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )anthracene (DMBA); Muhtar Ady Kusuma; 122010101091; 2016; 72 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.**

*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) merupakan polutan lingkungan yang bersifat karsinogenik. Sebagian besar PAH berasal dari asap kendaraan bermotor. Menurut data Korlantas Polri, pada tahun 2013 terjadi peningkatan 24% jumlah kendaraan bermotor dari tahun 2011 sehingga jumlah paparan PAH terhadap populasi manusia diprediksi akan terus mengalami peningkatan. Salah satu bentuk PAH yang terdapat pada asap kendaraan bermotor adalah senyawa 7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )antrasen (DMBA). DMBA akan dimetabolisme di hati oleh enzim sitokrom P450 dan *microsomal epoxide hydrolase* (mEH) menjadi metabolit yang lebih reaktif, yaitu DMBA-DE. DMBA-DE ini merupakan radikal bebas yang dapat bereaksi dengan lipid, protein, dan DNA. Ikatan DMBA-DE dengan makromolekul tersebut akan menyebabkan kerusakan sel hati. Efek destruktif DMBA terhadap sel-sel hati dapat dicegah dengan antioksidan endogen yang ada. Namun, keterbatasan jumlah antioksidan endogen dalam tubuh dapat menyebabkan jumlah antioksidan endogen tidak sebanding dengan jumlah radikal bebas yang ada sehingga diperlukan antioksidan eksogen yang berperan sebagai agen hepatoprotektor terhadap kerusakan hati. Salah satu antioksidan eksogen yang dapat diteliti sebagai agen hepatoprotektor adalah brokoli. Brokoli mengandung senyawa bioaktif seperti beta karoten, vitamin C, E, dan A, karotenoid, dan polifenol terutama flavonoid yang merupakan antioksidan alami. Flavonoid akan bekerja sebagai antioksidan dengan mendonasikan atom hidrogen kepada senyawa radikal sehingga senyawa radikal menjadi lebih stabil. Aktivitas antioksidan yang dimiliki brokoli tergolong sebagai antioksidan yang

sangat kuat dengan nilai  $IC_{50}$ : 3,63  $\mu\text{g/ml}$ . Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah mengetahui dan membuktikan perbedaan efek hepatoprotektif ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*) terhadap kerusakan histologis sel hati tikus yang diinduksi DMBA.

Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experimental* dengan *Posttest Only Control Group Design* dengan menggunakan 30 ekor tikus wistar jantan yang terbagi dalam 6 kelompok, yaitu kelompok kontrol normal (KN), kontrol positif (K+), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), kelompok perlakuan 3 (P3), dan kelompok perlakuan 4 (P4). Kelompok kontrol normal diberikan aquades selama 7 hari tanpa diinduksi DMBA pada hari ke-8. Sedangkan pada kelompok kontrol positif diberikan aquades selama 7 hari dan diinduksi DMBA dosis 15 mg/Kgbb per oral pada hari ke-8. Pada kelompok perlakuan diberikan ekstrak etanol brokoli per oral selama 7 hari dengan dosis untuk P1, P2, P3, dan P4 secara berturut-turut yaitu, 250 mg/Kgbb, 500 mg/Kgbb, 1000 mg/Kgbb, dan 2000 mg/Kgbb. Kemudian pada hari ke-8 dilakukan induksi DMBA dosis 15 mg/Kgbb per oral. Semua tikus akan diterminasi pada hari ke-12 untuk diambil organ hatinya dan dibuat preparat. Pengamatan dilakukan dengan menilai tingkat degenerasi dan nekrosis sel-sel hati yang akan diklasifikasikan ke dalam enam kategori (0,1,2,3,4,5, dan 6). Pengamatan dilakukan oleh ahli patologi anatomi dengan metode *blinding*. Data yang didapatkan dianalisis dengan uji *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Post hoc Mann Whitney*.

Pada penelitian ini didapatkan skor rata-rata tingkat kerusakan sel hati pada kelompok KN sebesar 0,6; kelompok K(+) sebesar 3,4; kelompok P1 sebesar 1,8; kelompok P2 sebesar 0,8; kelompok P3 sebesar 1,2; dan kelompok P4 sebesar 1,4. Hasil uji beda *Kruskal Wallis* tingkat kerusakan sel hati tikus didapatkan perbedaan signifikan dengan nilai  $p=0,008$ . Kemudian dilanjutkan analisis *Post hoc Mann Whitney* didapatkan hasil  $p<0,05$  pada kelompok K(+) dengan KN, P2, P3, dan P4. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian DMBA dosis 15 mg/Kgbb *single dose*

per oral pada hari ke-8 dapat menyebabkan kerusakan sel hati. Hal ini dapat terjadi karena DMBA akan dimetabolisme oleh enzim sitokrom P450 di hati menjadi DMBA-DE. DMBA-DE yang bersifat radikal bebas akan berikatan dengan lipid membran menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid sehingga membran sel akan rusak dan kematian sel juga akan terjadi. Sedangkan pada pemberian ekstrak etanol dosis 500 mg/Kgbb, 1000 mg/Kgbb, dan 2000 mg/Kgbb selama 7 hari dapat memberikan efek hepatoprotektif terhadap kerusakan histologis sel hati tikus yang diinduksi DMBA. Hal ini ditunjukkan dengan adanya penurunan signifikan rata-rata tingkat kerusakan sel hati tikus pada kelompok P2, P3, dan P4 terhadap kelompok K(+). Efek hepatoprotektif tersebut didapatkan karena brokoli mengandung flavonoid yang mampu menstabilkan senyawa reaktif DMBA-DE dengan mendonorkan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya sehingga toksisitas DMBA-DE menurun dan kerusakan sel hati dapat dicegah. Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan efek hepatoprotektif pemberian ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea* L.var *italica*) terhadap kerusakan histologis sel hati tikus yang diinduksi DMBA.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Hepatoprotektif Ekstrak Etanol Brokoli (*Brassica oleracea* L.var *italica*) terhadap Kerusakan Histologis Sel Hati Tikus (*Rattus novergicus*) yang Diinduksi 7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )anthracene (DMBA)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Orang tua saya Bapak Bambang Setyo Budi yang senantiasa berdoa untuk kelancaran dan kemudahan skripsi saya dan Ibu Siti Syamsiah yang senantiasa memberikan kasih sayangnya;
2. Adikku Rosita Febriani Fatikha, Razak Rais, dan Yusuf Yuda Tama yang mengisi hari-hari dirumah dengan canda dan tawa;
3. dr. Enny Suswati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
4. dr. Muhammad Hasan, M.Kes, Sp.OT selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing saya selama penulis menjadi mahasiswa;
5. dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Rosita Dewi selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah banyak membantu penulisan skripsi ini sejak awal hingga akhir;
6. Dear Farah Sielma dan Rizka Nuzula Wardhani selaku rekan satu tim penelitain saya yang selalu bersama-sama untuk saling membantu dan menyemangati hingga penelitian ini selesai;
7. Saudara-saudara di TBM Vertex yang telah memberikan tempat bernaung dalam sebuah keluarga di Fakultas Kedokteran Universitas Jember;

8. Sahabat-sahabatku Ghuiranda Syabannur Ramadhan, Wildan Triana, Aditha Fitrina Andiani, Yulia Pustpitasari, Sarah Daniswara, Erdito Muro Suyono, dan Muhammad Avin Zamroni terima kasih atas jalinan persahabatan dan canda tawa yang senantiasa terukir dalam kebersamaan kita;
9. Teman-teman Panacea Fakultas Kedokteran Universitas Jember angkatan 2012 yang selalu bahu-membahu dalam mengarungi kehidupan sebagai mahasiswa kedokteran;
10. Analis dan civitas akademika Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 5 Januari 2015

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	xi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xiii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	4
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
<b>2.1 Brokoli</b> .....	5
2.1.1 Taksonomi Tumbuhan Brokoli.....	6
2.1.2 Kandungan Brokoli.....	6
2.1.3 Manfaat Brokoli .....	7
<b>2.2 Radikal Bebas</b> .....	9
2.2.1 Definisi Radikal Bebas .....	9
2.2.2 Reaksi Radikal Bebas .....	9

2.3	<b>7,12-dimetilbenz(<math>\alpha</math>)antrasen (DMBA)</b>	11
2.4	<b>Antioksidan</b>	13
2.4.1	Definisi Antioksidan	13
2.4.2	Klasifikasi Antioksidan	13
2.4.3	Mekanisme Kerja Antioksidan	17
2.5	<b>Hati</b>	18
2.5.1	Anatomi Hati	18
2.5.2	Histologi Hati	18
2.5.3	Fungsi Hati	20
2.5.4	Mekanisme Kerusakan Hati	22
2.5.5	Respon Hati terhadap Jejas	24
2.5.6	Indikator Kerusakan Hati	25
2.6	<b>Kerangka Konseptual</b>	27
2.7	<b>Hipotesis Penelitian</b>	28
<b>BAB 3.</b>	<b>METODE PENELITIAN</b>	29
3.1	<b>Jenis Penelitian</b>	29
3.2	<b>Rencana Penelitian</b>	29
3.3	<b>Populasi dan Sampel</b>	31
3.3.1	Populasi	31
3.3.2	Sampel	31
3.3.3	Besar Sampel	32
3.4	<b>Tempat dan Waktu Penelitian</b>	32
3.5	<b>Alat dan Bahan Penelitian</b>	33
3.5.1	Alat	33
3.5.2	Bahan	33
3.6	<b>Variabel Penelitian</b>	34
3.6.1	Variabel Bebas	34
3.6.2	Variabel Terikat	34

3.6.3 Variabel Terkendali .....	34
<b>3.7 Definisi Operasional .....</b>	<b>34</b>
3.7.1 Ekstrak Etanol Brokoli .....	34
3.7.2 Dosis Ekstrak Etanol Brokoli .....	35
3.7.3 Dosis 7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )antrasen (DMBA) .....	35
3.7.4 Gambaran Histopatologi Kerusakan Sel Hati Tikus.....	35
<b>3.8 Prosedur Kerja.....</b>	<b>36</b>
3.8.1 Pemilihan Tikus Putih Galur Wistar .....	36
3.8.2 Persiapan Hewan Coba .....	37
3.8.3 Pembagian Tiap Kelompok Perlakuan .....	37
3.8.4 Pembuatan Ekstrak Brokoli .....	37
3.8.5 Perlakuan terhadap Hewan Coba .....	38
3.8.6 Pemeriksaan Histopatologi Kerusakan Sel Hati .....	38
<b>3.9 Analisis Data.....</b>	<b>39</b>
<b>3.10 Uji Kelayakan Etik Penelitian .....</b>	<b>39</b>
<b>3.11 Alur Penelitian .....</b>	<b>40</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Hasil Penelitian .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Analisis Data .....</b>	<b>48</b>
<b>4.3 Pembahasan Hasil Penelitian.....</b>	<b>49</b>
<b>BAB 5. PENUTUP .....</b>	<b>52</b>
<b>5.1 Kesimpulan.....</b>	<b>52</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>52</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>53</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>58</b>

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tumbuhan Brokoli .....	5
Gambar 2.2 Metabolisme DMBA.....	13
Gambar 2.3 Mekanisme Kerja Flavonoid .....	15
Gambar 2.4 Anatomi dan Histologi Hati .....	20
Gambar 2.5 Kerangka Konseptul.....	27
Gambar 3.1 Rancangan Penelitian.....	29
Gambar 3.2 Skema Alur Perlakuan Hewan Coba.....	41
Gambar 4.1 Rata-Rata Tingkat Kerusakan Sel Hati Tikus .....	42
Gambar 4.2 Foto Preparat Hati Tikus Kelompok Kontrol Normal .....	43
Gambar 4.3 Foto Preparat Hati Tikus Kelompok Kontrol Positif .....	44
Gambar 4.4 Foto Preparat Hati Tikus Kelompok Perlakuan 1 .....	45
Gambar 4.5 Foto Preparat Hati Tikus Kelompok Perlakuan 2 .....	46
Gambar 4.6 Foto Preparat Hati Tikus Kelompok Perlakuan 3 .....	47
Gambar 4.7 Foto Preparat Hati Tikus Kelompok Perlakuan 4 .....	48

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Kandungan Senyawa Brokoli .....	7
Tabel 2.2 Kadar Flavonoid Total dan Nilai IC <sub>50</sub> Ekstrak Brokoli dengan Metode Maserasi .....	8
Tabel 3.1 Pembagian Kelompok Perlakuan .....	37
Tabel 4.1 Rata-Rata Tingkat Kerusakan Sel Hati Tikus .....	42
Tabel 4.2 Hasil Analisis <i>Mann Whitney</i> .....	48

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) merupakan bentuk polutan dilingkungan yang bersifat karsinogenik. Sekitar 51,9% PAH yang ada di udara berasal dari asap kendaraan bermotor. Menurut data Korlantas Polri (dalam Ismiyanti, 2014), jumlah kendaraan yang ada di seluruh Indonesia pada tahun 2013 adalah 104,2 juta unit, jumlah ini meningkat 24% dari tahun 2011 sehingga dapat diprediksi jumlah paparan PAH terhadap populasi manusia akan terus mengalami peningkatan. Selain itu, limbah industri, kebakaran hutan, dan hasil pembakaran stasioner secara berturut-turut memberikan kontribusi keberadaan PAH di udara sebesar 14,4%, 6,9%, dan 2,2% (Wardhana, 2008). Sumber lain penghasil PAH seperti asap rokok yang belum diketahui besarnya dalam memberikan kontribusi keberadaan PAH di udara akan menambah kekhawatiran terhadap dampak bahaya dari paparan PAH mengingat tingginya angka prevalensi orang merokok di Indonesia, yaitu 36,3% (Riskesdas, 2013).

*Prototype* PAH yang banyak terdapat pada asap kendaraan bermotor, asap pabrik, asap kebakaran hutan, dan asap rokok adalah senyawa 7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )antrasen (DMBA). DMBA merupakan senyawa karsinogen sekunder (prokarsinogen) sehingga harus mengalami aktivasi metabolisme atau biotransformasi untuk menghasilkan karsinogen aktif. DMBA akan dimetabolisme menjadi senyawa reaktif DMBA-3,4-diol-1,2-epoksida (DMBA-DE) oleh enzim sitokrom P450. Enzim tersebut ada pada semua jaringan tubuh tetapi kadar paling banyak ditemukan di hati sehingga kerusakan paling berat akibat paparan DMBA akan terjadi pada organ hati (Murray, 2006). Menurut Gao *et al.*, (2007), DMBA bersifat hepatotoksik. Sifat hepatotoksik terjadi melalui mekanisme pengrusakan

DNA, akumulasi *Reactive Oxygen Species* (ROS), dan mediasi mediator-mediator inflamasi kronis (Sharma dan Paliwal, 2012).

Mekanisme DMBA menjadi senyawa toksik terjadi melalui aktivasi metabolisme di hati. Sitokrom P450 dan *microsomal epoxide hydrolase* (mEH) memetabolisme DMBA menjadi metabolit elektrofilik dan bersifat DNA *adduct*. Sitokrom P450 (CYP1A1) akan mengoksidasi DMBA menjadi 3,4-epoksida yang diikuti dengan hidrolisis epoksida oleh mEH membentuk DMBA-3,4-diol. Metabolit ini akan dioksidasi kembali oleh CYP1A1 atau CYP1B1 menjadi metabolit aktif, yaitu DMBA-DE. DMBA-DE ini dapat bereaksi dengan lipid, protein, dan DNA karena sifat DMBA-DE yang reaktif, elektrofilik dan DNA *adduct*. Ikatan DMBA-DE dengan makromolekul serta akumulasi ROS yang terjadi akan menyebabkan kerusakan sel hati. Kerusakan hati yang terjadi ditingkat seluler tersebut dapat dilihat melalui gambaran histopatologi berupa fokal nekrosis dengan inti piknosis disertai infiltrasi sel radang, inti polimorfik, dan kongesti pembuluh darah hepatoporta serta dilatasi vena sentral (Sharma dan Paliwal, 2012; Rahardhian, 2014; Dakrory, 2015).

Dampak destruktif dari DMBA dapat dicegah dengan antioksidan endogen yang ada. Namun, keterbatasan jumlah antioksidan endogen serta dampak metabolit aktif DMBA dalam menurunkan aktivitas enzim antioksidan tersebut dapat menyebabkan jumlah antioksidan endogen tidak sebanding dengan jumlah ROS yang ada sehingga diperlukan antioksidan eksogen yang berperan sebagai agen hepatoprotektor terhadap kerusakan hati. Kekhawatiran terhadap efek samping antioksidan eksogen sintetik menjadikan antioksidan eksogen alami menjadi alternatif yang terpilih. Salah satu antioksidan alami yang dapat diteliti sebagai agen hepatoprotektor adalah brokoli.

Brokoli merupakan sayuran yang sering dikonsumsi masyarakat Indonesia karena rasanya yang enak, mudah didapat, dan harganya relatif terjangkau. Selain itu, brokoli merupakan sayuran yang memiliki banyak manfaat dalam bidang kesehatan. Senyawa bioaktif yang terkandung dalam brokoli seperti beta karoten, vitamin C, E,

dan A, karotenoid, dan polifenol terutama flavonoid merupakan antioksidan alami dalam sayur dan buah (Faller dan Fialho, 2009; Moreno *et al.*, 2010). Dalam penelitian Lutfita (2012), kekuatan antioksidan ekstrak maserasi brokoli (*Brassica oleracea* L.var *italica*) bernilai IC<sub>50</sub>: 3,63 µg/ml yang berdasarkan tingkatan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH oleh Ariyanto (2006) tergolong antioksidan yang sangat kuat. Pada penelitian tersebut juga dijelaskan bahwa 74,7% aktivitas antioksidan berasal dari kandungan flavonoid.

Penelitian oleh Hashem *et al.* (2013) telah membuktikan bahwa brokoli dapat digunakan sebagai agen hepatoprotektor. Pemberian ekstrak brokoli dosis 1000 mg/kgBB dapat menurunkan enzim-enzim hati (SGPT, SGOT, dan ALP) secara signifikan ( $p < 0,05$ ) pada tikus yang telah diinduksi parasetamol. Efek hepatoprotektif brokoli pada penelitian tersebut juga ditunjukkan dengan adanya perbaikan pada gambaran histologis sel hati tikus. Pemberian ekstrak brokoli lebih efektif sebagai terapi profilaksis daripada sebagai terapi kuratif ditunjukkan dengan penurunan enzim-enzim hati seperti SGPT dan SGOT yang lebih tinggi serta perbaikan kerusakan sel hati yang lebih kearah normal.

Efektivitas pemberian brokoli sebagai terapi profilaksis pada penelitian sebelumnya menjadi dasar untuk melakukan penelitian ini. Peneliti menggunakan DMBA untuk menginduksi kerusakan histologis sel hati tikus (*Rattus novergicus*) dan ekstrak etanol brokoli dengan dosis bertingkat sebagai agen hepatoprotektor.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Rumusan masalah penelitian ini adalah apakah terdapat perbedaan efek hepatoprotektif ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea* L.var *italica*) terhadap kerusakan histologis sel hati tikus (*Rattus novergicus*) yang diinduksi DMBA?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui dan membuktikan perbedaan efek hepatoprotektif ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea* L.var *italica*) terhadap kerusakan histologis sel hati tikus (*Rattus novergicus*) yang diinduksi DMBA.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini sebagai berikut.

a. Manfaat bagi peneliti

Penelitian ini merupakan wujud aplikasi disiplin ilmu yang telah dipelajari sehingga peneliti dapat mengembangkan wawasan keilmuan.

b. Manfaat bagi masyarakat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan dan informasi bagi masyarakat tentang salah satu manfaat brokoli (*Brassica oleracea* L.var *italica*) sebagai antioksidan dalam mencegah kerusakan sel hati.

c. Manfaat bagi institusi

Penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan iklim penelitian dibidang agromedis sesuai dengan visi FK UNEJ, yaitu sebagai lembaga pendidikan kedokteran yang berkualitas, berwawasan lingkungan global, dan berkemampuan mengembangkan ilmu pengetahuan dan teknologi kedokteran bagi kepentingan kemanusiaan, terutama kearah berkembangnya agromedis.

d. Manfaat bagi pemerintah

Penelitian ini diharapkan menjadi sumber informasi terhadap bahaya asap kendaraan bermotor yang bersifat hepatotoksik sehingga perlu dibuat kebijakan untuk membatasi jumlah kendaraan yang beredar di Indonesia.

e. Manfaat bagi peneliti lain

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan untuk dilakukannya penelitian berkaitan dengan dosis optimum brokoli sebagai agen hepatoprotektor dan manfaat brokoli terhadap induktor yang bersifat karsinogenik.

## **BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 Brokoli**

Brokoli merupakan tumbuhan yang memiliki bunga berwarna hijau hidup pada dataran dengan ketinggian di atas 700 mdpl dan memiliki masa tumbuh lebih lama daripada kubis bunga. Tumbuhan ini berasal dari Laut Tengah dan masuk ke Indonesia sekitar tahun 1970-an. Tumbuhan ini tersusun dari bunga-bunga kecil yang berwarna hijau, tetapi tidak sekompak bunga kubis dengan tangkai bunga yang lebih panjang. Dibandingkan dengan kubis bunga, setelah direbus tekstur brokoli akan terasa lebih lunak. Bagian brokoli yang dimakan adalah kepala bunga berwarna hijau yang tersusun rapat seperti cabang pohon dengan batang tebal, lihat Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Tumbuhan Brokoli (Sumber: Dalimartha, 2000)

### 2.1.1 Taksonomi Tumbuhan Brokoli

Brokoli (*Brassica oleracea* L.var *italica*) dalam taksonomi tumbuhan diklasifikasikan sebagai berikut.

Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Capparales
Suku	: Brassicaceae
Marga	: <i>Brassica</i>
Jenis	: <i>Brassica oleracea</i> L.var <i>italica</i>

### 2.1.2 Kandungan Brokoli

Brokoli (*Brassica oleracea* L.var *italica*) merupakan salah satu famili dari *Brassicaceae* yang mengandung fitokimia seperti glukosinolat, senyawa fenolik, serat dan senyawa antioksidan seperti vitamin C dan E serta mineral (Ca, Mg, Se, dan K). Selain itu, brokoli juga banyak mengandung sulforapan dan 3,3-diindolilmetana (DIM) (Fitriani dan Luh, 2011; Sari, 2014).

Hasil pengujian penapisan fitokimia dengan metode maserasi, kandungan senyawa yang terdeteksi pada brokoli (*Brassica oleracea* L.var *italica*) adalah flavonoid, kuinon, monoterpen dan seskuiterpen, triterpenoid dan steroid, dan saponin (Lutfita, 2012). Hasil pengujian tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kandungan senyawa brokoli

<b>Pengujian</b>	<b>Simplisia Kering</b>	<b>Ekstrak Maseiasi</b>	<b>Ekstrak refluks</b>
Senyawa fenolat	–	–	–
Flavanoid	√	√	√
Tanin	–	–	–
Kuinon	√	√	√
Monoterpen dan seskuiiterpen	√	√	√
Triterpenoid dan steroid	√	√	√
Saponin	√	√	√
Alkaloid	–	–	–

Keterangan:

(√) = terdeteksi

(–) = tidak terdeteksi

Sumber : Lutfita (2012)

Pada penelitian Koh *et al.* (2009), kandungan flavonoid dalam brokoli banyak berupa flavonol terutama kaempferol dan kuersetin. Kandungan kaempferol dan kuersetin yang terukur dalam 100g brokoli pada kisaran 0,24-13,20 mg/100g dan 0,03-10,85 mg/100g. Kandungan senyawa aktif dalam brokoli dipengaruhi oleh beberapa hal seperti, jenis brokoli, kondisi lingkungan, proses penanaman, penyimpanan dan pengolahan paska panen, dan metode ekstraksi (Koh *et al.*, 2009).

### 2.1.3 Manfaat Brokoli

Brokoli merupakan sayuran yang memiliki banyak manfaat dalam bidang kesehatan. Brokoli dapat digunakan sebagai agen hepatoprotektor karena memiliki aktivitas antioksidan. Antioksidan alami yang banyak terdapat pada buah dan sayur seperti beta karoten, vitamin C, E, dan A, karotenoid, dan polifenol terutama flavonoid merupakan senyawa bioaktif dalam brokoli (Faller dan Fialho, 2009; Monero *et al.*, 2010).

Karotenoid merupakan tetraterpenoid C<sub>40</sub> yang berfungsi sebagai pigmen tumbuhan. Salah satu jenis karotenoid yang penting adalah lutein. Penelitian terhadap 6 kultivar brokoli menghasilkan kandungan lutein berkisar 0,41–1,02 mg/kg bobot

basah (Sing *et al.* 2007). Lutein juga memiliki aktivitas antioksidan yang dapat melindungi sel-sel terhadap kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas. Potensi antioksidannya bernilai  $IC_{50}$ : 147,708  $\mu\text{g/mL}$  dan tergolong sedang berdasarkan tingkatan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH oleh Ariyanto (2006).

Pada penelitian dengan cara ekstraksi yang berbeda, yaitu metode maserasi, brokoli memiliki potensi antioksidan yang sangat kuat dengan nilai  $IC_{50}$ : 3,63  $\mu\text{g/mL}$ . Nilai  $IC_{50}$  didefinisikan sebagai konsentrasi senyawa (ekstrak atau fraksi) uji yang dibutuhkan untuk mengurangi intensitas warna radikal DPPH sebesar 50 %. Dalam penelitian Lutfita (2012) yang meneliti aktivitas antioksidan dalam ekstrak maserasi brokoli, nilai  $IC_{50}$  berbanding lurus dengan besar kandungan flavonoid yang ada. Tabel 2.2

Tabel 2.2 Kadar flavonoid total dan nilai  $IC_{50}$  ekstrak brokoli dengan metode maserasi

Pengujian	Kadar Flavonoid Total ( $\mu\text{g/mL}$ )	Nilai $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Ekstrak maserasi	43.67	3.63
Fraksi air	33.08	8.36
Fraksi etil asetat	21.25	11.78
Fraksi n-heksan	9.27	52.33

Sumber: Lutfita, 2012

Aktivitas antioksidan yang dimiliki brokoli digunakan sebagai dasar penggunaan brokoli sebagai agen hepatoprotektor. Penelitian oleh Hashem *et al.* (2013) telah membuktikan bahwa brokoli dapat digunakan sebagai agen hepatoprotektor. Pemberian ekstrak brokoli dengan dosis 1000 mg/Kgbb pada tikus yang diinduksi parasetamol menunjukkan penurunan enzim-enzim hati (AST, ALT, dan ALP) secara signifikan ( $p < 0,05$ ). Pada penelitian tersebut juga disebutkan bahwa pemberian ekstrak brokoli dosis 1000 mg/Kgbb lebih efektif sebagai terapi profilaksis daripada sebagai terapi kuratif dalam mencegah kerusakan sel hati tikus yang diinduksi parasetamol.

Manfaat dari brokoli selain sebagai antioksidan eksogen alami, yaitu sebagai anti kanker. Kandungan glukosinolat dilaporkan memiliki sifat anti kanker dan mencegah pembentukan tumor dalam berbagai macam jaringan seperti jaringan hati, prostat, kolon, pankreas, dan usus halus. Brokoli juga banyak mengandung sulforapan (Sari, 2014). Dalam penelitian disebutkan bahwa kombinasi sulforapan dengan 3,3-diindolilmetana yang berasal dari proses biosintesis brokoli memiliki pengaruh sebagai antiproliferasi pertumbuhan sel kanker kolon secara invitro pada konsentrasi lebih dari 10  $\mu\text{M}$ . Pada kombinasi dua senyawa tersebut, sulforapan bersifat sitotoksik sedangkan 3,3-diindolilmetana bersifat sitostatik (Fitriani dan Luh, 2011).

## **2.2 Radikal Bebas**

### **2.2.1 Definisi Radikal Bebas**

Radikal bebas merupakan senyawa reaktif yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas cenderung untuk mencari pasangan dengan cara mengikat elektron disekelilingnya. Jika elektron yang terikat oleh senyawa radikal bebas tersebut bersifat ionik, dampak yang akan timbul tidak begitu berbahaya. Akan tetapi, apabila elektron yang terikat oleh radikal bebas berasal dari senyawa yang berikatan kovalen, akibatnya akan sangat berbahaya. Umumnya, senyawa yang memiliki ikatan kovalen adalah molekul besar (biomakromolekul) seperti lipid, protein, dan DNA (Winarsi, 2007).

### **2.2.2 Reaksi Radikal Bebas**

Reaktivitas dari radikal bebas akan menyebabkan terbentuk radikal bebas baru. Namun, bila dua senyawa radikal bertemu, elektron-elektron yang tidak berpasangan dari kedua senyawa tersebut akan bergabung dan membentuk ikatan kovalen yang stabil. Sebaliknya, bila senyawa radikal bebas bertemu dengan senyawa bukan radikal bebas, akan terjadi tiga kemungkinan reaksi sebagai berikut.

- a. Radikal bebas akan memberikan elektron yang tidak berpasangan (reduktor) kepada senyawa bukan radikal bebas.

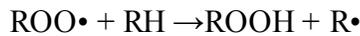
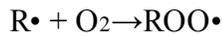
- b. Radikal bebas menerima elektron (oksidator) dari senyawa bukan radikal bebas.
- c. Radikal bebas bergabung dengan senyawa bukan radikal bebas (Winarsi, 2007).

Secara umum, pembentukan radikal bebas melalui 3 tahapan reaksi sebagai berikut.

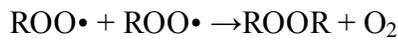
- a. Inisiasi yaitu tahap awal yang akan menyebabkan terbentuknya radikal bebas.



- b. Propagasi yaitu tahap radikal bebas cenderung bertambah banyak dengan membuat reaksi rantai dengan molekul lain (pemanjangan rantai radikal).



- c. Terminasi yaitu bereaksinya senyawa radikal dengan radikal lain atau dengan penangkap radikal sehingga potensi propagasinya rendah.



Akumulasi radikal bebas dalam jumlah kecil masih bisa ditolerir oleh tubuh. Namun, jika sudah dalam jumlah banyak bisa berbahaya. Tiga reaksi yang paling relevan dengan jejas sel yang diperantarai radikal bebas adalah (1) Peroksidasi lipid membran, ikatan ganda pada lemak tak jenuh (PUFA) mudah terkena serangan radikal bebas yang berasal dari oksigen. Interaksi radikal lemak menghasilkan peroksida yang tidak stabil, reaktif, dan memicu reaksi rantai autokatalitik sehingga dapat merusak membran sel dengan mengganggu permeabilitas membran dan fungsi membran, (2) Ikatan silang protein, kerusakan protein akibat radikal bebas karena ikatan silang protein yang diperantarai sulfhidril yang menyebabkan peningkatan kecepatan degradasi atau hilangnya aktivitas enzimatik. Reaksi radikal bebas juga dapat secara langsung menyebabkan fragmentasi polipeptida. (3) Fragmentasi DNA, reaksi radikal bebas dengan timin pada DNA di mitokondria dan nuklear dapat

menyebabkan rusaknya untaian DNA. Kerusakan tersebut akan berimplikasi pada pembunuhan sel dan perubahan sel menjadi ganas.

### 2.3 7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )antrasen (DMBA)

*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) merupakan bentuk polutan yang ada di lingkungan sekitar. PAH berasal dari hasil pembakaran yang tidak sempurna dari bahan bakar minyak, bahan organik lain dan sering ditemukan pada asap kendaraan, asap rokok, dan asap pembakaran lahan atau pohon. Senyawa *prototype* PAH yang salah satunya adalah 7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )antrasen (DMBA).

DMBA memiliki rumus kimia  $C_{20}H_{16}$  dan bersifat lipofilik sehingga bentuk DMBA yang berupa bubuk kuning harus dilarutkan dalam senyawa yang bersifat nonpolar. Dalam berbagai penelitian, senyawa ini digunakan sebagai induktor untuk membuat kerusakan sel hati. Cara pemberian DMBA kepada hewan coba dapat melalui ingesti, intravena, subkutan, intraperitoneal, dan intratrakea.

DMBA merupakan senyawa karsinogen sekunder (prokarsinogen) sehingga harus mengalami aktivasi metabolisme dan biotransformasi untuk menghasilkan karsinogen aktif. DMBA diubah menjadi DMBA-3,4-diol-1,2-epoksida (DMBA-DE) dalam metabolisme hati. DMBA-DE dan senyawa xenobiotik PAH lainnya bersifat destruktif, imunotoksik dan hepatotoksik (Gao *et al.*, 2007).

Mekanisme DMBA menjadi senyawa toksik terjadi melalui aktivasi metabolisme di hati. Sitokrom P450 dan *microsomal epoxide hydrolase* (mEH) memetabolisme DMBA menjadi metabolit elektrofilik dan bersifat DNA *adduct*. Sitokrom P450 (CYP1A1) akan mengoksidasi DMBA menjadi 3,4-epoksida yang diikuti dengan hidrolisis epoksida oleh mEH membentuk DMBA-3,4-diol. Metabolit ini akan dioksidasi kembali oleh CYP1A1 atau CYP1B1 menjadi metabolit aktif, yaitu DMBA-DE.

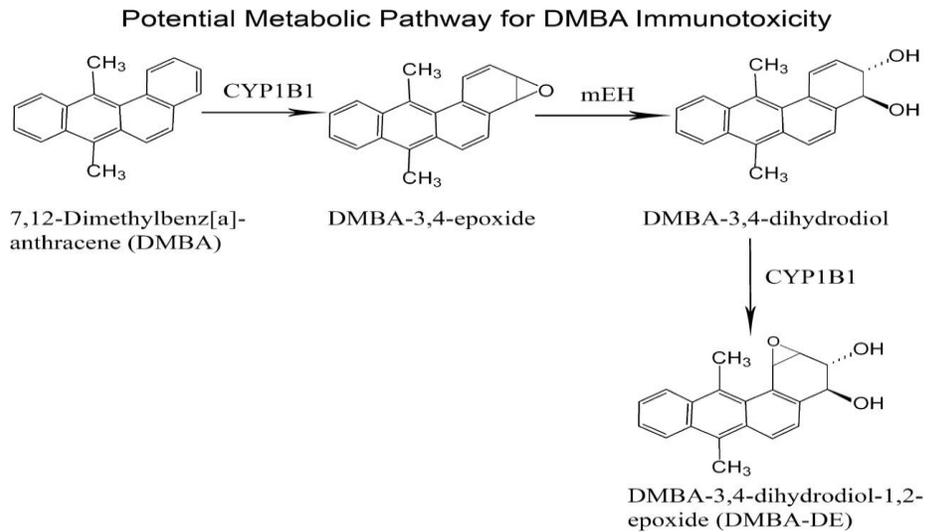
DMBA-DE bersifat elektrofilik dengan reaktivitas yang tinggi. Senyawa epoksida ini mudah terhidrolisis sehingga cincin epoksida mudah terbuka dan menghasilkan senyawa yang reaktif. Senyawa DMBA-DE dapat berikatan dengan

lipid membran. Lipid membran akan teroksidasi karena pelepasan atom hidrogen atau elektron dari lipid membran kepada senyawa epoksida tersebut. Oksidasi lipid membran oleh senyawa epoksida yang bersifat reaktif disebut dengan peroksidasi lipid. Proses ini akan menyebabkan permeabilitas sel meningkat dan menyebabkan gangguan homeostasis ionik dan cairan sel. Ikatan silang protein juga dapat terjadi karena kereaktivitas DMBA-DE. Selain itu, DMBA-DE juga bersifat DNA *adduct* yang dapat berikatan dengan DNA. Interaksi ini dapat menyebabkan mutasi gen dan kerusakan DNA yang berujung pada kematian sel.

DMBA-DE merupakan agen pembentukan radikal bebas atau senyawa inisiator. Senyawa ini akan menginduksi reaksi berantai radikal bebas sehingga akan terjadi akumulasi ROS pada sel hati yang dapat memicu sel radang. Akumulasi ROS yang berlebihan akan menyebabkan stres oksidatif karena adanya ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan dalam tubuh sehingga terjadi kerusakan sel. Ketidakseimbangan yang terjadi didukung oleh efek DMBA yang dapat menurunkan enzim antioksidan endogen seperti SOD, GST, dan CAT (Dakrory *et al.*, 2015).

Efek DMBA dalam merusak sel hati telah dibuktikan dalam berbagai penelitian terdahulu. DMBA dengan dosis 15 mg/kgBB p.o dapat menyebabkan peningkatan SGPT, SGOT, dan ALP yang merupakan indikator terjadinya kerusakan hati (Rahardian, 2014; Dakrory, 2015). Pada dosis tersebut juga terjadi peningkatan MDA dan penurunan total protein. Peningkatan MDA menunjukkan adanya reaksi peroksidasi lipid membran dan penurunan total protein menunjukkan gangguan fungsi hati yang terjadi (Dakrory, 2015).

Pada gambaran histologis, kerusakan sel hati pada pemberian DMBA *single dose* per oral dosis 15 mg/kgBB ditunjukkan dengan adanya fokal nekrosis dengan inti piknosis disertai infiltrasi sel radang, inti polimorfik, dan kongesti pembuluh darah hepatoporta serta dilatasi vena sentral (Sharma dan Paliwal, 2012; Rahardian, 2014; Dakrory, 2015).



Gambar 2.2 Metabolisme DMBA (Sumber: Gao *et al.*, 2007)

## 2.4 Antioksidan

### 2.4.1 Definisi Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa-senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil yang bertindak sebagai reduktan atau pemberi elektron sehingga mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya senyawa radikal baru. Akibatnya, kerusakan sel dapat dihambat (Winarsi, 2007).

### 2.4.2 Klasifikasi Antioksidan

Antioksidan dapat diklasifikasikan berdasarkan sumber darimana antioksidan didapatkan dan bisa juga diklasifikasikan berdasarkan fungsi atau mekanisme kerja antioksidan itu sendiri.

#### a. Antioksidan berdasarkan sumbernya.

Antioksidan berdasarkan sumbernya dibedakan menjadi tiga.

1) Antioksidan dibuat oleh tubuh kita sendiri (endogen) yang berupa enzim, diantaranya adalah sebagai berikut.

a) *Superoksida Dismutase* (SOD)

*Superoksida Dismutase (SOD)* adalah suatu antioksidan intrasel yang memiliki peranan penting dalam sistem pertahanan tubuh, terutama terhadap aktifitas senyawa oksigen reaktif yang dapat menimbulkan stres oksidatif. SOD di dalam tubuh mempunyai aktifitas mengkatalisis radikal superoksida ( $O_2^-$ ) menjadi hidrogen peroksida dan oksigen.

b) *Glutathione Peroksidase*

*Glutathione Peroksidase* merupakan enzim yang berperan untuk mengkatalisis pembentukan radikal gugus hidroksil.

c) *Katalase*

Enzim *katalase* merupakan enzim yang mengkatalisis perubahan hidrogen peroksida menjadi oksigen dan air.

2) Antioksidan alami yang dapat diperoleh dari tanaman, diantaranya sebagai berikut.

a) Vitamin C

Antioksidan vitamin C mampu bereaksi dengan radikal bebas, kemudian mengubahnya menjadi radikal askorbil. Senyawa radikal terakhir ini akan segera berubah menjadi askorbat dan dehidroaskorbat. Askorbat berperan sebagai agen pereduksi atau reduktor untuk berbagai radikal bebas dan juga meminimalkan terjadinya kerusakan yang disebabkan oleh akumulasi ROS.

b) Beta karoten

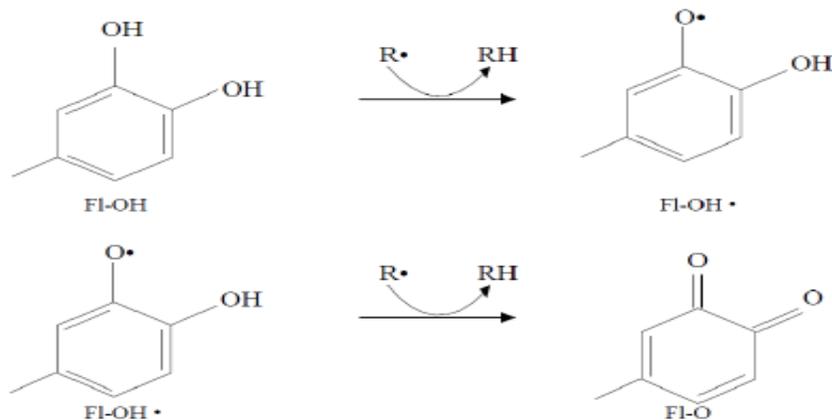
Beta karoten merupakan pigmen alami yang larut lemak. Beta karoten bermanfaat bagi kesehatan tubuh salah satunya memiliki aktivitas sebagai antioksidan, dengan mengikat oksigen, merapuhkan radikal peroksil dan menghambat oksidasi lipid.

c) Vitamin E

Vitamin E merupakan vitamin larut lemak yang memiliki peran lebih sebagai antioksidan di dalam tubuh daripada sebagai kofaktor spesifik. Sebagai antioksidan vitamin E berfungsi sebagai donor hidrogen.

d) Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan pada tanaman. Senyawa ini memiliki struktur kimia C6-C3-C6 yang terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen dan bentuk teroksidasi cincin ini dijadikan dasar pembagian flavonoid ke dalam sub-sub kelompoknya. Flavonoid dapat berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya dari gugus hidroksil yang terikat pada karbon cincin aromatik sehingga dapat menangkap radikal bebas yang dihasilkan dari peroksidasi lemak (Dewi, 2014).



Gambar 2.3 Mekanisme kerja flavonoid (Sumber: Ridho, 2013)

### 3) Antioksidan sintesis

Ada beberapa antioksidan sintesis yang penggunaannya menyebar luas di seluruh dunia, yaitu *butylated hydroxyanisole* (BHA), *butylated hydroxytoluene* (BHT), *tert-butyl hydroquinone* (TBHQ), *propyl gallate*, serta tokoferol (sintesis). Antioksidan tersebut telah diproduksi secara sistematis untuk tujuan komersial. Antioksidan sintetis seperti BHA dan BHT bersifat sangat efektif dan banyak digunakan. Namun, dua antioksidan ini memiliki beberapa efek samping terhadap kesehatan manusia.

### b. Antioksidan berdasarkan fungsinya

Menurut Kumalaningsih (2010), antioksidan berdasarkan fungsinya dibedakan menjadi 5, yaitu sebagai berikut.

#### 1) Antioksidan Primer

Antioksidan primer berfungsi untuk mencegah terbentuknya radikal bebas yang baru dengan mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang berkurang dampak negatifnya sebelum radikal bebas tersebut bereaksi. Contoh antioksidan primer ini di dalam tubuh seperti enzim *superoksida dismutase*, yang melindungi hancurnya sel-sel di dalam tubuh akibat serangan radikal bebas.

#### 2) Antioksidan Sekunder

Antioksidan sekunder merupakan senyawa yang berfungsi menangkap radikal bebas untuk mampu mencegah terjadinya reaksi berantai sehingga tidak terjadi kerusakan yang besar. Contoh antioksidan sekunder adalah vitamin E, beta karoten, flavonoid, dan lain lain.

#### 3) Antioksidan Tersier

Antioksidan tersier merupakan antioksidan yang bekerja dengan memperbaiki sel-sel serta jaringan jaringan yang rusak akibat dampak negatif dari serangan radikal bebas. Contoh antioksidan tersier adalah enzim *metionin sulfoksidan reduktase* yang dapat memperbaiki DNA inti sel.

#### 4) *Oxygen Scavenger*

Antioksidan yang termasuk *oxygen scavenger* mampu mengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi. Contoh dari *oxygen scavenger* adalah vitamin C.

#### 5) *Chelators* atau *Sequesstrants*

Antioksidan yang termasuk *chelators* atau *sequesstrants* dapat mengikat logam sehingga logam tersebut tidak bisa mengkatalisis reaksi oksidasi sehingga kerusakan dapat dicegah. Contoh dari senyawa ini adalah feritin, tranferin, dan seruloplasmin.

### 2.4.3 Mekanisme Kerja Antioksidan

Mekanisme antioksidan dibagi menjadi tiga, antara lain sebagai berikut.

- a. Mekanisme pemutusan reaksi berantai radikal bebas dengan mendonorkan atom hidrogen. Antioksidan (AH) dapat memberikan atom hidrogen secara cepat pada radikal bebas ( $R^\bullet$ ,  $ROO^\bullet$ ), sementara radikal antioksidan ( $A^\bullet$ ) yang terbentuk memiliki keadaan yang lebih stabil dibandingkan radikal bebas. Contoh antioksidan ini adalah flavonoid, tokoferol, dan senyawa tiol yang dapat memutus rantai reaksi propagasi dengan menyumbang elektron pada peroksi radikal dalam asam lemak.
- b. Memperlambat laju autoantioksidan dengan berbagai mekanisme diluar mekanisme pemutusan rantai autoantioksidan dengan perubahan radikal bebas kebentuk yang lebih stabil. Mekanismenya antara lain dengan mengikat oksigen dan menjadi agen pereduksi. Contoh antioksidan ini adalah Vitamin C dan beta karoten.
- c. Menghambat kerusakan sel atau jaringan oleh karena radikal bebas. Contoh antioksidan ini adalah enzim *metionin sulfoksidan reduktase* yang dapat memperbaiki DNA inti sel.

## **2.5 Hati**

### **2.5.1 Anatomi Hati**

Hati atau hepar merupakan organ terbesar di dalam tubuh. Hati bertekstur lunak dan lentur, serta terletak di bagian atas cavitas abdominalis tepat di bawah diafragma. Hati dapat dibagi dalam lobus dextra yang besar dan lobus sinistra yang kecil. Keduanya dipisahkan oleh perlekatan peritoneum yang disebut ligamentum falciformis. Lobus dextra terbagi lagi menjadi lobus quadratus dan lobus caudatus. Namun, secara fungsional lobus quadratus dan lobus caudatus merupakan bagian dari lobus sinistra (Snell, 2006).

Hati yang terdiri atas lobulus-lobulus akan menerima darah sebanyak 1500 ml/menit melalui vena porta dan arteri hepatica. Darah yang mengalir ke hati 70% melalui vena porta. Darah tersebut miskin oksigen tetapi kaya akan zat gizi dan mungkin juga mengandung toksin dan bakteri. Sementara itu, darah yang didapatkan dari arteri hepatica memiliki saturasi oksigen yang tinggi. Didalam hati juga terdapat saluran empedu. Jika vena porta, arteri hepatica, dan saluran empedu terdapat dalam satu daerah maka daerah tersebut disebut trias porta hepatis. Trias porta tersebut berada didalam ruang antar lobulus. Darah dari arteri hepatica dan vena porta akan disalurkan ke vena sentralis dalam lobulus melalui kapiler yang disebut sinusoid. Setelah dari vena sentralis darah akan meninggalkan hati melalui vena hepatica sinistra dan dextra yang keduanya bermuara pada vena cava inferior untuk dibawa kembali ke jantung.

### **2.5.2 Histologi Hati**

Lobulus hati merupakan suatu unit fungsional dasar hati. Secara mikroskopis di dalam hati manusia terdapat 50.000-100.000 lobulus, setiap lobulus berbentuk heksagonal yang terdiri atas sel hati yang berbentuk kubus yang tersusun radial mengelilingi vena sentralis. Diantara sel hati terdapat kapiler-kapiler yang disebut sinusoid. Sinusoid merupakan cabang dari vena porta dan arteri hepatica. Selain itu, diantara celah celah sel hati juga berjalan duktus biliaris. Dalam sinusoid pada

endotel melekat sel kupffer (makrofag) dan diantara sinusoid dan hepatosit terdapat ruang yang disebut ruang parasinusoid. Ruang parasinusoid terdapat sel-sel penimbun lemak dan sel ito untuk menyimpan vitamin A. Mikrovili hepatosit akan menonjol ke ruang parasinusoid dan di parasinusoid terjadi pertukaran zat yang ada didalam darah masuk ke sel hati dan zat-zat hasil sekresi hepatosit akan dikeluarkan dan masuk ke sinusoid. Berdasarkan suplai darah ke hepatosit dan gradient oksigen dari arteri hepatica dan vena porta ke vena sentral, lobulus hati terbagi dalam tiga zona sebagai berikut.

a. Zona 1

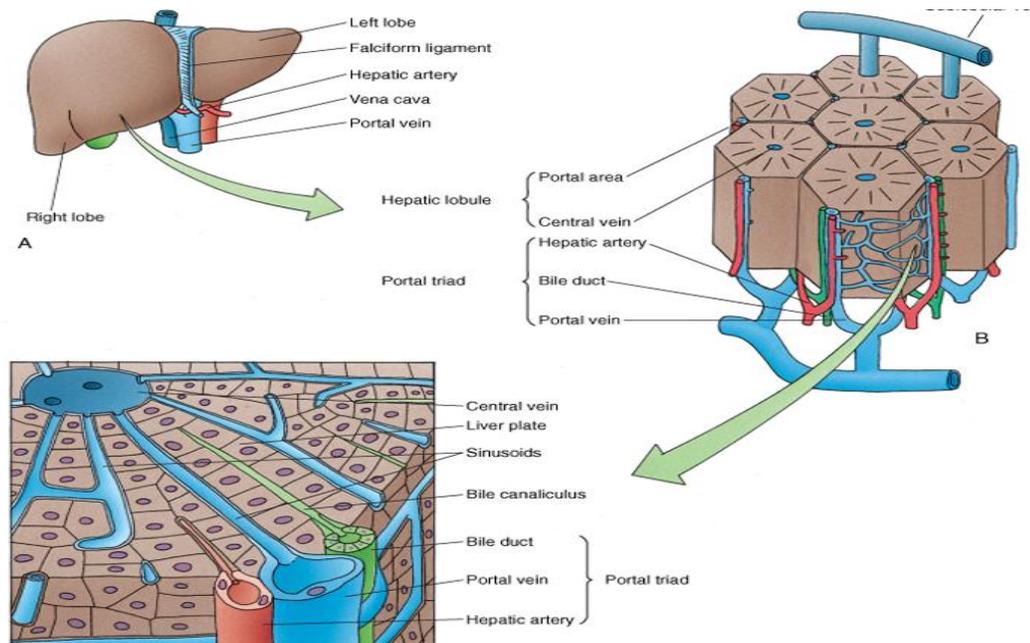
Zona 1 merupakan zona didekat area porta sehingga hepatosit pada zona ini mendapat banyak pasokan oksigen. Hepatosit pada daerah ini lebih berperan dalam sintesis protein.

b. Zona 2

Zona yang terdapat antara zona 1 dan zona 2.

c. Zona 3

Zona 3 merupakan daerah yang mendapatkan pasokan oksigen yang lebih rendah daripada zona 1 dan zona 2 sehingga hepatosit pada daerah ini akan mengalami kerusakan yang lebih dahulu ketika terjadi jejas iskemik. Hepatosit pada daerah ini lebih berperan dalam metabolisme glikogen dan detoksifikasi senyawa toksik.



Gambar 2.4 Anatomi dan histologi hati (Sumber: Gartner, 2007)

### 2.5.3 Fungsi Hati

Hati memiliki fungsi untuk metabolisme beberapa molekul seperti karbohidrat, lemak, protein, dan senyawa xenobiotik. Fungsi metabolisme dari molekul tersebut sebagai berikut.

#### a. Metabolisme karbohidrat.

Hati memetabolisme karbohidrat dengan penyimpanan glikogen dalam jumlah besar dan juga berperan dalam proses glukoneogenesis sehingga hati ikut menyeimbangkan kadar gula darah dalam tubuh.

#### b. Metabolisme lemak

- 1) Oksidasi asam lemak sebagai suplai energi
- 2) Sintesis kolesterol, fosfolipid, dan sebagian besar lipoprotein
- 3) Sintesis lemak dari protein dan karohidrat

c. Metabolisme protein

- 1) Deaminasi asam amino
- 2) Pembentukan ureum untuk ekresikan ammonia
- 3) Sintesis protein plasma

d. Metabolisme xenobiotik

Tahapan metabolisme xenobiotik dibagi menjadi dua fase, yaitu fase I dan fase II. Pada fase I, reaksi utamanya adalah hidroksilasi yang dikatalisis oleh enzim yang disebut mono-oksigenase atau sitokrom P450. Dalam metabolisme xenobiotik pada fase I, suatu senyawa xenobiotik aktif diubah menjadi senyawa yang kurang aktif atau inaktif sebelum dikonjugasikan. Akan tetapi, pada kasus tertentu, reaksi metabolik fase I mengubah xenobiotik dari senyawa yang secara biologis inaktif menjadi aktif. Dalam hal ini, xenobiotik tersebut disebut prodrug atau prokarsinogen.

Enzim sitokrom P450 paling banyak terdapat pada sel hati dan enterosit meskipun terdapat di semua jaringan. Di hati dan sebagian besar jaringan lain, sitokrom P450 terutama terdapat pada membran retikulum endoplasma halus. Enzim ini memiliki banyak isoform, salah satunya CYP1A1 dan CYP1B1 yang sangat berperan dalam metabolisme *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH). Enzim ini penting dalam metabolisme PAH dan proses karsinogenesis.

Pada metabolisme xenobiotik fase II, senyawa yang telah terhidroksilasi diubah menjadi senyawa yang lebih polar oleh konjugasi dengan glukoronat, sulfat, asetat, glutation, metilasi atau asam amino tertentu sehingga bisa diekskresikan keluar tubuh melalui empedu atau urin. Tujuan kedua fase metabolisme xenobiotik adalah meningkatkan kelarutan xenobiotik dalam air.

Glutation adalah suatu tripeptida yang terdiri dari asam glutamate, sistein, dan glisin. Glutation (GSH) berperan penting dalam pertahanan terhadap senyawa toksik seperti obat dan senyawa karsinogen. Sejumlah xenobiotik elektrofilik yang berpotensi toksik (karsinogen) dikonjugasikan dengan GSH nukleofilik dan dikatalisis oleh enzim glutation S-transferase. Apabila xenobiotik yang bersifat

toksik tidak dikonjugasikan dengan GSH, maka xenobiotik tersebut akan berikatan bebas dengan ikatan kovalen pada DNA, RNA, atau protein sehingga akan terjadi kerusakan sel serius. Kadar enzim yang memetabolisme xenobiotik bisa dirangsang ataupun dihambat oleh pemberian senyawa tertentu ataupun karena hasil metabolit dari xenobiotik itu sendiri.

#### 2.5.4 Mekanisme Kerusakan Hati

Hati merupakan organ utama yang memetabolisme dan mendetoksifikasi semua bahan kimia termasuk obat yang masuk ke dalam tubuh. Hati sangat beresiko untuk mengalami kerusakan akibat efek bahan-bahan kimia berbahaya. Kerusakan yang terjadi bisa melalui mekanisme toksisitas langsung, konversi suatu xenobiotik menjadi toksin aktif oleh hati, atau akibat reaksi imunologik. Kerusakan hati yang terjadi akibat bahan kimia atau obat dikaitkan dengan mekanisme kerja enzim oksidator penting dalam hati, yaitu sitokrom P450. Enzim sitokrom P450 bekerja mengkatalisis biotransformasi obat atau bahan kimia menjadi metabolit yang tidak aktif atau kurang aktif, tetapi pada beberapa senyawa, metabolit yang terjadi memiliki sifat lebih aktif dan toksik sehingga dapat menginduksi terjadi lesi atau kerusakan sel hati.

Senyawa metabolit aktif yang terjadi dapat secara langsung memicu nekrosis pada mitokondria dan menurunkan kemampuan GSH sebagai antioksidan. Jalur yang kedua adalah melalui reaksi imunologi yang ditandai dengan adanya aktivasi sel kuffer dan sel imun lain sehingga menyebabkan suatu reaksi inflamasi dan lesi sel yang diperantarai pembebasan sitokin. Pada jalur ini juga terjadi induksi TNF- $\alpha$ , induksi apoptosis, dan inhibisi fungsi mitokondria.

Pada tingkat seluler, sel dapat mengalami jejas dengan mudah tergantung pada (1) Integritas membran sel, (2) Pembentukan ATP, (3) Sintesis protein, dan (4) Integritas apparatus genetik. Penurunan integritas membran akan menyebabkan pembengkakan pada lisosom, mitokondria, dan retikulum endoplasma. Selain itu,

penurunan integritas membran sel juga akan menyebabkan akumulasi ion kalsium intrasel yang dapat mengaktifkan enzim protease dan enzim fosfolipase.

Jejas sel dapat berupa jejas reversibel ataupun jejas ireversibel. Jejas reversibel meliputi (1) Perubahan membran plasma, (2) Perubahan mitokondria, (3) Dilatasi retikulum endoplasma disertai dengan kerusakan ribosom, dan (4) Perubahan nuclear baik glanular maupun fibilar. Namun, cedera yang persisten atau berlebihan akan mengakibatkan sel melewati ambang batas dan akan masuk ke dalam jejas ireversibel. Penanda adanya kerusakan ireversibel adalah adanya disfungsi mitokondria yang tidak teratasi dan terjadi kerusakan membran sel secara masif. Kerusakan membran sel pada umumnya terjadi karena hal-hal sebagai berikut.

- a. Kehilangan progresif fosfolipid membran. Fosfolipid berperan dalam menjaga intak dari membran sel. Fosfolipid dapat menurun karena kurangnya sintesis *de novo* fosfolipid sebagai akibat penurunan ATP dan adanya akumulasi ion kalsium dalam sel sehingga mengaktifkan enzim fosfolipase yang akan mendegradasi fosfolipid dalam membran sel.
- b. Abnormalitas sitoskeleton. Aktivasi enzim protease akan menyebabkan terjadinya degradasi protein dalam sel sehingga fungsi protein sebagai penyokong bentuk sel juga akan menurun.
- c. ROS. Radikal oksigen akan menyebabkan peroksidasi lipid yang akan merusak membran sel.

Pada akhirnya jejas ireversibel akan menyebabkan kematian sel. Kematian atau nekrosis sel memberikan gambaran morfologi sebagai akibat terjadinya disgesti enzimatik sel dan denaturasi protein yang berlangsung bersamaan. Sel yang mati akan lebih eosifilik karena ada peningkatan pengikatan eosin terhadap protein yang mengalami degradasi dan sel yang mati akan memberikan pola perubahan terhadap inti sel. Basofilia kromatin memudar karena aktivitas DNase (kariolisis). Pola kedua adalah piknosis, ditandai dengan melisutnya inti sel, peningkatan basofil, dan DNA berkondensasi menjadi masa yang melisut padat. Karioreksis merupakan pola ketiga dengan fragmen inti sel yang piknotik.

### 2.5.5 Respon Hati terhadap Jejas

Respon hati terhadap jejas secara umum ada lima (Kumar *et al.*, 2007), yaitu sebagai berikut.

#### a. Peradangan

Jejas pada hati dapat mengakibatkan influks sel-sel radang akut dan kronik atau yang disebut dengan hepatitis. Terjadinya inflamasi dapat merupakan onset dari adanya nekrosis, dan sebaliknya inflamasi dapat mengakibatkan nekrosis. Sel limfosit T yang tersensitisasi dapat menyerang hepatosit-hepatosit sehat yang mengakibatkan terjadinya kerusakan hati. Inflamasi dapat terbatas pada daerah masuknya leukosit (traktus portal) atau menyebar ke daerah parenkim.

#### b. Degenerasi

Kerusakan akibat gangguan toksik atau imunologis dapat menyebabkan hepatosit membengkak. Pembengkakan terjadi karena sel tidak mampu mempertahankan homeostasis inik dan cairan. Pembengkakan sel yang terjadi bisa tampak seperti vakuola kecil jernih dalam sitoplasma yang sebenarnya merupakan retikulum endoplasma yang berdistensi (degenerasi hidrofik). Zat yang mungkin menumpuk dalam hepatosit antara lain protein yang akan memberikan gambaran sitoplasma keruh (degenerasi parenkimatosia) dan lemak yang berupa vakuola lipid dengan inti sel tergeser di pinggir (degenerasi lemak).

#### b. Nekrosis

Semua agen penyebab jejas yang signifikan dapat menyebabkan terjadinya nekrosis. Hepatosit yang mengalami nekrosis akibat agen toksik dan reaksi imunologik menunjukkan gambaran hepatosit yang mengkerut, piknosis, dan eosinofilik kuat yang mengandung fragmen-fragmen nukleus. Hepatosit juga dapat mengalami pembengkakan dan ruptur yang disebut nekrosis lisis. Nekrosis sering terjadi di daerah terminal vena hepatis (nekrosis sentrilobular). Mekanisme toksikan tertentu (senyawa radikal bebas) dalam menimbulkan nekrosis sel hati adalah dengan mengikat protein dan lemak tak jenuh pada

membran organel atau membran sel yang menyebabkan peroksidasi lipid dan akhirnya terjadi kerusakan sel.

d. Fibrosis

Jaringan fibrosa terbentuk akibat respon terhadap reaksi inflamasi atau agen toksik. Fibrosis adalah kerusakan ireversibel. Pembentukan jaringan fibrosa ini dapat mengganggu aliran darah dan perfusi hepatosit. Pada stadium awal, fibrosis berkembang di sekitar traktus portal atau vena hepatis, atau terdeposit langsung di dalam ruang perisinusoidal. Untai-untai fibrosa akan membentuk jembatan yang menghubungkan regio hati (porta ke porta, porta ke sentral, dan sentral ke sentral lobulus), proses tersebut disebut *bridging fibrosis*.

e. Sirosis

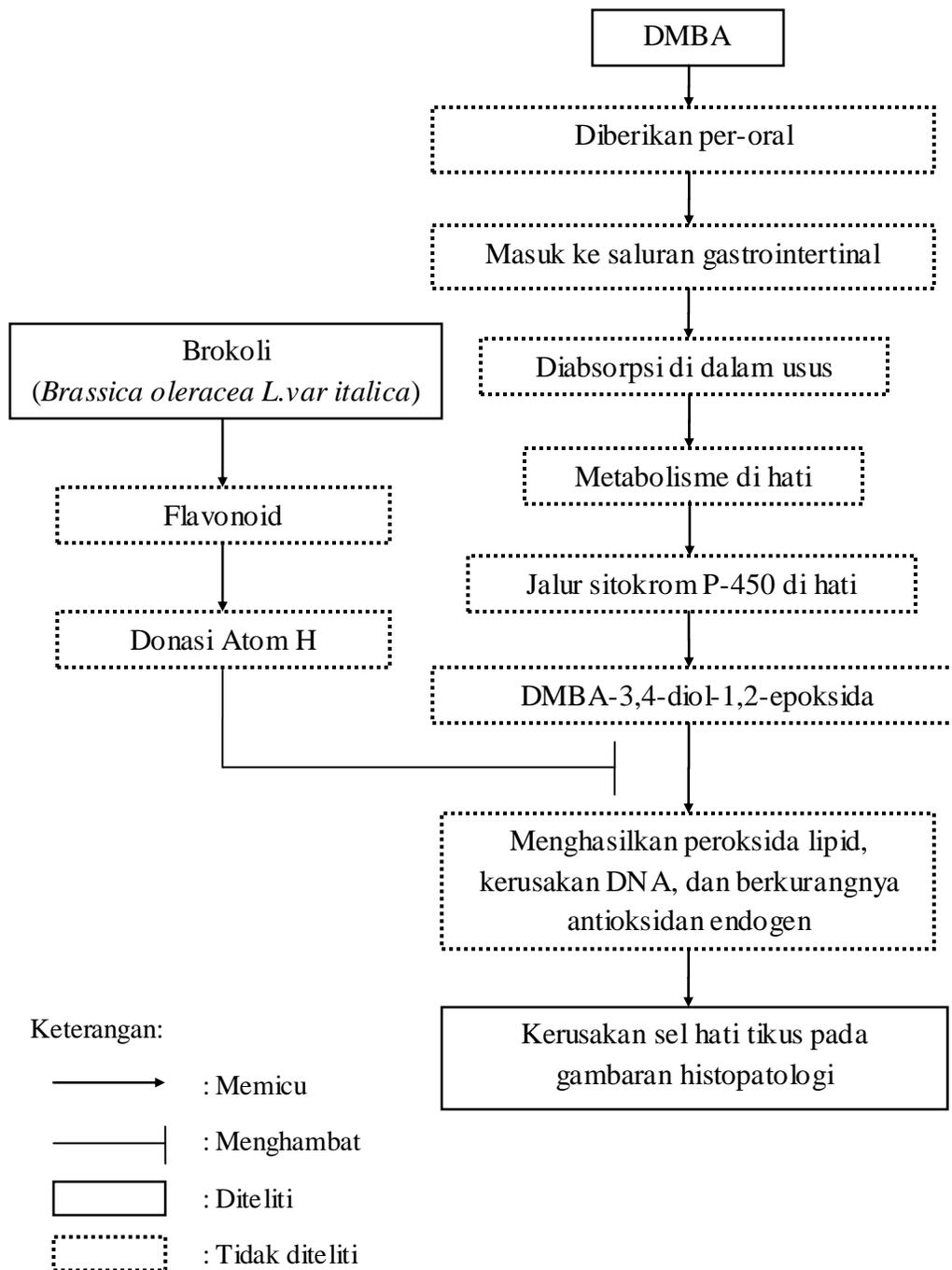
Sirosis merupakan stadium lanjut dari fibrosis dan kerusakan parenkim hati. Pada stadium ini akan terbentuk nodul-nodul yang dikelilingi jaringan parut.

### 2.5.6 Indikator Kerusakan Hati

Sel hati atau hepatosit mengandung berbagai enzim, beberapa diantaranya penting untuk diagnostik kerusakan hati karena enzim tersebut dialirkan ke pembuluh darah. Aktivitasnya dapat diukur sehingga dapat menunjukkan adanya penyakit hati. Enzim hati yang dapat dijadikan pertanda kerusakan hati antara lain aminotransferase (transaminase) dan Alkaline fosfatase (ALP) (Hashem *et al.*, 2013). Golongan enzim aminotransferase adalah *serum alanin amino transferase* (Serum Glutamic Pyruvic Transaminase atau SGPT) dan *serum aspartat amin transferase* (Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase atau SGOT). Enzim-enzim tersebut merupakan indikator yang spesifik untuk menentukan kerusakan sel hati. Alkaline fosfatase (ALP) merupakan kelompok enzim yang bekerja menghidrolisis ester fosfat pada suasana Alkaline. Peningkatan kadar enzim-enzim ini mencerminkan adanya kerusakan sel-sel hati. Selain itu, kerusakan hati dapat dilihat melalui peningkatan kadar MDA sebagai hasil peroksidasi lipid dan penurunan total protein yang menunjukkan adanya penurunan fungsi hati (Dakrory *et al.*, 2015). Secara langsung perubahan struktur

jaringan hati dapat dilakukan dengan cara biopsi. Cara ini merupakan *gold standar* untuk menilai secara pasti kerusakan hati yang terjadi (Lumongga, 2008).

## 2.6 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2.5 Kerangka konsep penelitian

Kerangka konsep penelitian pada Gambar 2.5 menjelaskan bahwa radikal bebas DMBA yang diberikan secara per-oral melalui intragastrik akan masuk ke sistem gastrointerstinal dan akan diabsorpsi di usus, kemudian radikal bebas DMBA dibawa ke organ hati untuk dimetabolisme oleh hati melalui jalur sitokrom P-450. Hasil metabolisme senyawa ini menyebabkan senyawa menjadi lebih reaktif, yaitu DMBA-3,4-diol-1,2-epoksida (DMBA-DE). DMBA-DE dapat menyebabkan peroksidasi lipid, kerusakan DNA, dan mengakibatkan berkurangnya antioksidan endogen. Hasil metabolisme tersebut menyebabkan kerusakan sel hati yang dapat diidentifikasi dengan melihat gambaran sel hati secara mikroskopis. Brokoli (*Brassica oleracea* L.var *italica*) mengandung senyawa flavonoid yang merupakan antioksidan eksogen alami yang dapat menstabilkan kereaktifan radikal bebas dengan memberikan satu atom H kepada radikal bebas sehingga kerusakan sel hati dapat dicegah dan gangguan fungsi hati tidak akan terjadi.

## **2.7 Hipotesis**

Hipotesis pada penelitian ini adalah terdapat perbedaan efek hepatoprotektif ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea* L.var *italica*) terhadap kerusakan histologis sel hati tikus (*Rattus novergicus*) yang diinduksi DMBA.

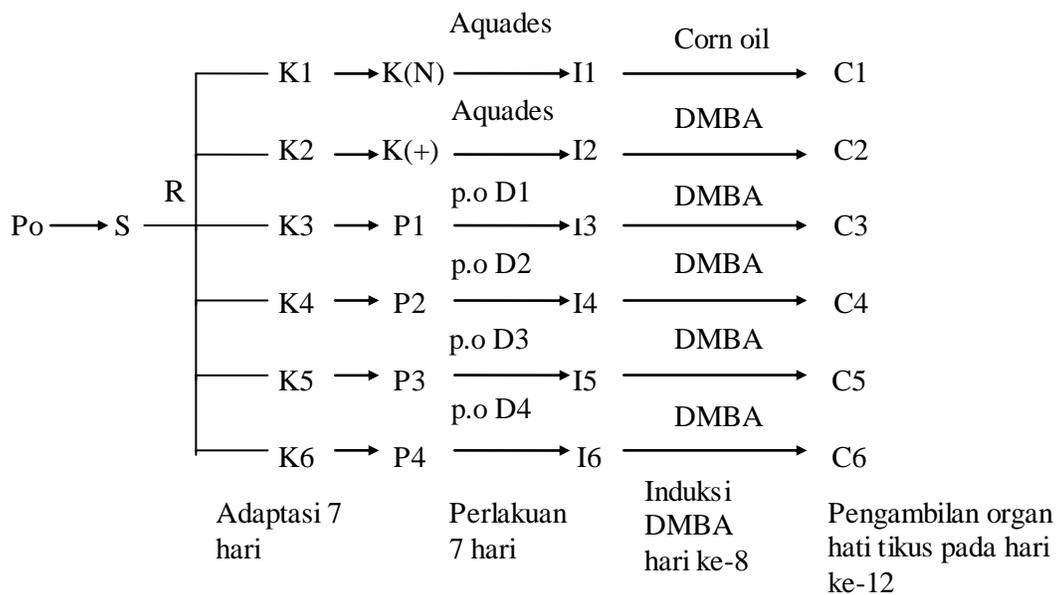
## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan *true experimental* karena dilakukan randomisasi dalam pengelompokan sampel dan peneliti dapat mengontrol semua variable luar yang mempengaruhi jalannya eksperimen. Jenis penelitian *true experimental* yang digunakan adalah *Posttest Only Control Group Design* yang merupakan penelitian eksperimental tanpa adanya pengukuran awal (*pretest*), namun hanya dilakukan pengukuran akhir (*posttest*).

### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1 berikut.



Gambar 3.1 Rancangan penelitian

## Keterangan:

- Po : Populasi dari hewan coba
- S : Sampel dari hewan coba
- R : Proses randomisasi
- p.o : Pemberian per oral
- D1 : Ekstrak etanol brokoli dosis 250 mg/kgBB
- D2 : Ekstrak etanol brokoli dosis 500 mg/kgBB
- D3 : Ekstrak etanol brokoli dosis 1000 mg/kgBB
- D4 : Ekstrak etanol brokoli dosis 2000 mg/kgBB
- K1 : Kelompok normal dengan pemberian aquades
- K2 : Kelompok kontrol positif dengan pemberian aquades dan DMBA
- K3 : Kelompok perlakuan 1 dengan pemberian ekstrak etanol brokoli 250 mg/kgBB dan DMBA
- K4 : Kelompok perlakuan 2 dengan pemberian ekstrak etanol brokoli 500 mg/kgBB dan DMBA
- K5 : Kelompok perlakuan 3 dengan pemberian ekstrak etanol brokoli 1000 mg/kgBB dan DMBA
- K6 : Kelompok perlakuan 4 dengan pemberian ekstrak etanol brokoli 2000 mg/kgBB dan DMBA
- K (N) : Kontrol normal diberikan perlakuan dengan pemberian aquades selama 7 hari
- K (+) : Kontrol positif diberikan perlakuan dengan pemberian aquades selama 7 hari
- P1 : Diberikan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol brokoli 250 mg/kgBB selama 7 hari
- P2 : Diberikan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol brokoli 500 mg/kgBB selama 7 hari
- P3 : Diberikan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol brokoli 1000 mg/kgBB selama 7 hari

- P4 : Diberikan perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol brokoli 2000 mg/kgBB selama 7 hari
- I1 : Induksi kelompok normal tanpa pemberian DMBA pada hari ke-8
- I2 : Induksi kelompok kontrol positif dengan pemberian DMBA pada hari ke-8
- I3 : Induksi kelompok perlakuan 1 dengan pemberian DMBA pada hari ke-8
- I4 : Induksi kelompok perlakuan 2 dengan pemberian DMBA pada hari ke-8
- I5 : Induksi kelompok perlakuan 3 dengan pemberian DMBA pada hari ke-8
- I6 : Induksi kelompok perlakuan 4 dengan pemberian DMBA pada hari ke-8
- C1-5 : Pengambilan organ hati tikus pada hari ke-12 untuk dilakukan pemeriksaan gambaran histopatologi kerusakan sel hati tikus

### **3.3 Populasi dan Sampel**

#### **3.3.1 Populasi**

Populasi pada penelitian ini adalah tikus wistar (*Rattus novergicus*) jantan diperoleh dari peternakan hewan di Malang, Jawa Timur.

#### **3.3.2 Sampel**

Sampel pada penelitian ini diseleksi menurut kriteria inklusi dan eksklusi agar didapatkan sampel yang homogen. Kriteria inklusi sampel penelitian adalah sebagai berikut.

- a. Tikus putih galur wistar (*Rattus novergicus*) jantan.
- b. Tikus galur wistar berbulu putih dan sehat (bergerak aktif).
- c. Umur 2-3 bulan.
- d. Berat 100-200 gram.

Kriteria eksklusi sampel penelitian ini adalah tikus wistar yang sakit dan mati sebelum proses randomisasi.

### 3.3.3 Besar Sampel

Sampel dipilih dengan menggunakan teknik *simple random sampling* yang kemudian dibagi menjadi 6 kelompok. Besar sampel tiap kelompok dalam penelitian ini dapat dihitung menggunakan rumus Federer, yaitu  $(n - 1) (p - 1) \geq 15$ .

Jika  $p = 6$ , maka  $(n - 1) (p - 1) \geq 15$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

n : jumlah sampel,

p : jumlah perlakuan.

Hasil penghitungan dengan rumus diatas didapatkan  $n \geq 4$  sehingga jumlah sampel tiap perlakuan minimal harus 4 ekor tikus wistar. Jadi, dalam penelitian ini jumlah sampel keseluruhan yang digunakan adalah 30 ekor tikus wistar dalam 6 kelompok.

## 3.4 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk perlakuan menyondekan DMBA dan ekstrak brokoli. Pembuatan ekstrak brokoli (*Brassica oleracea* L.var *italica*) dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Sedangkan untuk pemeriksaan gambaran histopatologi kerusakan sel hati tikus dilakukan di Laboratorium Histologi-Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr. Soebandi Jember. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober sampai Desember 2015.

### 3.5 Alat dan Bahan

#### 3.5.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Alat untuk pemeliharaan tikus wistar adalah bak plastik, penutup kawat , botol air minum, tempat makan, label, dan timbangan.
- b. Alat untuk pembuatan ekstrak brokoli adalah *blender*, ayakan 30 mesh, timbangan, pengaduk, labu Erlenmeyer, dan *rotary evaporator*.
- c. Alat untuk menyonde ekstrak brokoli adalah *handscoon*, masker, *beker glass*, pengaduk, dan spuit sonde.
- d. Alat untuk menginduksi DMBA adalah *handscoon*, masker, *beker glass*, pengaduk, dan spuit sonde.
- e. Alat untuk pengambilan organ hati tikus adalah *handscoon*, toples, kapas, papan fiksasi, dan minor set.
- f. Alat untuk pembuatan preparat adalah wadah cetakan, *tissue processor*, *embedding center*, *microtom*, *waterbath*, kaca objek, *deck glass* dan label.
- g. Alat untuk pengamatan hasil preparat hati tikus digunakan mikroskop cahaya Olympus CX 31.

#### 3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini sebagai berikut.

- a. Bahan untuk pemeliharaan mencit adalah makanan standar, minuman, dan sekam.
- b. Bahan untuk pembuatan ekstrak brokoli adalah brokoli segar, air, dan etanol 70%.
- c. Bahan untuk menyonde adalah DMBA, dan ekstrak etanol brokoli.
- d. Bahan untuk mengukur pemeriksaan kerusakan sel hati secara mikroskopis adalah formalin 10%, alkohol untuk dehidrasi, xylene, paraffin, dan pewarna *Hematoxylin Eosin (HE)*.

### **3.6 Variabel Penelitian**

#### 3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak etanol brokoli.

#### 3.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran histopatologi kerusakan sel hati pada tikus wistar.

#### 3.6.3 Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. jenis tikus;
- b. berat badan tikus;
- c. usia tikus;
- d. jenis kelamin tikus;
- e. pemeliharaan tikus;
- f. dosis dan frekuensi pemberian DMBA;
- g. frekuensi pemberian ekstrak etanol brokoli.

### **3.7 Definisi Operasional**

#### 3.7.1 Ekstrak Etanol Brokoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*)

Ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*) adalah hasil dari ekstraksi brokoli dengan metode maserasi yang menggunakan pelarut etanol 70%. Metode maserasi merupakan cara ekstraksi sederhana dengan merendam simplisia dalam cairan penyari (pelarut) sehingga zat aktif yang terkandung dalam tumbuhan akan larut dalam pelarut tersebut hingga didapatkan reaksi keseimbangan. Metode maserasi memiliki kelebihan karena prosesnya yang sederhana dan mudah dilakukan serta terbukti menghasilkan ekstrak yang memiliki kandungan flavonoid lebih tinggi

jika dibandingkan dengan metode refluks yang menggunakan pemanasan pada titik didih pelarutnya (Lutfita, 2012).

### 3.7.2 Dosis Ekstrak Etanol Brokoli

Dosis ekstrak etanol brokoli yang digunakan yaitu 250 mg/Kgbb, 500 mg/Kgbb, 1000 mg/Kgbb, dan 2000 mg/Kgbb tikus. Ekstrak etanol brokoli diberikan setiap hari selama 7 hari secara per oral menggunakan sonde dengan pelarut aquades. Dosis ini merujuk pada hasil penelitian Hashem *et al.* (2013) bahwa pemberian ekstrak etanol brokoli dengan dosis tunggal 1000 mg/Kgbb pada tikus wistar yang diinduksi parasetamol dosis toksik menunjukkan efek hepatoprotektif ditandai dengan penurunan enzim hati (SGOT dan SGPT) yang signifikan, baik protektif maupun kuratif; hasil histopatologi dari penelitian tersebut menyatakan bahwa efek protektif/profilaksis ekstrak brokoli lebih baik dibandingkan dengan efek kuratif.

### 3.7.3 Dosis 7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )anthracene (DMBA)

Dosis DMBA adalah dosis yang digunakan untuk menginduksi tikus yang mampu menimbulkan hepatotoksik pada organ hati tikus. Dosis DMBA pada tikus wistar yang dapat menimbulkan hepatotoksik adalah 15 mg/Kgbb. DMBA diberikan *single dose* pada hari ke-8 per oral dengan alat sonde. Pemberian per oral DMBA harus dilarutkan terlebih dahulu dengan pelarut *corn oil* sebesar 1 ml. Estimasi waktu DMBA mampu sebagai hepatotoksik adalah empat hari sehingga pemeriksaan gambaran histopatologi kerusakan sel hati tikus dilakukan pada hari ke-12 (Dakrory *et al.*, 2015).

### 3.7.4 Gambaran Histopatologi Kerusakan Sel Hati Tikus

Pengamatan gambaran histopatologi sel hati tikus dilakukan secara umum meliputi gambaran degenerasi sel hati, yaitu ada atau tidaknya respon dari sel inflamasi, sitoplasma keruh atau granula meningkat, pembengkakan sel (*blebbing*),

vakuola lemak pada sitoplasma (*microvesicular* atau *macrovesicular*), inti sel terdesak ke tepi, dan ada atau tidaknya tanda kematian sel, yaitu nekrosis (inti piknotik/memadat, karioreksis/fragmentasi inti sel, dan kariolisis/hilangnya inti). Untuk membedakan tingkat keparahan sel hati antara satu tikus dengan tikus lainnya, peneliti mengklasifikasikannya ke dalam enam kategori berdasarkan persentase rata-rata sel hati yang mengalami degenerasi dan nekrosis dalam 15 lapang pandang, yaitu:

- 0 : tidak terjadi kerusakan sel hati dalam 15 lapang pandang;
- 1 : < 25% sel-sel hati mengalami degenerasi dalam 15 lapang pandang;
- 2 : 25%-50% sel-sel hati mengalami degenerasi dalam 15 lapang pandang;
- 3 : >50% sel-sel hati mengalami degenerasi dan atau <25% sel-sel hati mengalami nekrosis dalam 15 lapang pandang;
- 4 : 25%-50% sel-sel hati mengalami nekrosis dalam 15 lapang pandang;
- 5 : > 50% sel-sel hati mengalami nekrosis dalam 15 lapang pandang (Dewi, 2006).

Perbesaran yang digunakan adalah perbesaran 100 kali untuk menentukan persentase rata-rata sel hati yang mengalami degenerasi dan nekrosis, perbesaran 400 kali digunakan untuk mengamati ciri-ciri sel yang mengalami degenerasi dan nekrosis secara lebih dekat. Pengamatan saat penelitian menggunakan mikroskop *Olympus CX 31* oleh ahli patologi anatomi dengan melihat 15 lapang pandang preparat secara zig-zag dimulai dari area yang mengalami kerusakan paling parah. Data hasil pengamatan berdasarkan tingkat keparahan kerusakan sel hati dianalisis secara statistik.

### **3.8 Prosedur Kerja**

#### **3.8.1 Pemilihan Tikus putih galur wistar (*Rattus novergicus*)**

Pemilihan hewan coba yang dijadikan sampel tiap kelompok perlakuan harus sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi dari penelitian ini yaitu tikus galur wistar (*Rattus novergicus*) yang bergerak aktif, berbulu putih, berjenis kelamin jantan,

dengan usia 2-3 bulan, dan berat badan 100-200 gram. Sedangkan kriteria eksklusi hewan coba pada penelitian ini tikus yang sakit dan mati.

### 3.8.2 Persiapan Hewan Coba

Sebelum diberikan perlakuan hewan coba diadaptasikan terlebih dahulu pada kondisi laboratorium selama 7 hari. Proses adaptasi ini bertujuan agar hewan coba tidak stres terhadap lingkungan baru dan diberikan minuman dan makanan standart. Pada tempat tinggal, alas diberi sekam kayu yang diganti tiap dua hari sekali. Lingkungan tempat tinggal dibuat tenang dan terhindar dari sinar matahari langsung.

### 3.8.3 Pembagian Tiap Kelompok

Sampel penelitian dibagi dalam 6 kelompok dengan metode *random sampling*, tiap kelompok terdiri atas 5 ekor tikus sesuai perhitungan dengan rumus Federer. Pembagian kelompok pada penelitian ini dapat dilihat ditabel berikut.

Tabel 3.1 Pembagian kelompok perlakuan

<b>Kelompok Perlakuan</b>	<b>Perlakuan yang diberikan</b>
Kelompok normal	Diberikan aquades
Kelompok kontrol positif	Diberikan aquades dan DMBA pada hari ke-8
Kelompok perlakuan 1	Diberikan ekstrak etanol brokoli dosis 250 mg/Kgbb selama 7 hari dan DMBA pada hari ke-8
Kelompok perlakuan 2	Diberikan ekstrak etanol brokoli dosis 500 mg/Kgbb selama 7 hari dan DMBA pada hari ke-8
Kelompok perlakuan 3	Diberikan ekstrak etanol brokoli dosis 1000 mg/Kgbb selama 7 hari dan DMBA pada hari ke-8
Kelompok perlakuan 4	Diberikan ekstrak etanol brokoli dosis 2000 mg/Kgbb selama 7 hari dan DMBA pada hari ke-8

### 3.8.4 Pembuatan Ekstrak Brokoli (*Brassica oleracea* L. var *italica*)

Brokoli dibersihkan terlebih dahulu setelah itu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan (tidak terkena matahari langsung). Brokoli yang sudah kering dihaluskan dengan *blender* hingga menjadi serbuk. Selanjutnya diayak menggunakan

ayakan 30 mesh agar didapatkan serbuk yang halus dan ditimbang. Sebanyak 250 gram serbuk brokoli yang sudah diayak dimaserasi selama 48 jam dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Selanjutnya ekstrak ditampung di labu Erlenmeyer kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 25-30°C. (Morsy *et al.*, 2010).

### 3.8.5 Perlakuan terhadap Hewan Coba

Sampel hewan coba sebanyak 30 ekor tikus yang dibagi dalam 6 kelompok perlakuan seperti dirancangan penelitian, dilakukan adaptasi terlebih dahulu selama 7 hari dengan tujuan agar tikus mampu menyesuaikan lingkungan yang baru. Setelah adaptasi selama 7 hari dilanjutkan dengan pemberian ekstrak etanol brokoli pada kelompok perlakuan 1, 2, 3, dan 4 dengan dosis 250 mg/Kgbb, 500 mg/Kgbb, 1000 mg/Kgbb, dan 2000 mg/Kgbb selama 7 hari secara per oral (Hashem *et al.*, 2013). Sedangkan untuk kelompok normal dan kontrol positif diberikan aquades selama 7 hari. Pada hari ke-8 dilakukan induksi DMBA dosis 15 mg/Kgbb *single dose* per oral pada semua kelompok kecuali pada kelompok kontrol normal dan pada hari ke-12 dilakukan pengambilan organ hati tikus untuk melihat gambaran histopatologi kerusakan sel hati serta untuk membuktikan efek hepatoprotektif yang dihasilkan oleh ekstrak etanol brokoli dengan membandingkan gambaran mikroskopis sel hati pada kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan 1, 2, 3, dan 4 (Dakrory *et al.*, 2015).

### 3.8.6 Pemeriksaan Gambaran Histopatologi Kerusakan Sel Hati Tikus

Pengamatan gambaran histopatologi sel hati tikus dilakukan secara umum meliputi gambaran degenerasi sel hati, yaitu ada atau tidaknya respon dari sel inflamasi, sitoplasma keruh atau granula meningkat, pembengkakan sel (*blebbing*), vakuola lemak pada sitoplasma (*microvesicular* atau *macrovesicular*), inti sel terdesak ke tepi, dan ada atau tidaknya tanda kematian sel, yaitu nekrosis (inti

piknotik/memadat, karioreksis/fragmentasi inti sel, dan kariolisis/hilangnya inti). Pengamatan dilakukan dengan melihat 15 lapang pandang preparat secara zig-zag. Untuk membedakan tingkat keparahan kerusakan sel hati antara satu tikus dengan tikus lainnya, peneliti mengklasifikasikannya ke dalam enam kategori berdasarkan persentase rata-rata sel hati yang mengalami degenerasi dan nekrosis dalam 15 lapang pandang, yaitu:

- 0 : tidak terjadi kerusakan sel hati dalam 15 lapang pandang;
- 1 : < 25% sel-sel hati mengalami degenerasi dalam 15 lapang pandang;
- 2 : 25%-50% sel-sel hati mengalami degenerasi dalam 15 lapang pandang;
- 3 : >50% sel-sel hati mengalami degenerasi dan atau < 25% sel-sel hati mengalami nekrosis dalam 15 lapang pandang;
- 4 : 25%-50% sel-sel hati mengalami nekrosis dalam 15 lapang pandang;
- 5 : > 50% sel-sel hati mengalami nekrosis dalam 15 lapang pandang (Dewi, 2006).

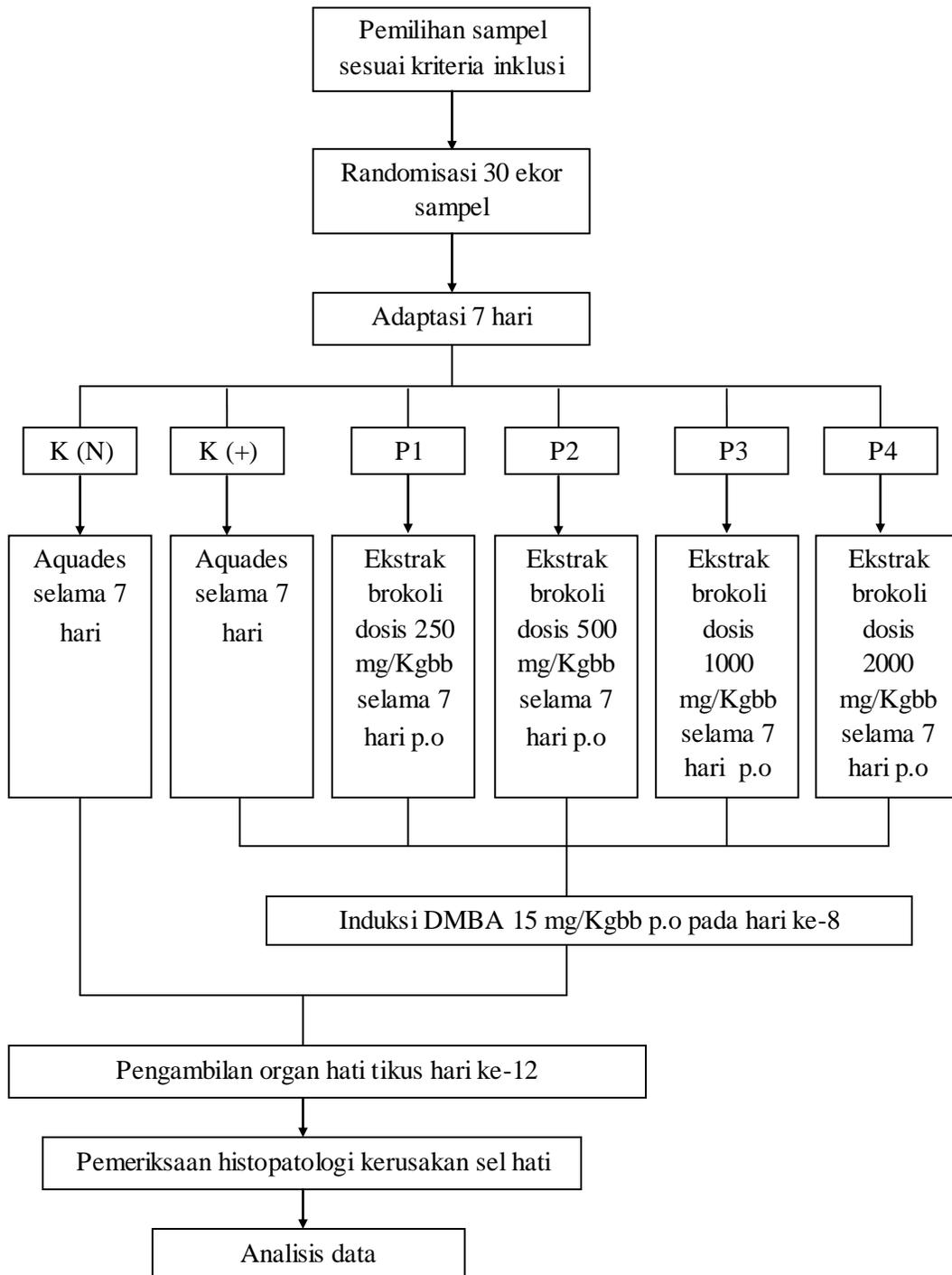
### **3.9 Analisis Data**

Data yang didapat akan dilakukan uji beda dengan uji analisis statistik *Kruskall Wallis*. Jika terdapat perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ), maka dilakukan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

### **3.10 Uji Kelayakan Etik Penelitian**

Penelitian ini sudah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada tanggal 30 Oktober 2015.

### 3.11 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Skema alur perlakuan hewan coba