

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KULIT BATANG
BAKAU MINYAK (*RHIZOPHORA APICULATA*) ETANOL 95 %
TERHADAP HISTOPATOLOGI PANKREAS TIKUS PUTIH JANTAN
GALUR *SPARAGUE DAWLEY* YANG TERPAPAR ASAP ROKOK**

(SKRIPSI)

Oleh
WILLIAM BAHAGIA



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2017**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KULIT BATANG BAKAU
MINYAK (*RHIZOPHORA APICULATA*) ETANOL 95% TERHADAP
HISTOPATOLOGI PANKREAS TIKUS PUTIH JANTAN GALUR
SPRAGUE DAWLEY YANG TERPAPAR ASAP ROKOK**

Oleh
WILLIAM BAHAGIA

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA KEDOKTERAN
pada
Fakultas Kedokteran Universitas Lampung



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

Judul Skripsi : **PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KULIT BATANG BAKAU MINYAK (*RHIZOPHORA APICULATA*) ETANOL 95% TERHADAP HISTOPATOLOGI PANKREAS TIKUS PUTIH JANTAN GALUR *SPRAGUE DAWLEY* YANG TERPAPAR ASAP ROKOK**

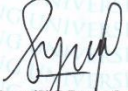
Nama Mahasiswa : William Bahagia


No. Pokok Mahasiswa : 1418011221

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Kedokteran




dr. Syazili Mustofa, S.Ked., M.Biomed
NIP 19830713 200812 1 003


dr. Rasmi Zakiah Oktarlina, S.Ked., M.Farm
NIP 19841020 200912 2 005

MENGETAHUI

Dekan Fakultas Kedokteran

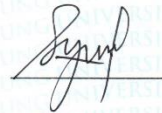


Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M.Kes., Sp.PA
NIP 19701208 200112 1 001

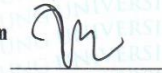
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : dr. Syazili Mustofa, S.Ked., M.Biomed

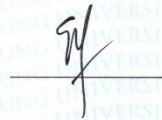


Sekretaris : dr. Rasmi Zakiah Oktarlina, S.Ked., M.Farm



Penguji

Bukan Pembimbing : dr. Evi Kurniawaty, S.Ked., M.Sc



2. Dekan Fakultas Kedokteran



Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M.Kes., Sp.PA
NIP 19701208 200112 1 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 25 Januari 2018

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya bahwa:

1. Skripsi dengan judul "PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KULIT BATANG BAKAU MINYAK (*RHIZOPHORA APICULATA*) ETANOL 95 % TERHADAP HISTOPATOLOGI PANKREAS TIKUS PUTIH JANTAN GALUR *SPARAGUE DAWLEY* YANG TERPAPAR ASAP ROKOK" adalah hasil karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atas karya hasil penelitian orang lain dengan cara tidak sesuai dalam tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarisme.
2. Hak intelektualitas atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

Atas pernyataan ini, apabila dikemudian hari ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, Januari 2018

Pembuat Pernyataan



William Bahagia
NPM 1418011221

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di kota Jakarta, Provinsi DKI Jakarta pada tanggal 14 April 1996 sebagai putra kedua dari dua bersaudara dari pasangan AKBP Elbin Darwin S.H dan Dra. Dahlia Purba.

Penulis mengikuti pendidikan dasar di SDN PUSPIPTEK yang diselesaikan pada tahun 2008, menengah pertama di SMPN 8 Kota Tangerang Selatan yang diselesaikan pada tahun 2011, dan menengah atas di SMAN 2 Kota Tangerang Selatan yang diselesaikan pada tahun 2014.

Pada tahun 2014, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah aktif dalam organisasi Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) Fakultas Kedokteran Universitas Lampung sebagai anggota dan Kepala Biro Kesekretariatan, Informasi dan Komunikasi (KIK) pada tahun 2015-2017.

Skripsi ini saya persembahkan kepada

Tuhan Yesus Kristus

Yang senantiasa menjaga, menguatkan, dan memberi hikmat pengetahuan

Serta kepada

Bapak, Mama dan Abang

Yang senantiasa mendoakan dan mendukung

“Tuhan dekat pada setiap orang yang berseru kepada-Nya,

Pada setiap orang yang berseru kepada-Nya dalam kesetiaan”

Mazmur 145:18

ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KULIT BATANG BAKAU MINYAK (*RHIZOPHORA APICULATA*) ETANOL 95 % TERHADAP HISTOPATOLOGI PANKREAS TIKUS PUTIH JANTAN GALUR *SPARAGUE DAWLEY* YANG TERPAPAR ASAP ROKOK

Oleh

William Bahagia

Latar belakang: Asap rokok merupakan radikal bebas yang mengakibatkan kondisi patologis seperti inflamasi, proteolisis, dan stres oksidatif. Pada penelitian sebelumnya, kulit batang bakau (*Rhizophora apiculata*) berpotensi sebagai antioksidan. Tujuan penelitian ini mengetahui potensi kulit batang bakau (*Rhizophora apiculata*) dalam melindungi kerusakan organ pankreas tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur *Sparague dawley* yang terpapar asap rokok.

Metode penelitian: Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan metode *post test only control group design*. Lokasi penelitian di lingkungan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Sampel pada penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur *Sparague dawley*. Variabel bebas adalah ekstrak kulit batang bakau yang diberikan pada tikus putih. Variabel terikat gambaran histopatologi pankreas tikus putih yang terpapar asap rokok. Pembacaan preparat mengacu pada skor, yaitu skor 0: tidak ada perubahan patologis dan skor 1: ditemukannya sel radang. Uji statistik yang digunakan chi-square dengan alternatif uji fisher.

Hasil penelitian: Rerata sel radang paling tinggi pada kelompok kontrol. Hasil bermakna ($p < 0,05$) terdapat antara kelompok kontrol dan rokok serta kelompok rokok dan bakau+kontrol. Hasil tidak bermakna ($p > 0,05$) terdapat antara kelompok kontrol dan bakau+rokok.

Kesimpulan: Pemberian ekstrak kulit batang bakau (*Rhizophora apiculata*) berpotensi melindungi kerusakan sel pankreas tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sparague dawley* yang terpapar asap rokok.

Kata kunci: anti oksidan, anti inflamasi, asap rokok, bakau minyak,

ABSTRACT

THE EFFECT OF MARINE MANGROVE (*RHIZOPHORA APICULATA*) BARK EXTRACT ETHANOL 95% ON HISTOPATOLOGY PANCREAS OF MALE WHITE RATS *SPARAGUE DAWLEY* STRAIN EXPOSED TO CIGARETTE SMOKE

BY

William Bahagia

Background: Cigarette smoke is free radical that results in pathological conditions such as inflammation, proteolysis, and oxidative stress. In previous studies, marine mangrove (*Rhizophora apiculata*) bark extract has potential effect as antioxidant. The purpose of research is to know the potential of bark extract (*Rhizophora apiculata*) in protecting the damage of pancreas male white rat (*Rattus norvegicus*) *Sparague dawley* strain exposed to cigarette smoke.

Methods: The research design used is experimental research with post test only control group design method. Location of research in the Faculty of Medicine, University of Lampung. The sample in this study was male white rat (*Rattus norvegicus*) *Sparague dawley* strain. Independent variable is marine mangrove bark extract that is given to white mouse. The dependent variable is histopathology microscopic pancreatic white rats exposed to cigarette smoke. Interpretation of preparations is based to the score, score 0: no pathological changes and score 1: discovery of inflammatory cells. The statistical test used by chi-square with fisher test as alternative test.

Results: The highest rate of inflammatory cells in the control group. Significant results ($p < 0.05$) were found between the control and cigarette groups as well as the cigarette and bark extract + control groups. The results were not significant ($p > 0.05$) between the control and the bark extract + cigarette.

Conclusion: The administration of marine mangrove (*Rhizophora apiculata*) bark extract has potential to protect the damage of pancreatic male white rats (*Rattus norvegicus*) *Sparague dawley* strains exposed to cigarette smoke.

Keywords: anti oxidant, anti inflammation, marine mangrove, smoke cigarette

SANWACANA

Puji syukur Penulis ucapkan kehadiran Tuhan Yesus Kristus, karena atas rahmat dan kasih-Nya skripsi ini dapat diselesaikan.

Skripsi ini berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Batang Bakau Minyak (*Rhizophora Apiculata*) Etanol 95 % Terhadap Histopatologi Pankreas Tikus Putih Jantan Galur *Sparague Dawley* Yang Terpapar Asap Rokok” adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran di Universitas Lampung.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Hasriadi Mat Akin, M.P., selaku Rektor Universitas Lampung;
2. Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M.Kes, Sp.PA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung;
3. dr. Syazili Mustofa, M. Biomed, selaku Pembimbing Utama atas kesediaannya untuk memberikan waktu, bimbingan, saran, kritik, nasihat dan dukungan yang bermanfaat dalam proses penyelesaian skripsi ini;
4. dr. Rasmi Zakiah Oktarlina, M.Farm, selaku Pembimbing kedua atas kesediaannya untuk memberikan waktu, bimbingan, saran, kritik, nasihat dan dukungan yang bermanfaat dalam proses penyelesaian skripsi ini;

5. dr. Evi Kurniawaty, M.Sc, selaku Pembahas yang telah bersedia untuk memberikan waktu, bimbingan, saran, kritik, nasihat dan dukungan yang bermanfaat dalam proses penyelesaian skripsi ini;
6. dr. Rika Lisiswanti M.Med Ed, selaku Pembimbing Akademik atas waktu dan bimbingannya, semoga studi yang sedang dikerjakan terus diberikan hikmat dan manfaat;
7. dr. M. Yusran M.Sc Sp.M, selaku Pembimbing Akademik atas waktu dan bimbingannya;
8. Ayahanda, AKBP Elbin Darwin S.H, terima kasih atas doa, kasih sayang, nasihat serta selalu mengingatkanku untuk selalu mengingat bahwa hanya dari Tuhan saja kekuatanku;
9. Ibunda, Dra. Dahlia Purba, terima kasih atas doa, kasih sayang, nasihat serta selalu mengingatkanku untuk selalu mengingat bahwa hanya dari Tuhan saja kekuatanku;
10. Abang kandung, Hanson Putra Pratama Sinaga, yang selalu memberi doa, dukungan, semangat dan kasih sayangnya;
11. Opung serta keluarga besar Sinaga dan Purba, atas perhatian, harapan, motivasi bagi penulis selama ini;
12. Seluruh Staf Dosen FK Unila atas ilmu yang telah diberikan kepada penulis untuk menambah wawasan yang menjadi landasan untuk mencapai cita-cita;
13. Seluruh Staf Tata Usaha, Administrasi, Akademik, pegawai dan karyawan FK Unila;

14. Tim Laboratorium Biokimia, Fisiologi dan Biologi Molekuler Fakultas Universitas Lampung, dr. Syazili Mustofa, M. Biomed, Ibu Soraya Rahmanisa, S. Si., M. Sc., Ibu Nuriah A, Md Ak., dan Mba Yani A, Md., terimakasih atas segala ilmu dan pengalaman yang telah diberikan;
15. Tim Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, dr. Rizki Hanriko, Sp.PA dan Mas Bayu A. Md Ak., S.T., terimakasih atas segala ilmu dan pengalaman yang telah diberikan;
16. Tim penelitian saya (Desti Marini dan Vonisya Putri), terima kasih atas kesabaran, semangat, ketekunan, yang terus berbagi ilmu selama berlangsungnya penelitian dan penyusunan skripsi;
17. Sahabat Pascal (Ignatius dan Enrico), terima kasih atas doa, pengalaman, dan dukungan yang sangat berharga selama ini hingga ke depan;
18. Kelompok Kecil BPJS Bahagia (Bang Edgar, Bang Rian, Yosua dan Harry), terima kasih atas doa, dukungan, motivasi dan nasihat yang sangat berharga selama ini hingga ke depan;
19. Saudara-saudara seiman di Permako Medis, untuk dukungan, doa serta semangat kekeluargaan di dalam Kristus, hanya Kristus yang mampu mempersatukan kita;
20. Tim BEM dari Biro KIK (Ayu, Bella, Vika, Agnes, Isma, Astara, Sidqotie, Fitria, Mira Kurnia, Monalisa Sianturi, Anindita, Ardhya, Samuel, Carlos, Maul, Ghina, Via), yang telah menemani hari-hari saya selama di BEM serta memberikan dukungan dan semangat untuk menyelesaikan penelitian ini.

21. Tim Tetua BEM Aksata (M. Iz Zuddin Adha, Sekar Mentari, Iffat, Eva Aprilia, Monika, Bang Rian, Ayu Indah, Irvan, Maharani, Ayu Lingga, Yosua, Vinnyssa, Sarah, Mba Nurul, Eva Narulita, Sumayyah, Fairuz, dan Helimawati) yang telah menemani hari-hari saya selama di BEM serta memberikan dukungan dan semangat untuk menyelesaikan penelitian ini;
22. Teman-teman sejawat angkatan 2014 (CRAN14L) yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Akhir kata, Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Akan tetapi, semoga skripsi yang sederhana ini dapat bermanfaat dan berguna bagi kita semua. Amin. Terima Kasih

Bandar Lampung, Januari 2018

Penulis

William Bahagia

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|----------------|
| DAFTAR ISI | i |
| DAFTAR GAMBAR | iii |
| DAFTAR TABEL | v |
| BAB I PENDAHULUAN | 6 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 6 |
| 1.2 Perumusan masalah | 9 |
| 1.3 Tujuan penelitian | 9 |
| 1.4 Manfaat penelitian | 10 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 11 |
| 2.1 Asap Rokok..... | 11 |
| 2.2 Pankreas | 16 |
| 2.3 Stres Okidatif | 22 |
| 2.4 Bakau | 33 |
| 2.5 Tikus Putih (Rattus norvegicus) Galur Sprague Dawley | 39 |
| 2.6 Kerangka Pemikiran..... | 41 |
| 2.7 Hipotesis Penelitian | 42 |
| BAB III METODE PENELITIAN | 43 |
| 3.1 Desain Penelitian | 43 |
| 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian | 44 |
| 3.3 Populasi dan Sampel Penelitian | 44 |
| 3.4 Alat dan Bahan Penelitian..... | 48 |
| 3.5 Identifikasi Variabel Penelitian..... | 50 |

| | | |
|-----------------------|--|-----------|
| 3.6 | Prosedur dan Alur Penelitian | 52 |
| 3.7 | Rencana Pengolahan dan Analisis Data | 60 |
| 3.8 | Etik Penelitian | 61 |
| BAB IV | HASIL DAN PEMBAHASAN | 63 |
| 4.1 | Hasil | 63 |
| 4.2 | Pembahasan..... | 71 |
| BAB V | KESIMPULAN DAN SARAN | 63 |
| 5.1 | Kesimpulan | 63 |
| 5.2 | Saran | 63 |
| DAFTAR PUSTAKA | | |
| LAMPIRAN | | |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|--|---------|
| Gambar 1. Rokok dan Asap Rokok Sebagai Radikal Bebas | 15 |
| Gambar 2. Histopatologi Pankreas yang Terpapar Asap Rokok (N: Nekrosis; A:Atrofi; E: Edema)..... | 16 |
| Gambar 3. Bagian Pankreas..... | 17 |
| Gambar 4. Histologi Pankreas | 20 |
| Gambar 5. Histologi Pankreas (Komponen Eksokrin) | 21 |
| Gambar 6. Histologi Pankreas (Komponen Endokrin)..... | 22 |
| Gambar 7. Klasifikasi Prooksidan | 25 |
| Gambar 8. Reaksi Autooksidasi Peroksidasi Lipid | 28 |
| Gambar 9. Mekanisme Antioksidan Primer | 32 |
| Gambar 10. <i>Rhizophora apiculata</i> | 34 |
| Gambar 11. Peta Distribusi Bakau | 34 |
| Gambar 12. Struktur <i>Rhizopora apiculata</i> | 35 |
| Gambar 13. Struktur Kimia Tanin Terkondensasi dan Terhidrolisis | 38 |
| Gambar 14. Tikus <i>Rattus norvegicus</i> Galur Sprague dawley..... | 40 |
| Gambar 15. Kerangka Teori | 41 |
| Gambar 16. Kerangka Konsep | 42 |

| | |
|---|----|
| Gambar 17. Desain Penelitian | 43 |
| Gambar 18. Pemaparan Asap Rokok..... | 54 |
| Gambar 19. Alur Penelitian..... | 59 |

DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|--|-------------------------------------|
| Tabel 1. Nilai IC ₅₀ Antioksidan Pada Ekstrak Bakau..... | 37 |
| Tabel 2. Kelompok Perlakuan. | 47 |
| Tabel 3. Definisi Operasional Variabel..... | 51 |
| Tabel 4. Analisis Histopatologi Mukosa Gaster Tikus..... | Error! Bookmark not defined. |
| Tabel 5. Hasil Uji Nilai Expected | Error! Bookmark not defined. |
| Tabel 6. Uji Chi Square K1 dan K2 | Error! Bookmark not defined. |
| Tabel 7. Uji Chi Square K2 dan K3 | Error! Bookmark not defined. |
| Tabel 8. Uji Chi Square K1 dan K3 | Error! Bookmark not defined. |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rokok adalah salah satu polutan udara. Polutan udara dapat berada di luar ruangan (*outdoors*) dan di dalam ruangan (*indoors*). Polutan udara dapat mengakibatkan kebutuhan udara manusia tidak tercukupi. Kebutuhan udara pada manusia sekitar 10-20 m³ per hari. Salah satu hak asasi manusia yang harus dipenuhi adalah mendapatkan akses bebas terhadap udara yang berkualitas baik. Namun demikian, di beberapa tempat kebutuhan akan udara tidak dapat dipenuhi karena adanya pencemaran udara oleh polutan akibat konsumsi rokok yang semakin meningkat (WHO, 2010).

Pada tahun 2014 diketahui jumlah konsumsi rokok di dunia sekitar 5,8 triliun batang rokok. Sepertiga laki-laki usia 15 tahun atau lebih yaitu sekitar 820 juta orang adalah perokok aktif tapi jumlah tersebut turun 10% sejak 30 tahun terakhir karena mulai dibentuknya program yang membatasi penggunaan tembakau. Sedangkan pada wanita dewasa diketahui jumlah perokok aktif wanita dewasa adalah 176 juta orang. Negara-negara berkembang cenderung memiliki jumlah konsumsi rokok yang tinggi karena hal ini berkaitan dengan status sosial ekonomi yang rendah di negara tersebut (Eriksen, 2014).

Indonesia sebagai negara berkembang merupakan salah satu negara dengan angka perokok aktif yang tinggi di dunia. Walaupun sebagai penghasil tembakau terbesar kelima di dunia., tetapi termasuk ke dalam peringkat ketiga sebagai negara paling konsumtif terhadap rokok. Pada tahun 2008 jumlah konsumsi rokok di Indonesia adalah 225.000.000 miliar batang rokok dengan jumlah batang rokok rata-rata per hari adalah 12 batang. Angka tersebut sangat tinggi meski bahaya akan bahan aktif rokok sudah diketahui (WHO, 2012).

Menurut Geiss and Kotzias (2007) sejak tahun 1950, industri rokok bekerja sama dengan badan kesehatan masyarakat untuk memodifikasi produk rokok dengan mengurangi faktor risiko dan mengetahui bahan aktif yang ada pada asap rokok. Kegiatan tersebut dilatarbelakangi oleh penelitian epidemiologi selama 50 terakhir bahwa ditemukan banyak penyakit yang berhubungan dengan asap rokok, seperti penyakit kanker paru, emfisema, penyakit jantung dan sebagainya. Di tahun 1960-an ditemukan tiga bahan aktif karsinogenik, yaitu benzo[a]pyrene (BaP), polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs), dan tobacco specific nitrosamines (TSNA). Penelitian tersebut berlanjut sampai ditemukannya banyak bahan aktif lain pada rokok yang bersifat toksik dalam tubuh sehingga mengakibatkan kondisi patologis.

Asap rokok dapat memperburuk kondisi patologis antara lain inflamasi, proteolisis, dan stres oksidatif (Daijo *et al.*, 2016). Stres oksidatif adalah proses pergeseran keseimbangan oksidan dan antioksidan yang cenderung kepada oksidan. Stres oksidatif diakibatkan oleh *reactive oxygen species* (ros). Ros merupakan molekul oksigen yang dihasilkan dari metabolisme sel normal dan

jika dalam konsentrasi rendah hingga sedang berfungsi untuk proses fisiologi sel tapi dapat merugikan jika dalam konsentrasi tinggi, sehingga dalam keadaan tubuh fisiologis stres oksidatif dapat dicegah. (Birben *et al.*, 2012).

Tubuh fisiologis manusia telah berkembang untuk mencegah dampak negatif dari stres oksidatif. Beberapa strategi yang dimiliki oleh sel tubuh antara lain mencegah jejas sel, memperbaiki jejas sel (meringankan derajat jejas sel), proteksi terhadap jejas sel dan mekanisme pertahanan antioksidan. Antioksidan berperan sebagai mekanisme pertahanan utama. Pada umumnya kadar antioksidan yang tinggi terdapat pada makanan alami sebagai antioksidan eksogen. Antioksidan eksogen banyak ditemukan pada tumbuhan termasuk di Indonesia (Rahal *et al.*, 2014).

Ekosistem *mangrove* di Indonesia merupakan ekosistem yang terbanyak di dunia dengan jumlah kuantitas area lebih dari 42.550 km² dan jumlah spesies lebih dari 45 spesies. Salah satu penyusun ekosistem *mangrove* yaitu bakau (*Rhizophora sp.*). Spesies bakau yang sering ditemukan antara lain *Rhizophora apiculata*, *Rhizophora mucronata*, dan *Rhizophora mangle*. Sebagian besar bagian dari tumbuhan bakau (*Rhizophora apiculata*) digunakan sebagai obat oleh masyarakat pesisir di Indonesia karena mengandung bahan aktif yang bermanfaat (Purnobasuki, 2001).

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan pengukuran kandungan aktif yang ada pada *Rhizophora apiculata*. Metode analisis yang digunakan *gas chromatography-mass spectrometry* (GC-MS). Hasil penelitian menunjukkan

bahwa bakau memiliki sejumlah antioksidan alami seperti fenolik, alkaloid, glikosida, minyak esensial, dan senyawa organik lainnya (Huda *et al.*, 2013).

Penelitian mengenai pengaruh bakau (*Rhizophora apiculata*) sebagai antioksidan belum banyak dilakukan. Hal tersebut mungkin diakibatkan oleh pandangan masyarakat tentang bakau hanya sebagai tumbuhan penyusun pada ekosistem *mangrove*. Melihat hal tersebut, peneliti ingin melakukan penelitian mengenai ada atau tidaknya efek proteksi bakau (*Rhizophora apiculata*) terhadap histopatologi pankreas tikus putih jantan galur *Sparague dawley* yang terpapar asap rokok.

1.2 Perumusan masalah

Dari uraian latar belakang di atas dengan demikian didapatkan rumusan masalah sebagai berikut:

Apakah ekstrak kulit batang bakau minyak (*Rhizophora apiculata*) memiliki potensi dalam melindungi pankreas tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur *Sparague dawley* yang terpapar asap rokok?

1.3 Tujuan penelitian

Adapun berdasarkan rumusan masalah penelitian maka tujuan dari penelitian sebagai berikut:

Mengetahui potensi ekstrak kulit batang bakau minyak (*Rhizophora apiculata*) dalam melindungi kerusakan organ pankreas tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur *Sparague dawley* yang terpapar asap rokok.

1.4 Manfaat penelitian

1. Bagi masyarakat

Memberikan wawasan dan pengetahuan kepada masyarakat tentang penggunaan antioksidan yang dapat digunakan.

2. Bagi petani

Mengolah bakau minyak (*Rhizophora apiculata*) sebagai sumber daya alam yang dapat dimanfaatkan sebagai produk jual.

3. Bagi institusi (FK Unila)

Memberikan manfaat mengenai kandungan bioaktif pada ekstrak kulit batang bakau.

4. Bagi peneliti

Memberikan landasan pertimbangan untuk penelitian selanjutnya tentang manfaat bakau (*Rhizophora apiculata*).

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Asap Rokok

2.1.1 Profil Perokok di Indonesia

Indonesia pada tahun 2013 merupakan peringkat ketiga dengan jumlah perokok aktif terbesar di dunia setelah Tiongkok dan India. Menurut data riset kesehatan dasar (riskesdas) yang diterbitkan oleh Kementerian Kesehatan (Kemenkes) tahun 2013 menunjukkan jumlah angka perokok aktif di Indonesia cenderung masih tinggi. Perilaku merokok penduduk usia di atas 15 tahun meningkat, yaitu pada tahun 2007 terdapat 34,2 % sedangkan tahun 2013 terdapat 36,3 %. Estimasi angka kematian akibat rokok adalah delapan perokok meninggal akibat perokok aktif dan satu orang meninggal akibat perokok pasif yang terpapar asap rokok orang lain. Jumlah rerata batang yang dihisap per hari sekitar 12,3 batang sehingga mengakibatkan masalah di berbagai aspek (Kementerian Kesehatan RI, 2013).

Merokok menimbulkan banyak masalah di berbagai aspek antara lain kesehatan, sosial, ekonomi dan lingkungan tidak hanya terhadap perokok aktif melainkan orang-orang di sekitarnya (perokok pasif). Kemudian diperkirakan pada tahun 2030 angka kematian perokok di dunia akan

mencapai 10 juta jiwa dan 70% terdapat di negara berkembang. Pada tahun 2013, jumlah perokok usia > 10 tahun di Indonesia 48.400.332 jiwa dan asumsi harga per bungkus rokok senilai Rp 12.500,-. Dengan demikian setiap harinya berdasarkan hasil perhitungan oleh Kemenkes RI diketahui biaya yang dihabiskan oleh penduduk Indonesia usia > 10 tahun mencapai Rp 605.004.150.000,- (Kementrian Kesehatan RI 2013).

2.1.2 Pengaruh Asap Rokok terhadap Tubuh

Asap rokok mengandung lebih dari 7.000 jenis senyawa kimia yang mampu merusak jaringan tubuh. Senyawa kimia yang memiliki sifat toksik berjumlah ratusan dan tujuh puluh diantaranya karsinogenik. Paparan asap rokok yang dihisap akan segera masuk ke dalam paru-paru. Asap tersebut selanjutnya berdifusi ke dalam vena pulmonaris dan akhirnya ke sirkulasi sistemik sehingga setiap jaringan tubuh terpapar oleh senyawa kimia berbahaya yang sama (Benjamin, 2010).

Asap rokok mengandung tiga senyawa kima utama antara lain tar, nikotin dan karbon monoksida. Tar (NFDPM = *Nicotine Free Dry Particulate Matter*) adalah campuran senyawa hidrokarbon atau keseluruhan partikel padat atau cair pada gas yang dihasilkan rokok tanpa air dan nikotin. Tar memiliki pengaruh yang berhubungan dengan risiko kanker paru. Nikotin adalah senyawa alami yang terkandung di dalam tembakau dan ditemukan pada asap utama sedangkan pada asap samping mengalami dilusi. Nikotin termasuk ke dalam golongan alkaloid seperti kafein pada

kopi atau theobromin pada biji coklat yang dapat mempengaruhi sistem saraf sehingga nikotin berperan sebagai faktor adiktif bagi perokok aktif. Karbon monoksida (CO) adalah asap sisa hasil pembakaran dari suatu material (kayu, batu bara dan sebagainya). Pengaruh karbon monoksida terhadap tubuh berhubungan dengan risiko penyakit kardiovaskular akibat dari afinitas yang tinggi terhadap hemoglobin dibanding dengan oksigen sehingga terbentuk karboksihemoglobin (COHb) oleh asap rokok (Geiss & Kotzias, 2007).

Asap yang dihembuskan dari asap rokok dibedakan menjadi dua yaitu asap utama dan asap samping. Asap utama adalah bagian asap tembakau yang langsung dihisap oleh perokok (perokok aktif). Asap samping adalah bagian dari asap tembakau yang disebarkan ke ruang bebas dan dapat dihirup orang lain di sekitarnya (perokok pasif). Asap samping memiliki kandungan toksik yang lebih tinggi dibanding dengan asap utama (Nururrahmah, 2014).

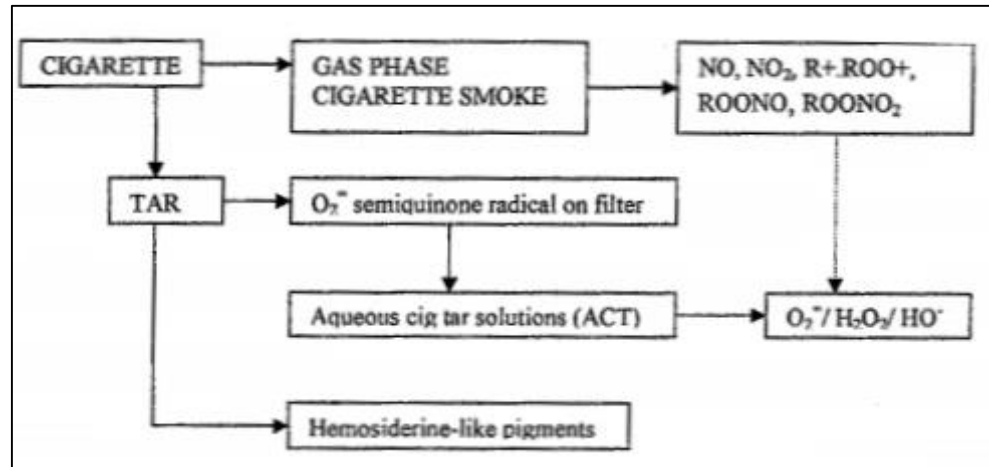
2.1.3 Pengaruh Paparan Asap Rokok terhadap Pankreas

Asap rokok mengandung banyak metabolit yang meliputi gas, senyawa kimia volatil dan partikel padat ukuran sub mikro. Contoh senyawa gas pada asap rokok, yaitu karbon monoksida (CO), asam sianida (HCN), dan nitrogen monoksida (NO). Contoh senyawa kimia volatil yang berasal dari uap cair asap rokok, yaitu formaldehid, akrolein, benzena dan nitrosamin tertentu. Contoh partikel padat ukuran sub mikro, yaitu

nikotin, fenol, poliaromatik hidrokarbon (PAH) dan tembakau nitrosamin spesifik seperti N0-nitrosornikotin (NNN) and 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNK). Rokok memiliki metabolit utama yang menyebabkan perubahan struktur dan fungsi pankreas yaitu nikotin (Barreto, 2015).

Nikotin adalah salah toksin utama yang terdapat pada rokok. Nikotin mampu diabsorpsi oleh paru-paru dengan cepat dan membutuhkan waktu 120-180 menit untuk mengeliminasinya. Tempat metabolisme utama nikotin terdapat di sitokrom P450 (CYP) 2A6 dengan tempat metabolisme lain seperti aldehyd oksidase 1, UDP-glukuronosiltransferases, flavin-monooksigenase 3 dan CYP lain seperti 2A13. Nikotin dapat mengakibatkan risiko pankreatitis dan kanker pankreas akibat proses stres oksidatif (Edderkaoui *et al.*, 2015).

Stres oksidatif dapat diakibatkan juga oleh tar pada asap rokok. Kandungan tar pada rokok diperkirakan 10^{18} spins/gram melalui metode *electron spin resonance*. Saat proses pembakaran, tar berperan sebagai kondensat asap dan total residu. Tar masuk ke dalam paru-paru sebagai uap padat, namun saat suhu menurun akan terbentuk endapan berwarna coklat pada permukaan gigi, saluran pernapasan dan paru-paru. Jenis *reactive oxygen species* pada tar yaitu semikuinon yang dapat mereduksi oksigen (O_2) menjadi anion superoksida (O_2^-) yang dapat menimbulkan kerusakan pada jaringan pankreas (Geiss & Kotzias, 2007).

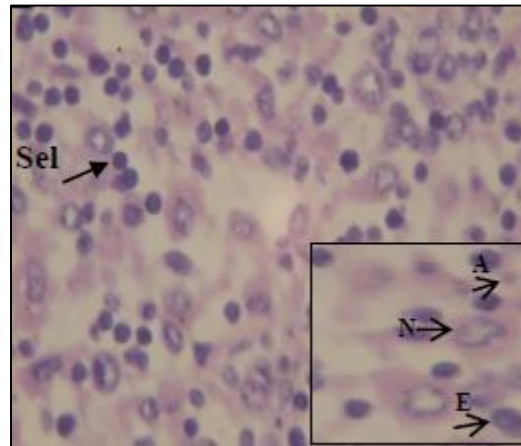


Gambar 1. Rokok dan Asap Rokok Sebagai Radikal Bebas (Sumber: Repine *et al.*, 1997).

Pankreatitis merupakan keadaan patologis yang disebabkan oleh multifaktorial, salah satunya adalah rokok. Sebuah penelitian kohort retrospektif menunjukkan bahwa terjadi perpindahan usia rata-rata diagnosis pankreatitis akut. Diagnosis pankreatitis pada perokok tegak lima tahun lebih awal dibandingkan dengan bukan perokok. Suatu pengukuran konsumsi rokok dengan *pack years*, yaitu jumlah batang rokok dikali tahun dibagi 20 (20 batang/bungkus). Perokok dengan *pack years* < 12 memiliki risiko relatif (*odds ratio*) 1,35. Sedangkan pada *pack years* 12-35 dan > 35 masing-masing memiliki risiko relatif yaitu 2,15 dan 4,59 (Edderkaoui & Thrower, 2015).

Paparan asap rokok dapat mengakibatkan fibrosis pankreas. Sel stellata pankreas memiliki peran utama pada fibrosis pankreas yang diakibatkan stres oksidatif oleh paparan asap rokok. Stres oksidatif yang diakibatkan paparan asap rokok diketahui melalui perbandingan aktivitas sitokin pro inflamasi serta antioksidan pada cairan dan jaringan pankreas. Pada perokok memiliki aktivitas proinflamasi *inteleukin-6* (IL-6) dan

antioksidan (metallothionein, glutation peroksidase, dan superoksida dismutase) yang meningkat dibandingkan dengan bukan perokok (Edderkaoui *et al.*, 2015).



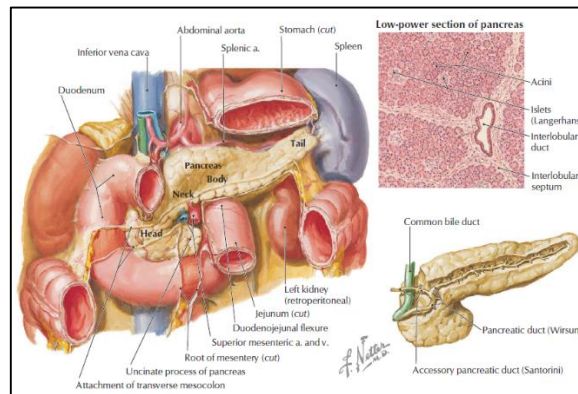
Gambar 2. Histopatologi Pankreas yang Terpapar Asap Rokok (N: Nekrosis; A:Atrofi; E: Edema) (Sumber: Latumahina *et al.*, 2011).

2.2 Pankreas

2.2.2 Anatomi dan Fisiologi Pankreas

Pankreas adalah suatu kelenjar pencernaan tambahan, panjang 12-15 cm dan tebal 2,5 cm. Pankreas termasuk sebagai organ retroperiotoneal yang terletak menyilang di dinding abdomen posterior, di sebelah posterior lambung di antara duodenum di kanan dan lien di kiri. Menurut tujuan deskriptif, organ pankreas dapat dibagi menjadi empat bagian, yaitu *caput pancreatis*, *collum pancreatis*, *corpus pancreatis* dan *cauda pancreatis*. Pada bagian inferior *caput pancreatis* terdapat suatu proyeksi yang memanjang ke medial ke kiri, dan di bawah arteri mesentrica superior. Sebagai kelenjar pencernaan, pankreas memiliki dua duktus fungsional yaitu duktus pankreatikus (duktus santorini) dan duktus

pancreaticus aksesorius (duktus wirsung) yang dapat menyekresikan enzim pencernaan ke dalam duodenum. (Moore, 2013; Derrickson, 2009).



Gambar 3. Bagian Pankreas (Sumber: Hansen 2010).

Kelenjar pankreas dibedakan menjadi dua jenis antara lain kelenjar endokrin dan eksokrin. Kelenjar eksokrin menghasilkan getah pankreas yang terdiri dari dua komponen yaitu enzim pankreas yang disekresikan oleh sel asinus dan larutan basa yang banyak mengandung natrium bikarbonat (NaHCO_3) disekresikan oleh sel duktus pankreas (sel sentroasinar). Enzim pankreas memiliki tiga kategori enzim yang mampu mencerna sesuai dengan kategorinya masing-masing yaitu proteolitik, amilase pankreas dan lipase pankreas. Sedangkan kelenjar endokrin oleh sel pulau (*islets*) Langerhans menyekresikan empat jenis hormon, yaitu glukagon oleh tipe sel alpha, insulin oleh tipe sel beta, somatostatin oleh tipe sel delta dan polipeptida pankreas oleh tipe sel PP (Sherwood, 2009).

Enzim pankreas dan larutan cair basa yang disekresikan ke duodenum melalui papila duodeni mayor (papila vateri) atau minor memiliki berbagai fungsi masing-masing. Enzim proteolitik untuk mencerna

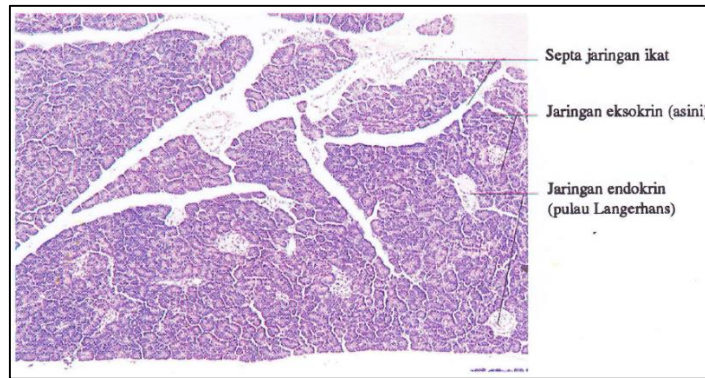
protein terdiri dari tripsin, kimotripsin dan karboksipolipeptidase, tetapi ketiga enzim ini tidak dalam keadaan aktif sampai disekresikan ke dalam saluran pencernaan. Diawali oleh tripsin berasal dari tripsinogen diaktifkan oleh enterokinase (asetilkolin dan koleosistikinin) merupakan enzim yang dihasilkan duodenum, diikuti oleh aktivasi kimotripsinogen dan prokarboksipolipeptidase melalui enzim tripsin. Enzim amilase pankreas untuk mencerna karbohidrat dengan menghidrolisis pati, glikogen, dan sebagian besar karbohidrat lain (kecuali selulosa) untuk membentuk sebagian besar disakarida dan beberapa trisakarida. Enzim lipase pankreas sebagai enzim utama untuk mencerna lemak mampu menghidrolisis lemak netral menjadi asam lemak dan monogliserida sedangkan sebagai enzim tambahan kolesterol esterase untuk hidrolisis ester kolesterol dan fosfolipase untuk memecah fosfolipid menjadi asam lemak. Jika dirangsang untuk menyekresikan banyak getah pankreas maka konsentrasi larutan cair basa berupa ion bikarbonat dapat mencapai 145 meqL sehingga berfungsi untuk menetralkan asam hidroklorida (HCl) yang dikeluarkan lambung menuju duodenum (Guyton, 2008).

Pulau-pulau pankreas (pulau Langerhans) merupakan massa sferis padat jaringan endokrin yang berada di sekitar kelenjar eksokrin asinar pankreas. Setiap pulau langerhans mengandung ratusan sel, tetapi sebagian memiliki jumlah yang lebih sedikit. Aktivitas kedua sel pulau Langerhans utama, sel alpha dan beta diatur terutama oleh kadar glukosa darah. Kedua sel ini bekerja dengan menghasilkan hormon yang berfungsi secara berlawanan. Peningkatan kadar glukosa merangsang sel

beta melepaskan insulin dan menghambat sel alpha melepaskan glukagon serta terjadi sebaliknya jika terjadi penurunan kadar glukosa merangsang sel alpha melepaskan glukagon. Hormon somatostatin atau dikenal dengan *growth hormone-inhibiting hormone* (GHIH) yang dihasilkan salah satunya oleh sel delta pankreas berfungsi menghambat pencernaan nutrisi dan mengurangi penyerapannya agar kadar nutrisi plasma tidak berlebihan. Pada hipotalamus hormon ini berfungsi menghambat sekresi *growth hormone* (GH) dan *thyroid stimulating hormone* (TSH). Sel PP merupakan sel paling jarang pada pankreas yang mengeluarkan polipeptida pankreas yang berperan mengurangi nafsu makan dan menghambat pembentukan enzim pankreas (Mescher, 2014; Sherwood, 2009; Oktarlina *et al.*, 2017).

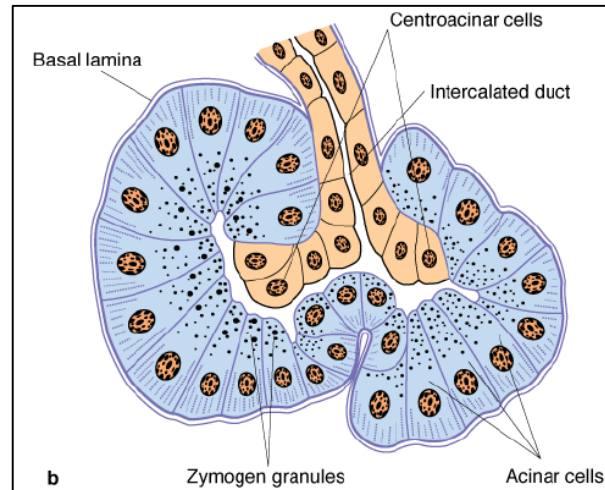
2.2.3 Histologi Pankreas

Pankreas terdiri dari dua komponen yaitu eksokrin dan endokrin. Komponen eksokrin membentuk sebagian besar pankreas yang terdiri dari asini serosa dan sel zimogenik. Komponen tersebut tersusun secara rapat dan membentuk banyak lobulus kecil yang dikelilingi oleh septum jaringan ikat intralobularis dan interlobularis. Lobulus mengandung pembuluh darah, duktus interlobularis, saraf, dan reseptor sensorik (*corpusculum lamellosum/pacinian corpuscle*). Komponen endokrin berupa *insula pancreatica* (pulau Langerhans) berada diantara asini serosa (Eroschenko, 2013).



Gambar 4. Histologi Pankreas (Sumber: Gartner & Hiatt, 2012).

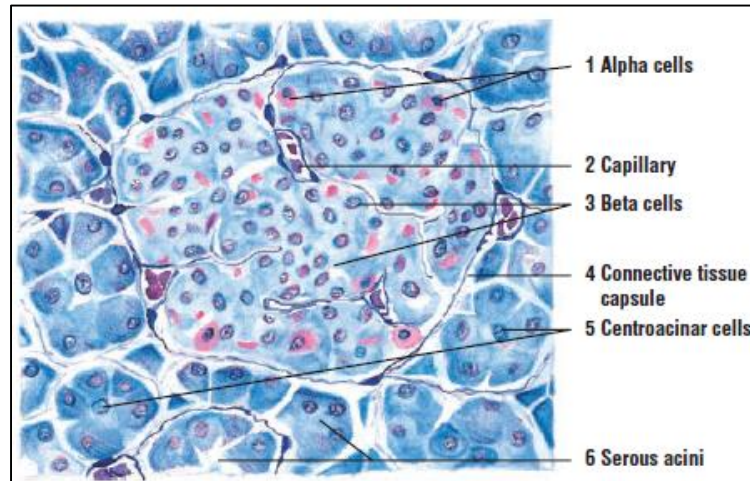
Komponen eksokrin asini serosa terdiri atas beberapa sel serosa yang mengelilingi lumen. Sel-sel asinar memiliki polaritas dengan inti sferis dan menghasilkan protein-protein yang khas (enzim digestif) melalui sel zimogen yang melepaskan granulnya. Sel sentroasinar kecil sebagai penghasil larutan cair basa tampak terpulas pucat membentuk bagian intra asinar di duktus interkalaris (intralobularis). Sel asinar dan sel sentroasinar melepaskan produk sekretoriknya melalui duktus interkalaris yang mempunyai lumen kecil yang dilapisi oleh epitel selapis kuboid rendah. Duktus interkalaris selanjutnya mengalirkan ke dalam duktus interlobularis yang dilapisi oleh epitel selapis kuboid lebih tinggi dan bertingkat di duktus yang lebih besar (Eroschenko, 2013).



Gambar 5. Histologi Pankreas (Komponen Eksokrin) (Sumber: Mescher, 2014).

Komponen endokrin pankreas berupa pulau Langerhans memiliki diameter 100-200 μm dan mengandung beberapa ratusan sel, tetapi sebagian lebih kecil dengan sedikit sel. Pada manusia terdapat satu juta pulau Langerhans dan mayoritas berada di kauda pankreas. Pada pankreas komponen endokrin dan eksokrin dipisahkan oleh serat simpai retikular yang sangat tipis dengan mengelilingi setiap pulau Langerhans sehingga memisahkannya dari jaringan asinar yang berdekatan. Karakteristik pulau Langerhans antara lain memiliki bentuk bulat atau poligonal pucat, lebih kecil dan pucat dibandingkan sel asinar di sekitarnya serta tersusun berderet yang dipisahkan oleh kapiler. Pulasan rutin atau pulasan trikrom menggambarkan bahwa mayoritas pulau Langerhans memiliki sifat asidofilik atau basofilik dengan granula sitoplasma halus. Serabut saraf autonom berhubungan dengan sejumlah sel endokrin dan pembuluh darah pankreas. Ujung saraf simpatis dan parasimpatis melalui taut celah berhubungan erat sekitar 10% dengan sel alpha, beta, delta dan PP terutama berkaitan dengan sekresi insulin dan

glukagon. Serabut saraf simpatis berperan meningkatkan pelepasan glukagon dan menghambat pelepasan insulin, serta serabut parasimpatis berperan meningkatkan sekresi glukagon dan insulin (Mescher, 2014).



Gambar 6. Histologi Pankreas (Komponen Endokrin) (Sumber: Eroschenko, 2013).

2.3 Stres Okidatif

2.3.1 Definisi

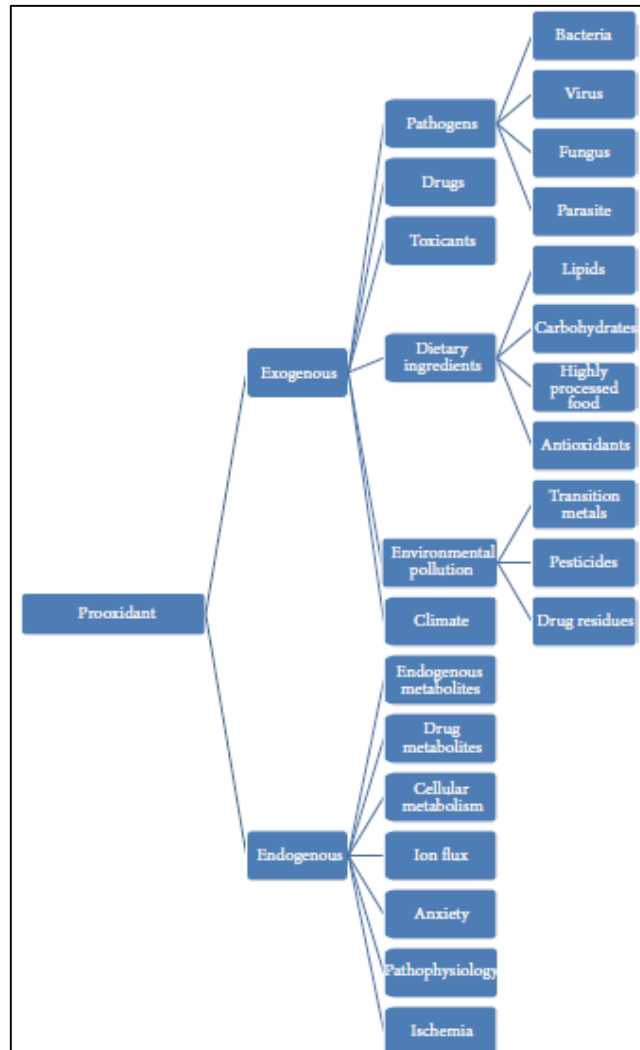
Stres oksidatif adalah keadaan ketidakseimbangan pada sistem prooksidan dan antioksidan dengan cenderung pada prooksidan. Istilah stres pertama kali diperkenalkan oleh hukum Hooke tahun 1958. Akan tetapi digunakan pertama kali dalam tulisan ilmu biologi pada tahun 1936 oleh Sir Hans Selye. Dewasa ini stres dikenal sebagai perubahan keadaan homeostasis biokimia tubuh yang dipengaruhi faktor psikologis, fisiologis dan *stressor* lingkungan. Namun istilah stres sering sulit dibedakan dengan distress. Distress memiliki makna berbeda dengan stres, yaitu keadaan makhluk hidup yang tidak mampu beradaptasi terhadap *stressor* internal maupun eksternal, sedangkan stres merupakan

reaksi fisiologi yang menyebabkan respon adaptasi dan istilah stres lebih umum berhubungan dengan stres oksidatif. Stres oksidatif berperan banyak dalam kondisi patologis antara lain kanker, gangguan neural, aterosklerosis, hipertensi dan sebagainya (Birben *et al.*, 2012; Rahal *et al.*, 2014; Kurniawaty & Lestari, 2012).

2.3.2 Prooksidan

Prooksidan dikenal sebagai endobiotik atau xenobiotik merupakan faktor yang mengakibatkan stres oksidatif. Stres oksidatif akibat prooksidan terjadi melalui pembentukan *reactive oxygen species* (ros) atau menghambat sistem antioksidan. Ros dihasilkan oleh metabolisme seluler normal, 1-3 % oksigen dari paru-paru dikonversi menjadi *ros*. Ros diklasifikasikan menjadi dua subgrup yaitu radikal bebas dan non-radikal. Radikal bebas adalah spesies kimiawi dengan satu elektron tak berpasangan di orbital terluar. Contoh radikal bebas yaitu radikal superoksida (O_2^-), nitrogen dioksida (NO), radikal hidroksil (-OH), radikal peroksil (ROO-) dan peroksi radikal (HOO^-). Ros non-radikal adalah hasil dari pembentukan dua radikal bebas yang berpasangan. Contoh ros non-radikal yaitu hidrogen peroksida (H_2O_2) dan asam hipoklorit (HClO). Dari sekian banyak jenis ros diketahui ada tiga yang mempunyai pengaruh signifikan fisiologis antara lain superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (-OH) dan hidrogen peroksida (H_2O_2) (Birben *et al.*, 2012).

Prooksidan dibedakan menjadi prooksidan endogen dan prooksidan eksogen. Pada kondisi metabolisme normal pembentukan ros sebagai prooksidan endogen penting pada fungsi fisiologis. Ros digunakan tubuh untuk pembentukan *adenosine triphosphate* (ATP), proses katabolisme-anabolisme dan siklus reduksi-oksidasi (redoks) selular. Prooksidan eksogen memiliki sumber yang banyak dan bervariasi antara lain asap rokok, paparan ozon, hiperoksia, paparan radiasi dan logam berat. Sebagai contoh asap rokok banyak mengandung radikal bebas dan senyawa organik berbahaya seperti supesroksida dan nitrogen dioksida. Di sisi lain asap rokok juga mampu mengaktivasi beberapa sistem endogen sehingga terjadi akumulasi sel neutrofil dan makrofag yang mengakibatkan peningkatan derajat keparahan stres oksidatif (Contran *et al.*, 2007; Birben *et al.*, 2012; Rahal *et al.*, 2014).



Gambar 7. Klasifikasi Prooksidan (Sumber: Rahal *et al.*, 2014).

Radikal bebas dapat mengakibatkan stres oksidatif pada lipid, asam nukleat dan protein. Hal ini dapat terjadi apabila dikandung dalam jumlah banyak dan melebihi kemampuan detoksifikasi. Proses kerusakan protein akibat radikal bebas menimbulkan ikatan silang protein yang diperantarai oleh sulfhidril, sehingga terjadi peningkatan kecepatan degradasi, atau hilangnya aktivitas enzimatis. Radikal bebas juga dapat secara langsung mengakibatkan fragmentasi polipeptida. Proses kerusakan DNA akibat radikal bebas merupakan proses berantai, yaitu apabila terdapat delesi pada struktur DNA lalu tidak dapat diperbaiki dan terjadi sebelum

replikasi akan mengakibatkan mutasi DNA. Jika kerusakan tidak dapat diperbaiki akan terjadi kerusakan sel berupa apoptosis (kematian sel terprogram) atau nekrosis yang tergantung dari derajat kerusakannya. Kerusakan protein dan asam nukleat akibat radikal bebas jarang terjadi disebabkan oleh komponen ini lebih resisten dibandingkan *poly unsaturated fatty acid* (PUFA). Kerusakan dapat terjadi apabila serangan radikal bebas sangat ekstensif, mampu berakumulasi dan terfokus pada daerah sel tertentu (Contran *et al.*, 2007; Sayuti & Yenrina, 2015; Mustofa, 2013).

Radikal bebas dapat mengikat membran sel yang memiliki banyak kandungan *poly unsaturated fatty acid* (PUFA), proses ini dikenal dengan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid terjadi melalui reaksi enzimatik maupun non enzimatik melibatkan *reactive oxygen species*. Terdapat tiga mekanisme berbeda yang dapat menimbulkan peroksidasi lipid, antara lain:

1. Autooksidasi atau oksidasi enzimatik termediasi radikal bebas.

Terjadi melalui mekanisme berantai, yaitu satu radikal bebas yang memulai dapat mengoksidasi banyak molekul lipid

2. Foto oksidasi atau oksidasi non enzimatik tidak termediasi radikal bebas.

Terjadi melalui mekanisme karena adanya oksigen tunggal dan ozon yang memfasilitasi pancaran energi seperti ultraviolet, dan menghasilkan perubahan yang umumnya berupa pemisahan atau pengurangan berat molekul.

3. Oksidasi enzimatik

Terjadi melalui mekanisme yang melibatkan enzim sebagai katalis dan menghasilkan produk stereo- dan regio-spesifik. Ada tiga enzim utama yang berperan yaitu lipooksigenase (LOX), siklooksigenase (SOX) dan sitokrom P450.

Autooksidasi atau oksidasi termediasi radikal bebas terdiri dari tiga tahapan, yaitu:

a. Tahap inisiasi

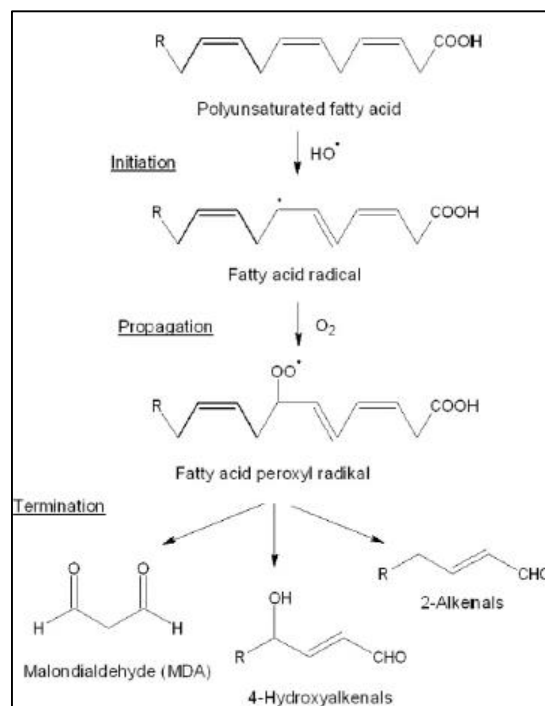
Pembentukan radikal substrat, yaitu turunan substrat yang bersifat tidak stabil dan sangat reaktif akibat hilangnya satu atom H. Serangan radikal bebas umumnya *reactive oxygen species* (OH) terhadap partikel lipid kemudian menghasilkan air (H₂O) dan asam lemak radikal.

b. Tahap propagasi

Radikal substrat akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi. Asam lemak radikal yang dihasilkan dari proses inisiasi bersifat sangat tidak stabil dan mudah bereaksi dengan oksigen, sehingga menghasilkan suatu peroksi radikal asam lemak. Senyawa ini juga bersifat tidak stabil dan kemudian bereaksi dengan asam lemak bebas lainnya untuk menghasilkan asam lemak radikal yang baru dan dapat menghasilkan peroksida lipid atau peroksida siklik bila bereaksi dengan dirinya sendiri. Proses ini akan terus berlanjut hingga terjadi proses terminasi.

c. Tahap terminasi

Reaksi radikal akan berhenti bila bereaksi dengan radikal lain atau dengan penangkap radikal, sehingga potensi propagasinya rendah. Reaksi radikal dengan radikal lain akan mengakibatkan terminasi hanya dapat terjadi bila konsentrasi *reactive oxygen species* sudah sedemikian tingginya sehingga memungkinkan dua spesies radikal untuk bereaksi (Abdullah, 2011; Kusuma, 2010).



Gambar 8. Reaksi Autooksidasi Peroksidasi Lipid (Sumber: Mimica *et al.*, 2012).

2.3.4 Antioksidan

2.3.4.1 Definisi

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat mendonorkan satu elektronnya sebagai upaya pertahanan terhadap dampak negatif stres oksidatif akibat radikal bebas. Antioksidan dapat diklasifikasikan dalam beberapa bentuk yaitu endogen-eksogen, enzimatis-non enzimatis, fungsi dan mekanisme kerja serta alami-sintetik. Dalam bidang kesehatan antioksidan telah banyak digunakan dalam pencegahan kanker dan tumor, aterosklerosis, anti penuaan dan sebagainya.

Tubuh memiliki mekanisme fisiologis untuk mencegah kerusakan sel yang diakibatkan oleh prooksidan, antara lain dengan memperbaiki mekanisme untuk meringankan kerusakan sel akibat stres oksidatif, mekanisme proteksi fisik dari kerusakan sel dan mekanisme pertahanan antioksidan. Antioksidan merupakan pertahanan utama terhadap stres oksidatif yang berhubungan dengan radikal bebas (Sayuti & Yenrina, 2015).

2.3.4.2 Antioksidan Endogen dan Eksogen

Antioksidan yang diproduksi oleh tubuh secara alami digolongkan sebagai antioksidan endogen. Tetapi kemampuan tubuh memiliki keterbatasan untuk memproduksinya seperti faktor usia, status imun dan sebagainya. Akibatnya jika radikal

bebas berlebih dalam tubuh atau melebihi kemampuan proteksi antioksidan dibutuhkan antioksidan tambahan yang umumnya ditemukan pada pangan dan dikenal dengan antioksidan eksogen (Rahal *et al.*, 2014; Sayuti & Yenrina, 2015).

2.3.4.3 Antioksidan Enzimatis dan Non enzimatis

Antioksidan dapat dibedakan menjadi dua berdasarkan sifat enzimatisnya yaitu antioksidan enzimatis dan antioksidan non enzimatis. Contoh antioksidan enzimatis yang sebagian besar diproduksi oleh tubuh antara lain enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase. Sedangkan contoh antioksidan non enzimatis dikelompokkan menjadi dua berdasarkan sifat kelarutannya, yaitu antioksidan larut air (asam askorbat dan protein pengikat logam) dan antioksidan larut lemak (karotenoid, flavonoid, kuinon, dan bilirubin) (Sayuti & Yenrina, 2015).

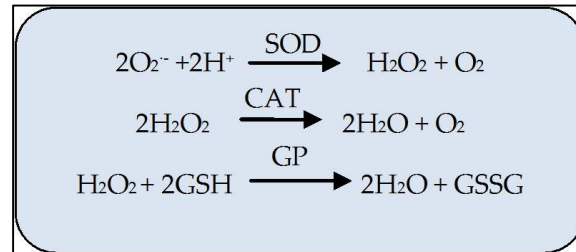
2.3.4.4 Fungsi dan Mekanisme Antioksidan

Fungsi dan mekanisme kerja antioksidan digolongkan menjadi tiga antara lain antioksidan primer, antioksidan sekunder dan antioksidan tersier. Antioksidan primer adalah antioksidan yang berperan sebagai pemutus berantai (*chain-breaking antioxidant*) yang beraksi dengan radikal lipid dan mengubahnya ke dalam

bentuk yang lebih stabil. Antioksidan sekunder adalah antioksidan yang berperan sebagai pengikat ion logam yang bertindak sebagai prooksidan, menangkap radikal dan mencegah reaksi berantai. Antioksidan tersier adalah antioksidan yang berperan sebagai senyawa yang memperbaiki kerusakan biomolekul yang disebabkan radikal bebas.

Antioksidan primer memiliki mekanisme yaitu memutus rantai reaksi radikal bebas bereaksi dengan mendonorkan atom hidrogen secara cepat pada suatu lipid yang radikal sehingga produk yang dihasilkan lebih stabil dari produk awal. Contoh antioksidan primer antara lain superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase, katalase dan protein pengikat logam. Superoksida dismutase adalah enzim yang mengkatalisis dismutase radikal anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2). Enzim ini memerlukan bantuan zat gizi mineral seperti mangan (Mn), seng (Zn), dan tembaga (Cu) agar dapat bekerja. Oleh sebab itu, mineral-mineral tersebut harus tersedia dengan jumlah cukup di dalam tubuh. Glutathion peroksidase adalah enzim yang mengkatalisis oksidasi glutathion bentuk tereduksi (GSH) menjadi bentuk teroksidasi (GSSG). Glutathion tereduksi mencegah lipid membran dan unsur-unsur sel lainnya dari stres oksidatif dengan cara merusak hidrogen peroksida dan lipid hidrogen peroksida. Selenium (Se) merupakan mineral penting untuk sintesis protein dan aktivitas

enzim glutathion peroksidase. Katalase adalah enzim yang mengkatalisis dismutase hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2) (Sayuti & Yenrina, 2015).



Gambar 9. Mekanisme Antioksidan Primer (Kulbacka *et al.*, 2016).

Antioksidan sekunder memiliki mekanisme yaitu mengikat ion-ion logam, menangkap oksigen, mengurai hidroperoksida menjadi senyawa non radikal, penyerap radiasi UV atau deaktivasi oksigen. Contoh antioksidan sekunder antara lain vitamin C, vitamin E, beta-karoten, isoflavon, bilirubin dan albumin (Sayuti & Yenrina, 2015)

Antiosidan tersier memiliki mekanisme yaitu memperbaiki struktur DNA dan organel yang rusak akibat radikal bebas. Contoh antioksidan tersier antara lain *butylated hydroxyanisole* (BHA) dan metionin sulfida reduktase (Sayuti & Yenrina, 2015).

2.3.4.5 Antioksidan Alami dan Sintetik

Sumber antioksidan dapat dibedakan menjadi dua yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan alami adalah antioksidan hasil dari ekstraksi dari bahan alami. Contoh

antioksidan alami antara lain vitamin A, vitamin C, seng (Zn), fenol dan sebagainya. Antioksidan sintetis adalah antioksidan yang berasal dari hasil sintesis reaksi kimia. Contoh antioksidan sintetis adalah *Butylated Hydroxyanisole* (BHA), *Butylated Hydroxytoluene* (BHT), *Tert-Butylated Hydroxyquinon* (TBHQ) dan tokoferol (Sayuti & Yenrina, 2015).

2.4 Bakau

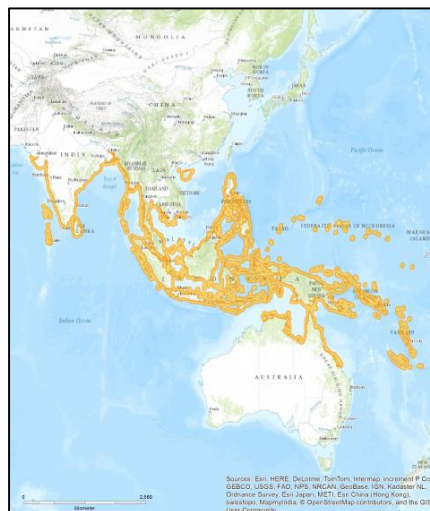
2.4.1 Taksonomi

Bakau merupakan tumbuhan penyusun utama pada ekosistem mangrove yang berada di pesisir pantai. Tumbuhan ini tersebar secara luas di berbagai negara seperti Indonesia, Tiongkok, Australia dan sebagainya. Adapun nomenklatur bakau minyak sebagai berikut:

| | |
|---------|--|
| Kingdom | : Plantae |
| Divisi | : Tracheophyta |
| Kelas | : Magnoliopsida |
| Bangsa | : Rhizophorales |
| Suku | : Rhizophoraceae |
| Marga | : Rhizophora |
| Jenis | : <i>Rhizophora apiculata</i> (Duke <i>et al.</i> , 2010). |



Gambar 10. *Rhizophora apiculata* (Sumber: Duke, 2006).

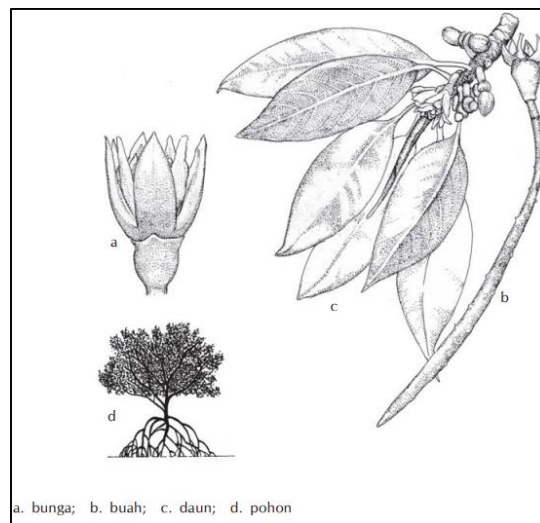


Gambar 11. Peta Distribusi Bakau (Sumber: Duke *et al.*, 2010).

2.4.2 Struktur dan Karakteristik *Rhizophora apiculata*

Bakau (*Rhizophora apiculata*) atau dikenal dengan nama bakau minyak, bakau tanduk, bakau kacang dan sebagainya pada daerah setempat merupakan pohon yang dapat tumbuh dengan ketinggian mencapai 30 m dan dengan diameter batang mencapai 50 cm. Akar bakau yang khas

mampu tumbuh hingga mencapai 5 m dan kadang-kadang memiliki akar udara yang keluar dari cabang.. Kulit kayu bewarna abu-abu tua dan berubah-ubah. Daun bakau memiliki kulit dan warna hijau tua dengan hijau muda pada bagian tengah dan kemerahan di bagian bawah. Ukuran daun 7-19 x 3,5-8 cm sedangkan gagang daun panjangnya 17-35 mm dan warnanya kemerahan. Bunga bakau yang terletak di ketiak daun merupakan bunga tidak sempurna dan biseksual. Ukuran bunga dapat mencapai 14 mm dan bewarna putih kekuningan. Buah bakau memiliki tekstur kasar dan bewarna bulat memanjang seperti buah pir, warna coklat, panjang 2,5-3,5 cm, dan berisi satu biji fertil (Noor *et al.*, 2012).



Gambar 12. Struktur *Rhizophora apiculata* (Sumber: Noor *et al.*, 2012).

Habitat bakau pada tanah berlumpur, halus, dalam dan tergenang pada saat normal. Bakau memiliki toleransi terhadap kadar garam hingga 65 ppt dan tumbuh optimal dengan kadar garam 8-15 ppt. Bakau merupakan tumbuhan yang kuat dan tumbuh dengan cepat. Media tanam dengan

jumlah sedimen tinggi mengakibatkan peningkatan mortalitas benih bakau. (Noor *et al.*, 2012; Duke *et al.*, 2010).

2.4.3 Bakau Sebagai Anti Oksidan

Beberapa penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa bakau dapat berperan sebagai antioksidan, anti virus, anti tumor, hipoglikemik dan sebagainya. Senyawa bioaktif tersebut terdapat pada bakau terdapat buah, daun, batang maupun akar bakau. Ekstrak batang bakau mengandung senyawa bioaktif utama yaitu tanin. Hasil uji ekstrak bakau dengan metode penangkapan radikal bebas DPPH dan ABTS menunjukkan ekstrak kulit batang pakau merupakan bagian yang paling potensial sebagai antioksidan. Metode penangkapan radikal bebas 1,1-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) terhadap kulit batang bakau menghasilkan IC_{50} : $3,31 \mu\text{g mL}^{-1}$, sedangkan dengan metode penangkapan radikal bebas asam 2,2-Azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonat (ABTS) menghasilkan IC_{50} : $18,47 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Rahim *et al.*, 2008; Abdullah, 2011).

Tabel 1. Nilai IC₅₀ Antioksidan Pada Ekstrak Bakau (*Rhizophora apiculata*) (Sumber: Abdullah, 2011).

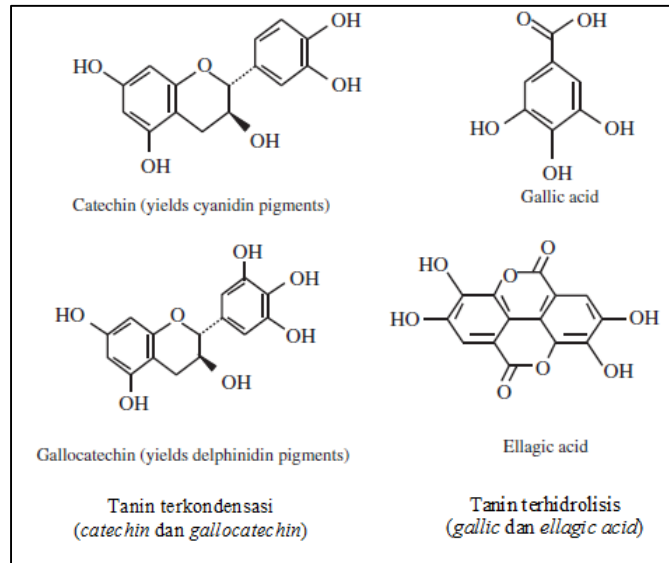
| Ekstrak | Antioksidan | |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | DPPH $\mu\text{g mL}^{-1}$ | ABTS $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
| N-heksana batang | -* | -* |
| Etil asetat batang | 26.93 | 71.92 |
| Metanol batang | 30 | 77.12 |
| N-heksana kulit batang | -* | -* |
| Etil asetat kulit batang | 137.11 | 30.89 |
| Metanol kulit batang | 3.31 | 18.47 |
| N-heksana akar | -* | -* |
| Etil asetat akar | 82.84 | 68.61 |
| Metanol akar | 53.12 | 55.54 |
| Asam kojat | -* | -* |
| Asam askorbat | 9.79 | 10.93 |

Keterangan :

IC₅₀ : konsentrasi ekstrak yang mampu menangkap radikal bebas DPPH dan ABTS sebesar 50%

-* : tidak mencapai inhibisi 50% sampai konsentrasi maksimum $166.67 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tanin merupakan senyawa polifenol dengan berat molekul yang tinggi ($M_r > 500$). Strukturnya terdiri dari gugus flavan-3-ol yang terhubung bersama melalui ikatan karbon C4-C6 atau C4-C8. Tanin dibedakan menjadi dua jenis yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi atau protoantosianidin sebagai kandungan utama pada bakau merupakan senyawa berbasis flavanol. Protoantosianidin menghasilkan antosianidin pada suhu tinggi di dalam larutan alkohol atau asam mineral kuat. Tanin terhidrolisis merupakan jenis tanin yang memiliki struktur poliester yang mudah dihidrolisis dan hasil hidrolisisnya menghasilkan asam polifenolat dan gula sederhana (Hagerman *et al.*, 1998; Rahim *et al.*, 2008; Sujarnoko 2012).



Gambar 13. Struktur Kimia Tanin Terkondensasi dan Terhidrolisis (Sumber: Patra & Saxena, 2010).

Sifat tanin sebagai antioksidan sekunder yaitu menangkap radikal bebas sehingga mencegah terjadinya reaksi berantai stres oksidatif. Tanin alami larut dalam air dan memberikan warna pada air dengan variasi warna yang dihasilkan bergantung pada sumber tanin tersebut, seperti warna merah terang sampai merah gelap atau coklat. Secara garis besar sifat tanin sebagai berikut:

1. Tanin secara umum memiliki gugus fenol dan bersifat koloid.
2. Semua jenis tanin dapat larut dalam air, kelarutannya meningkat bila di dalam air panas dan pelarut organik seperti metanol, etanol, aseton serta pelarut organik lainnya.
3. Reaksi warna terjadi bila direaksikan dengan garam besi. Reaksi ini dapat digunakan untuk melakukan klasifikasi tanin. Reaksi tanin dengan garam besi memberikan warna hijau dan biru kehitaman, tetapi uji ini kurang baik karena zat-zat lain dapat memberikan warna yang sama seperti reaksi pada tanin.

4. Tanin mulai terurai pada suhu 98,8 °C
5. Tanin dapat dihidrolisis oleh asam, basa dan enzim
6. Ikatan kimia yang terjadi antara tanin-protein atau polimer lainnya terdiri dari ikatan hidrogen, ikatan ionik dan ikatan kovalen.
7. Warna tanin akan menjadi gelap bila terkena cahaya atau dibiarkan di tempat terbuka
8. Tanin memiliki sifat bakteristatik dan fungistatik (Sujarnoko, 2012).

2.5 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Sprague Dawley

Tikus merupakan hewan mamalia yang sudah menyebar di seluruh dunia dan digunakan secara luas untuk penelitian di laboratorium. Tikus pada penelitian ini menggunakan jenis tikus putih jantan dengan nama latin *Rattus norvegicus* galur *Sprague dawley*. Tikus ini memiliki keunggulan sebagai hewan percobaan karena dapat berkembang biak dengan cepat, jenis hewan ini berukuran kecil sehingga pemeliharaannya relatif mudah, relatif sehat dan cocok untuk berbagai macam penelitian (Putra, 2009). Adapun taksonomi tikus penelitian ini sebagai berikut:

| | |
|------------|-------------------------|
| Kingdom | : Animalia |
| Filum | : Chordata |
| Subfilum | : Vertebrata (Craniata) |
| Kelas | : Mamalia |
| Subkelas | : Theria |
| Infrakelas | : Eutharia |
| Ordo | : Rodentia |

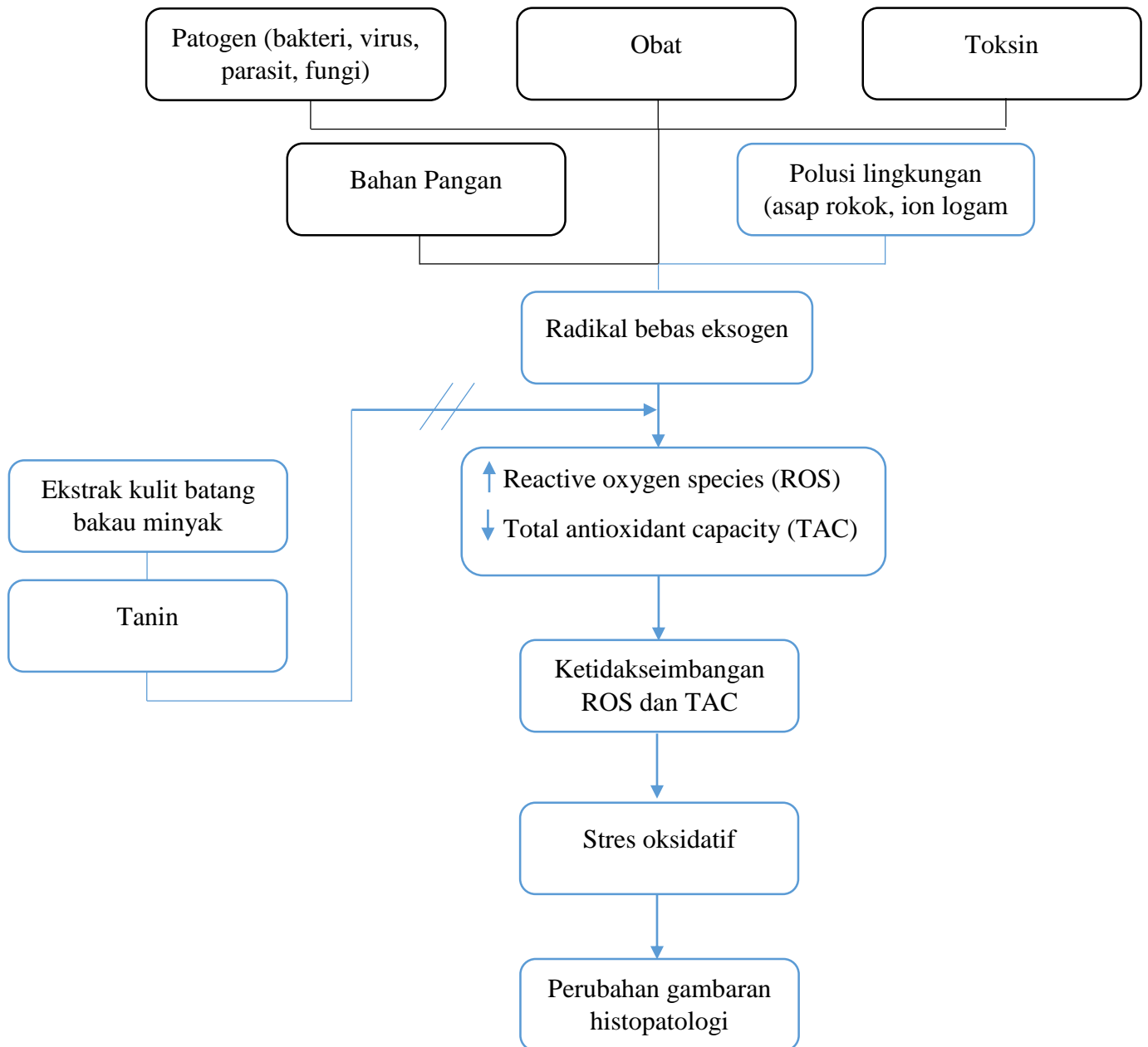
Subordo : Myomorpha
Superfamili : Muroidea
Famili : Muridae
Subfamili : Murinae
Genus : Rattus
Spesies : *Rattus norvegicus* (Dewi, 2008).



Gambar 14. Tikus *Rattus norvegicus* Galur *Sprague dawley* (Estina, 2016).

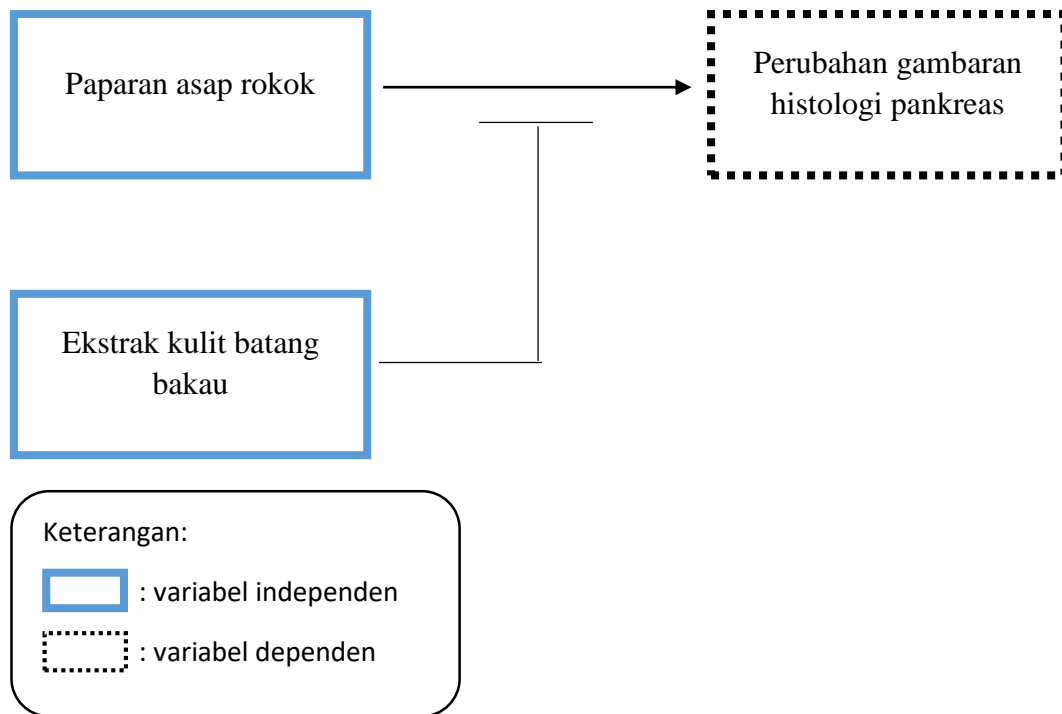
2.6 Kerangka Pemikiran

2.6.1 Kerangka Teori



Gambar 15. Kerangka Teori (Rahal *et al.*, 2014; Abdullah, 2011).

2.6.2 Kerangka Konsep



Gambar 16. Kerangka Konsep.

2.7 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan tinjauan pustaka yang telah diuraikan maka hipotesis penelitian ini sebagai berikut:

H0 = Tidak terdapat pengaruh ekstrak kulit batang bakau (*Rhizophora apiculata*) terhadap histopatologi pankreas tikus galur *Sparague dawley* yang terpapar asap rokok.

H1 = Terdapat pengaruh ekstrak kulit batang bakau (*Rhizophora apiculata*) terhadap histopatologi pankreas tikus galur *Sparague dawley* yang terpapar asap rokok.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode *Post Test Only Control Group Design*. Akan tetapi dimodifikasi dengan penambahan adanya kelompok kontrol. Pengambilan data diambil pada akhir penelitian setelah dilakukan perlakuan, kelompok-kelompok tersebut dianggap sama sebelum diberi perlakuan. Di akhir penelitian dilakukan perbandingan antara hasil pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (Notoatmodjo, 2005).

| Eksperimen | Postes |
|-------------------|---------------|
| X | 02 |

keterangan:

X : perlakuan atau eksperimen

02 : pengukuran atau *post test*

Gambar 17. Desain Penelitian.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian ini meliputi wilayah tempat tinggal sampel di *pet house* Fakultas Kedokteran Unila, pembuatan preparat di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Unila dan ekstraksi di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Unila. Waktu pelaksanaan penelitian dimulai dari September-Oktober 2017 atau selama 30 hari (Latumahina *et al.*, 2011).

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi Penelitian

Tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur *Sprague dawley* berumur 2,5-3 bulan atau 10-12 minggu dengan berat badan 200-250 gram yang diperoleh dari Institut Pertanian Bogor (IPB).

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel adalah bagian (subset) dari populasi yang dipilih dengan cara tertentu sehingga dapat dianggap mewakili populasinya. Sampel penelitian adalah pankreas tikus putih jantan (*Rattus novergicus*) galur *Sprague dawley*. Besar sampel dihitung dengan metode rancangan acak lengkap dapat menggunakan rumus Frederer.

Rumus Frederer:

$$(t-1) (n-1) \geq 15$$

keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah pengulangan atau jumlah sampel tiap kelompok.

Berdasarkan rumus diatas maka dapat diperoleh estimasi besar sampel sebanyak :

$$(3-1) (n-1) \geq 15$$

$$2(n-1) \geq 15$$

$$2n-2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8,5$$

$$\mathbf{n \geq 9}$$

Dengan demikian terdapat tiga kelompok penelitian dengan sampel tiap kelompok yaitu sembilan ekor tikus ($n \geq 9$) sehingga penelitian ini menggunakan 30 ekor penelitian sebagai subjek yang diteliti. Koreksi dilakukan pada subjek penelitian sebagai antisipasi terjadi *drop out* eksperimen.

$$N = \frac{n}{1-f}$$

keterangan :

N = besar sampel koreksi

n = besar sampel awal

f = perkiraan proporsi drop out sebesar 10%

Berdasarkan rumus diatas maka dapat diperoleh estimasi besar sampel sebanyak :

$$N = \frac{n}{1 - f}$$

$$N = \frac{9}{1 - 10\%}$$

$$N = \frac{9}{1 - 0,1}$$

$$N = \frac{9}{0,9}$$

$$N = 10$$

Jadi, berdasarkan rumus sampel diatas, jumlah sampel dari lima kelompok adalah enam ekor sehingga jumlah tikus yang digunakan adalah 30 ekor.

3.3.3 Kelompok Perlakuan

Tabel 2. Kelompok Perlakuan.

| No. | Kelompok | Perlakuan |
|-----|---------------------------|---|
| 1. | Kelompok Kontrol 1 (K1) | Kelompok tikus yang tidak diberi paparan asap rokok dan tidak diberi ekstrak kulit batang bakau (<i>Rhizophora apiculata</i>) (Kelompok Kontrol 1). |
| 2. | Kelompok Kontrol 2 (K2) | Kelompok tikus yang diberi paparan asap rokok dua batang selama 30 hari dan tidak diberi ekstrak kulit batang bakau (<i>Rhizophora apiculata</i>) (Kelompok Kontrol 2). |
| 3. | Kelompok Perlakuan 1 (P1) | Kelompok tikus yang diberi paparan asap rokok dua batang selama 30 hari dengan pemberian dosis 56,55 mg/kgBB ekstrak kulit batang bakau (<i>Rhizophora apiculata</i>) (Kelompok Perlakuan 1). |

3.3.4 Kriteria Inklusi

- a. Sehat (tikus dengan bulu tidak rontok dan tidak kusam, aktivitas aktif)
- b. Berjenis kelamin jantan
- c. Berusia 2,5-3 bulan
- d. Berat badan 200-250 gram

3.3.5 Kriteria Eksklusi

- a. Terdapat penurunan berat badan >10% setelah masa adaptasi (satu minggu) di laboratorium.
- b. Mati selama masa perlakuan.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat Penelitian

3.4.1.1 Alat dalam Pembuatan Ekstrak

- a. Mesin penggiling
- b. Kertas saring
- c. *Rotatory evaporator*
- d. Labu erlemeyer
- e. Gelas ukur
- f. Pipet ukur

3.4.1.2 Alat selama Perlakuan

- a. Kandang tikus
- b. Tempat makan dan minum tikus
- c. Neraca elektronik dengan kapasitas/daya baca 3000 g/0,01g untuk menimbang berat badan tikus.
- d. Sonde tikus
- e. Spuit oral 1 cc
- f. Alat bedah minor
- g. Spuit 10 cc
- h. Kotak pemaparan asap rokok
- i. Mikroskop cahaya
- j. Kamera digital
- k. *Handscoon* dan masker

- l. Gelas ukur dan pengaduk

3.4.1.3 Alat dalam Pembuatan Preparat Histopatologi

- a. *Cover glass*
- b. *Object glass*
- c. *Tissue cassette*
- d. *Rotary microtome*
- e. *Waterbath*
- f. *Platening table*
- g. *Autotechnicome processor*
- h. *Staining jar*
- i. *Staining jack*
- j. Kertas saring
- k. *Histoplast*
- l. *Paraffin dispenser*

3.4.2 Bahan Penelitian

3.4.2.1 Bahan dalam Pembuatan Ekstrak

- a. Kulit batang minyak
- b. Etanol 95%

3.4.2.2 Bahan selama Perlakuan

- a. Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) dewasa jantan galur *Sprague dawley*
- b. Pakan tikus
- c. Air minum tikus
- d. Sekam untuk kandang tikus

3.4.2.3 Bahan dalam Pembuatan Preparat Histopatologi

- a. Larutan formalin 10 % untuk fiksasi
- b. Alkohol 70%
- c. Alkohol absolut
- d. Xylol
- e. Pewarna hematoksilin dan Eosin (H&E)
- f. Entelan

3.5 Identifikasi Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Independen

Variabel independen (bebas) pada penelitian ini adalah ekstrak kulit batang bakau yang diberikan pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague dawley* dan paparan asap rokok.

3.5.2 Variabel Dependen

Variabel dependen (terikat) pada penelitian ini adalah gambaran histopatologi pankreas yang terpapar asap rokok.

3.5.3 Variabel Perantara

- 1) Variabel perantara yang dapat dikendalikan adalah jenis tikus, umur tikus, makanan tikus, minuman tikus, dan dosis ekstrak kulit batang bakau.
- 2) Variabel perantara yang tidak dapat dikendalikan adalah absorpsi ekstrak kulit batang bakau pada tikus dan respon tikus terhadap paparan asap rokok.

Tabel 3. Definisi Operasional Variabel

| Variabel | Definisi | Alat Ukur | Hasil Ukur | Skala |
|----------------------------|--|------------------|---|---------------------|
| Ekstrak kulit batang bakau | Pemberian ekstrak kulit batang bakau (<i>Rhizophora apiculata</i>). Diberikan dengan dosis 56,55 mg/kgBB | Neraca | Larutan dengan dosis dan berat tertentu | Kategorik (Nominal) |
| Histopatologi pankreas | Gambaran histologi pankreas tikus dilihat menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x dalam lima lapang dengan skor: a. Tidak ada sel radang : 0 b. Ada sel radang : 1 | Mikroskop cahaya | Skor menurut Rongione | Kategorik (Nominal) |

3.6 Prosedur dan Alur Penelitian

3.6.1 Prosedur Penelitian

3.6.1.1 Aklamatisasi Hewan Coba

Hewan coba yang akan digunakan adalah tikus putih jantan. Aklamatisasi tikus putih jantan dilakukan di *pet house* Fakultas Kedokteran Universitas Lampung selama 7 hari. Tikus putih jantan di tempatkan secara acak dalam 6 tempat dengan masing masing tempat berisi 5 ekor tikus putih jantan. Dilakukan penimbangan dan penandaan pada tikus putih (Mustofa *et al.*, 2014)

Tikus ditempatkan pada kandang dengan ukuran 40 x 30 x 20 cm yang terbuat dari bahan plastik dan tutup berupa kawat besi. Tikus diberi makan sesuai 10% berat badan, yaitu sekitar 20-25 gram/ekor/hari. Pakan diberikan pada pagi hari pukul 07.00 dan sore hari pukul 16.00. Air minum diberikan secara *ad libitum*. Kebersihan kandang dilakukan dengan cara penggantian sekam setiap 3 hari (Garber *et al.*, 2011; Widiartini *et al.*, 2013).

3.6.1.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Batang Bakau

Bakau minyak didapatkan dari kota Lampung Timur. Bagian tanaman dipisahkan antara bagian batang, kulit batang, dan akar. Kulit batang bakau dicuci lalu dikeringkan melalui penganginan alami. Pembuatan ekstrak kulit batang bakau minyak menggunakan

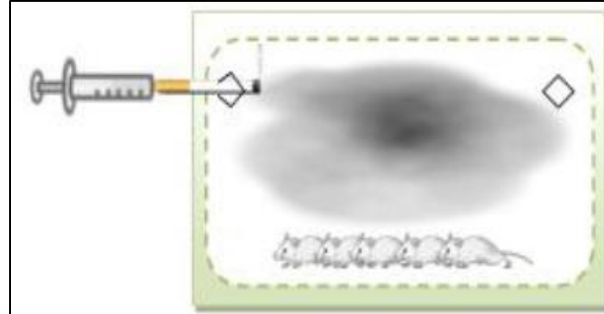
600 gram yang dicuci dan dipotong-potong. Potongan kulit batang bakau dihaluskan ke dalam mesin penggiling hingga menjadi serbuk. Serbuk simplisia kulit batang bakau minyak direndam di dalam pelarut etanol 95% sebanyak 1,5 L selama 6 jam pertama sambil sekali-kali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam. Hasil campuran dengan pelarut etanol 95% disaring dengan kertas saring untuk mendapatkan filtrat. Filtrat yang diperoleh diuapkan dengan *rotatory evaporator* 50 °C (Istiqomah, 2013; Mustofa *et al.*, 2013).

Ekstrak kulit batang bakau minyak diambil 1 ml lalu dibiarkan hingga kering selama 24 jam dalam suhu ruang. Hasil yang sudah mengering ditimbang sehingga didapatkan berat jenis dan volume masing-masing 0,0872 gram/ml dan 52 ml. Dosis ekstrak kulit batang bakau minyak yang digunakan adalah 56,55 mg/kgBB. Dengan demikian ekstrak kulit batang bakau yang diberikan untuk tikus dengan berat 200 g adalah 11,31 mg (Vijayavel *et al.*, 2006).

3.6.1.3 Pemaparan Radikal Bebas (Asap Rokok)

Pemaparan asap rokok dilakukan dengan menggunakan *smoking chamber* yang dilengkapi dengan enam lubang, yaitu satu lubang untuk dihubungkan dengan *air pump* dan lima lubang untuk sirkulasi udara. *Air pump* menggunakan spuit 20 cc dan

dihubungkan dengan selang karet sepanjang 10 cm yang dimasukkan ke dalam lubang *smoking chamber* (Ayu, 2014).



Gambar 18. Pemaparan Asap Rokok (Sumber: Ayu, 2014).

Pemaparan asap rokok terhadap tikus putih jantan galur *Sparague dawley* menggunakan dua batang rokok filter selama 30 hari dan dilakukan ± 1 jam setelah pemberian ekstrak kulit batang bakau supaya terjadi proses absorpsi terhadap ekstrak tersebut. Perlakuan ini dilakukan karena pada penelitian sebelumnya pemaparan asap rokok oleh satu batang rokok kretek mampu mengakibatkan perubahan pada histopatologi pankreas. Kandungan nikotin dari asap rokok kretek dua kali lebih tinggi dibandingkan asap rokok filter (Latumahina *et al.*, 2011).

3.6.1.4 Terminasi Hewan Coba

Setelah 30 hari diberi perlakuan, sepuluh tikus jantan dari tiap kelompok dianastesi dengan kloroform secara inhalasi untuk mengurangi nyeri, distress atau kecemasan sampel. Lalu proses terminasi dilakukan dengan cara *cervical dislocation*. Terminasi cara ini merupakan euthanasia metode fisik yang dilakukan pada

tikus yang memiliki berat badan ≤ 250 gram. Bila berat badan tikus melebihi 250 gram maka saat melakukan cervical dislocation akan mengalami kesulitan akibat adanya massa otot yang besar di daerah cervical (Anderson *et al.*, 2002)

Proses *cervical dislocation* dengan meletakkan ujung ibu jari dan jari telunjuk di setiap sisi leher untuk memberikan tekanan bagian posterior dasar tulang tengkorak ke sumsum tulang belakang, sementara bagian tangan lainnya memegang bagian ekor dan dengan cepat ditarik sehingga terjadi pemisahan vertebra servikal dari tulang tengkorak dan terjadi pemisahan sumsum tulang belakang dari otak. Lalu dilakukan laparotomi untuk mengambil organ pankreas sebagai sediaan mikroskopis. Pembuatan sediaan mikroskopis dengan metode parafin dan pewarnaan H&E.

3.6.1.5 Prosedur Pembuatan Preparat

Pembuatan preparat histopatologi pada organ pankreas dilakukan dengan prosedur sebagai berikut :

a. Fiksasi

Jaringan yang akan dibuat sediaan histopatologinya difiksasi dalam larutan *Buffer Neutral Formalin* (BNF) 10% minimal 48 jam hingga mengeras (matang). Sampel organ yang terfiksasi dengan sempurna selanjutnya dilakukan *trimming* setebal $\pm 0,5$ cm. potongan kemudian dimasukkan dalam

tissue cassette untuk dimasukkan dalam *automatic tissue processor*.

b. Dehidrasi

Proses dehidrasi dimasukkan untuk menarik air dari jaringan dan mencegah terjadinya pengerutan sampel yang diuji. Dehidrasi dilakukan dengan cara merendam sampel dalam larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat (75%, 95% dan alkohol absolut). Proses perendaman pada masing-masing konsentrasi alkohol dilakukan selama 2 jam. Proses dehidrasi dilakukan dengan menggunakan mesin otomatis yaitu *automatic tissue processor*.

c. *Clearing*

Proses *clearing* atau penjernihan dilakukan 2 tahap dengan menggunakan xylol I dan xylol II. Xylol berfungsi untuk melarutkan alkohol dan parafin.

d. Infiltrasi

Infiltrasi atau impregnasi adalah proses pengisian ke dalam pori-pori jaringan. Pengisian pori-pori jaringan ini dimaksudkan untuk mengeraskan jaringan agar mudah dipotong dengan pisau mikrotom. Parafin yang digunakan adalah parafin histoplast.

e. *Embedding dan Blocking*

Embedding atau blocking adalah proses penanaman jaringan dalam blok parafin. Parafin yang digunakan adalah parafin

histoplast. Proses *embedding* dilakukan dengan menggunakan alat *tissue embedding console*.

f. *Sectioning*

Sectioning adalah proses pemotongan jaringan dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-5µm. pemotongan dilakukan dengan *alat rotary microtome spencer*. Sediaan kemudian di letakkan pada gelas objek dan disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

3.6.1.6 Pewarnaan Hematoxyllin-Eosin

Sebelum melakukan pewarnaan, preparat histopatologi dideparafinisasi dengan larutan xylol (I dan II) selama dua menit. Kemudian dilakukan proses rehidrasi dengan cara mencelupkan sediaan ke dalam alkohol bertingkat (alkohol absolut, alcohol 95% dan alcohol 80%). Perendaman dalam alcohol 95% dan 80% dilakukan selama 1 menit. Kemudian sediaan dicuci dengan air yang mengalir (air kran) selama 1 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna Mayer's Hematoxyllin dengan tahapan sebagai berikut :

- a. Preparat direndam dalam larutan Mayer's Hematoxyllin selama 8 menit
- b. Dicuci dengan air mengalir (air kran) selama 30 detik
- c. Dichelupkan ke dalam larutan lithium karbonat selama 15-30 detik

- d. Dicuci dengan air mengalir (air kran) selama 2 menit
- e. Preparat direndam dalam larutan eosin selama 2 – 3 menit
- f. Cuci dengan air mengalir (air kran) selama 30-60 detik
- g. Preparat dicelupkan ke dalam larutan alkohol 95% dan alkohol absolut sebanyak 10 kali celupan, absolut II selama 2 menit, xylol I selama satu menit dan xylol II selama dua menit
- h. *Mounting*, setelah tahapan pewarnaan, sediaan ditetesi perekat permount dan ditutup dengan cover glass.

3.6.1.7 Skoring Gambaran Histopatologi Pankreas

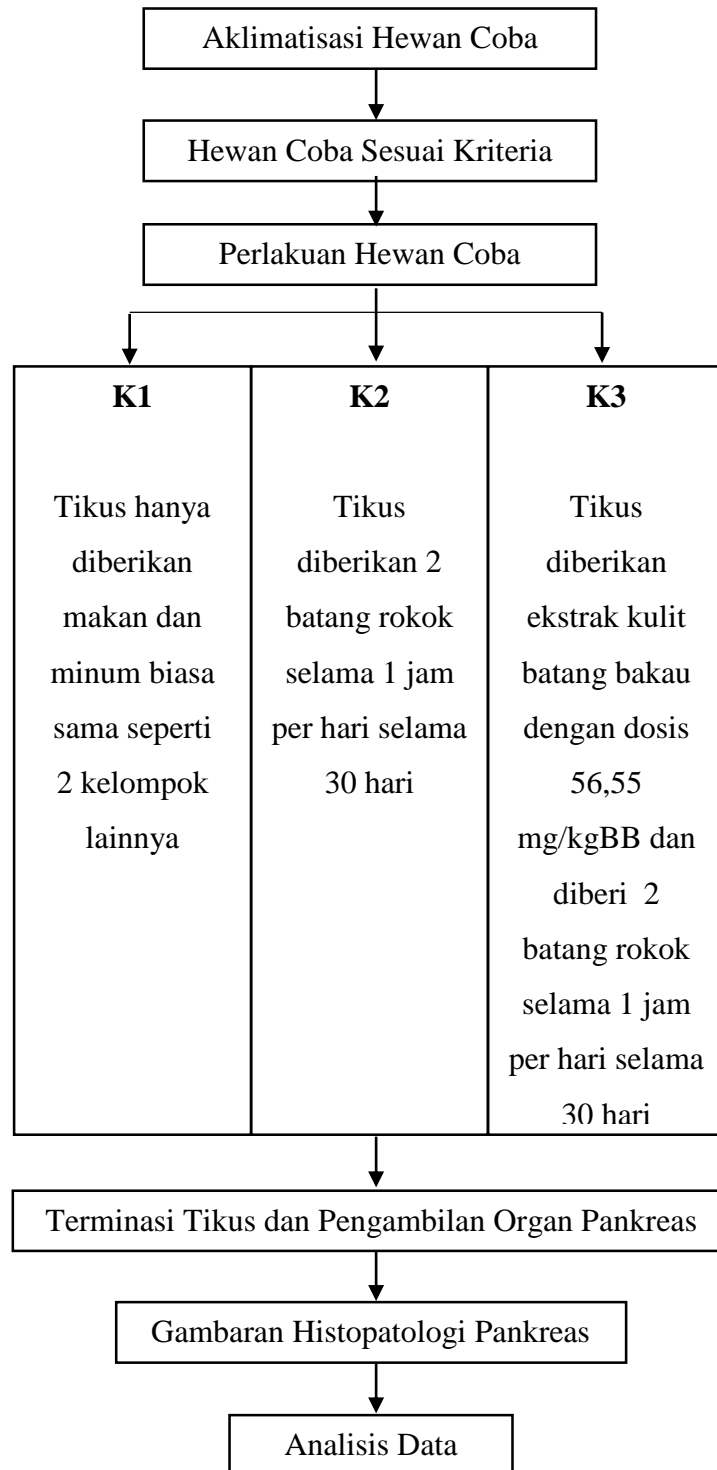
Gambaran kerusakan mikroskopis pankreas dengan melakukan pengamatan terhadap sediaan histopatologi menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x dengan lima lapang pandang.

Pembacaan preparat dengan mengacu pada skor:

Skor 0: tidak ada perubahan patologis

Skor 1: adanya sel radang

3.6.2 Alur Penelitian



Gambar 19. Alur Penelitian.

3.7 Rencana Pengolahan dan Analisis Data

3.7.1 Pengolahan Data

Data yang telah diperoleh dari proses pengumpulan data akan diubah ke dalam bentuk tabel - tabel, kemudian data diolah menggunakan program *software* uji statistik dengan nilai $\alpha = 0,05$. Kemudian, proses pengolahan data menggunakan program komputer ini terdiri beberapa langkah :

- a. *Coding*, untuk mengkonversikan (menerjemahkan) data yang dikumpulkan selama penelitian kedalam simbol yang cocok untuk keperluan analisis.
- b. *Data entry*, memasukkan data kedalam komputer.
- c. Verifikasi, memasukkan data pemeriksaan secara visual terhadap data yang telah dimasukkan ke dalam komputer.
- d. *Output* komputer, hasil yang telah dianalisis oleh komputer kemudian dicetak.

3.7.2 Analisis Data

Analisis statistik untuk mengolah data yang diperoleh akan menggunakan program *software* SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) dengan jenis analisis bivariat. Analisis bivariat adalah analisis yang digunakan untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas dengan variabel terikat dengan menggunakan uji statistik. Uji statistik yang digunakan dalam penelitian ini adalah chi-square. Uji chi-square digunakan karena penelitian ini memiliki masalah penelitian yaitu analisis

komparatif kategorik tidak berpasangan. Apabila syarat uji chi-square tidak terpenuhi, yaitu jumlah sel yang memiliki nilai *expected* kurang dari 5, maksimal sebanyak 20% dari jumlah sel yang ada, maka digunakan uji statistik alternatif yaitu uji fisher. Hal ini dikarenakan penelitian ini memiliki jenis tabel 2x2.

3.8 Etik Penelitian

Ethical Clearance penelitian ini telah disetujui dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor surat 4456/UN26.8/DL/2017. Prinsip etika dalam menggunakan hewan coba untuk penelitian harus memenuhi prinsip 3R yaitu

1. *Replacemet*, adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan secara seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literatur untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan.
2. *Reduction*, adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Dalam penelitian ini sampel dihitung menggunakan rumus Frederer yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$, dengan n yaitu jumlah perlakuan
3. *Refinement*, adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi, dengan prinsip dasar membebaskan hewan coba dalam beberapa kondisi:
 - a. Bebas dari rasa lapar dan haus, pada penelitian ini hewan coba diberikan pakan standar dan minum *ad libitum*.

- b. Bebas dari ketidaknyamanan, pada penelitian ini hewan coba ditempatkan pada *pet house* dengan suhu terjaga 25-30 °C, jauh dari gangguan bising dan aktivitas manusia. Kebersihan kandang dijaga dengan penggantian sekam kandang setiap tiga hari sekali.
- c. Bebas dari nyeri dan penyakit dengan menjalankan program kesehatan, pencegahan, dan pemantauan, serta pengobatan terhadap hewan percobaan jika diperlukan, pada penelitian ini hewan coba diberikan perlakuan dengan sonde tikus agar mengurangi rasa nyeri hingga sesedikit mungkin, dosis perlakuan yang diberikan disesuaikan dengan pengalaman terdahulu atau literatur yang telah ada. Prosedur pengambilan pada akhir penelitian telah dijelaskan dengan mempertimbangkan tindakan manusiawi sehingga digunakan *anesthesia* dan metode *euthanasia* yang dilakukan oleh orang terlatih untuk meminimalisasi atau bahkan meniadakan penderitaan hewan coba.
- d. Bebas dari rasa takut dan stres, pada penelitian ini hewan coba diberikan waktu aklimatisasi selama 7 hari.
- e. Bebas mengekspresikan tingkah-laku alamiah, pada penelitian ini masing-masing hewan coba ditempatkan pada satu kandang dengan jumlah lima ekor agar dapat mengekspresikan kontak sosial (Ridwan, 2013)

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Penelitian ini memberikan kesimpulan bahwa pemberian ekstrak kulit batang bakau (*Rhizophora apiculata*) etanol 95 % dengan dosis 56,55 mg/kgBB mampu melindungi kerusakan sel pankreas tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang diinduksi paparan asap rokok.

5.2 Saran

Saran peneliti kepada peneliti lain yaitu menguji lebih lanjut mengenai dosis toksik ekstrak kulit batang bakau (*Rhizophora apiculata*) terhadap proteksi dari kerusakan sel parenkim pankreas. Peneliti lain juga disarankan untuk membandingkan efek dari ekstrak kulit batang bakau (*Rhizophora apiculata*) terhadap ekstrak kulit batang bakau dengan spesies berbeda. Serta disarankan untuk meneliti aktivitas antikoksidan seperti superoksida dismutase (SOD) dan malondialdehid (MDA) serta aktivitas anti inflamasi seperti tumor nekrosis faktor- α (TNF- α). Dan saran bagi institusi yaitu menyediakan alat ekstraksi metode sokletasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, 2011. Potensi bakau rhizophora apiculata sebagai inhibitor tirosinade dan antioksidan[Tesis]. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Anderson L, Ballinger M, Bayne K & Bennet T, 2002. Institutional animal care and use committee guidebook 2nd ed. M. Pitts, D. Bernhardt, & M. Greene, eds., Maryland: Office of Laboratory Animal Welfare.
- Ayu NVI, 2014. Pengaruh pemberian vitamin e terhadap jumlah sel Spermatogenik dan diameter tubulus seminiferus mencit jantan (mus musculus l) yang dipaparkan asap rokok. Universitas Lampung.
- Barreto SG, 2015. How does cigarette smoking cause acute pancreatitis? Elsevier Journal, 1(April), pp.1–7.
- Benjamin RM, 2010. A report of the surgeon general how tobacco smoke causes disease, Atlanta.
- Birben E, Murat U, Sackesen C, Erzurum S & Kalayci O, 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. WAO Journal, 5(January), pp.9–19.
- Contran R, Kumar V, & Robbins S, 2007. Buku ajar patologi Edisi 7., Jakarta: EGC.
- Daijo H, Hoshino Y, Kai S, Suzuki K, Nishi K, Matsuo Y, *et al.*, 2016. Cigarette smoke reversibly activates hypoxia-inducible factor 1 in a reactive oxygen species- dependent manner. Nature Publishing Group, 1(January), pp.1–12.
- Derrickson G & Bryan, JT, 2009. Principles of anatomy and physiology Twelfth Ed. B. Roesch, ed., New Jersey: John Wiley & Sons.
- Dewi NWS, 2008. Kajian pemberian tepung buah pare (Momordica charantia l.) terhadap konsumsi, pencernaan bahan kering dan performa tikus (Rattus norvegicus). Institut Pertanian Bogor.
- Duke N, 2006. Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. Permanent Agriculture Resources (PAR), 1(April), pp.1–18

- Duke N, Kathiresan K, Salmo S, Fernando, Peras J, Sukardjo S, *et al.*, 2010. *Rhizophora apiculata*. Red List, 5(2), pp.1–6.
- Edderkaoui M & Thrower E, 2015. Smoking induced pancreatitis and pancreatic cancer. American Pancreatic Association, 1(Juli), pp.1–22.
- Eriksen MP, 2014. The tobacco atlas Fifth Edit. J. M. Daniel, ed., Atlanta: American Cancer Society, Inc.
- Eroschenko VP, 2013. Atlas histologi diFiore: dengan korelasi fungsional Edisi 11., Jakarta: EGC.
- Estina, 2016. Jenis dan ciri-ciri tikus laboratorium disertai gambar. Tersedia dari: <https://dokterternak.wordpress.com/2010/11/05/jenis-dan-ciri-ciri-tikus-labolatorium-disertai-gamba/>.
- Garber JC, Wayne B, Bielitzki J, Ann L. & Hendriksen C, 2011. Guide for The Care and Use of Laboratory Animals Eight., Washington D.C: National Resesarch Council.
- Gartner LP & Hiatt JL, 2007. Atlas berwarna histologi J. Tambajong, ed., Batam: Binarupa Aksara.
- Geiss O & Kotzias D, 2007. Tobacco, cigarettes and cigarette Smoke an overview, Luxembourg: European Commission Directorate-General Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection.
- Guyton AC, 2008. Buku ajar fisiologi kedokteran Luqman Yanuar Rachman, ed., Jakarta: EGC.
- Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, *et al.*, 1998. High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(5), pp.1887–1892.
- Hansen JT, 2010. Netter’s Clinical Anatomy Second. E. O’Grady, ed., Philadelphia: Elsevier.
- Huda N, Halim A, Auni N, Abidin Z & Me R, 2013. A study of chemical compounds in *Rhizophora apiculata*. Bentham Open, 4(Mei), pp.108–110.
- Istiqomah, 2013. Perbandingan metode ekstraksi maserasi dan sokletasi terhadap kadar piperin buah cabe jawa (*piperis retrofracti fructus*). UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Jeffers MD, 2013. Tannins As Anti-inflammatory Agent. Journal of Chemical Information and Modeling, 53(9), pp.1689–1699.

- Kementerian Kesehatan RI, 2013a. InfoDATIN : Hari Tanpa Tembakau Sedunia, Jakarta, p.12.
- Kementerian Kesehatan RI, 2013b. Riset kesehatan dasar, Jakarta.
- Kulbacka J, Saczko J, Chwilkowska A, And,AC & Nina Skořucka N, 2016. Apoptosis, free radicals and antioxidant defense in antitumor therapy. in antioxidant enzyme. Rijeka: Intech, pp. 111–133.
- Kurniawaty E. & Lestari EE, 2012. Uji Efektivitas Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L .) sebagai Pengobatan Diabetes Melitus. MEDULA, 5(April), pp.2–6.
- Kusuma J, 2010. Peranan Peroksidasi Lipid pada Patogenesis Preeklamsia. Jurnal Universitas Udayana, 1(Juni), pp.19–28.
- Latumahina G, Kakisin P & Moniharapon M, 2011. Peran madu sebagai antioksidan dalam mencegah kerusakan pankreas mencit (*Mus musculus*) terpapar asap rokok kretek. Molluca Medica.
- Meira F, Almeida ACA., Luiz-Ferreira A., Takayama C, Dunder RJ, da Silva MA, *et al.*, 2012. Antioxidant action of mangrove polyphenols against gastric damage induced by absolute ethanol and ischemia-reperfusion in the rat. the scientific world journal, 2012(Desember), pp.1–9.
- Mescher AL, 2014. Histologi Dasar Junqueira Edisi 12., Jakarta: EGC.
- Mimica N, Simin N, Svircev E, Orcic D & Beara I, 2012. The effect of plant secondary metabolites on lipid peroxidation and eicosanoid pathway. in lipid peroxidation. Rijeka: Intech, p. 194.
- Moore KL & Dalley AF, 2013. Anatomi berorientasi klinis Kelima. M. Syamsir, ed., Jakarta: Erlangga.
- Mustofa S, 2013. Pengaruh pemberian ekstrak tempe terhadap fungsi hati dan kerusakan sel hati tikus putih yang diinduksi parasetamol. JUKE, 3(Maret), pp.62–69.
- Mustofa S, Mutiara GU & Sutiyarsro, 2013. Pengaruh pemberian ekstrak cabe jawa (*piper retrofractum* vahl) dan zinc (zn) terhadap jumlah sel germinal testis tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*). MAJORITY (Medical Journal of Lampung University), 2(Januari), pp.147–155.
- Mustofa S, Anindito AA, Pratiwi A, Putri AA & Maulana M, 2014. The influence of *Piper retrofractum* Vahl (Java's chili) extract towards lipid profile and histology of 1 rats coronary artery with high-fat diet. JUKE, 4(Maret), pp.52–59

- Noor YR, Khazali, M. & Suryadiputra I., 2012. Panduan pengenalan mangrove di indonesia, Bogor: wetlands international indonesia programme.
- Notoatmojo S, 2005. Metodologi penelitian kesehatan, Jakarta: Rineka Cipta.
- Nururrahmah, 2014. Pengaruh rokok terhadap kesehatan dan pembentukan karakter manusia. In Prosiding Seminar Nasional Universitas Cokroaminoto Palopo. pp. 77–84.
- Oktarlina RZ, Romdhon AR, David R., Nababan M., Kedokteran, F., Lampung, U., *et al.*, 2017. Respon Terapi Insulin Analog pada Diabetes Melitus Tipe II Tidak Terkontrol dengan Hepatitis Imbas Obat Anti Tuberkulosis. MEDULA,
- Park JW, Choi YJ, Suh, SIL & Kwon TK, 2001. Involvement of ERK and protein tyrosine phosphatase signaling pathways in EGCG-induced cyclooxygenase-2 expression in Raw 264.7 cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 286(4), pp.721–725.
- Patra AK & Saxena J, 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. Phytochemistry, 71(11–12), pp.1198–1222.
- Purnobasuki H, 2001. Potensi Mangrove Sebagai Tanaman Obat Prospect of Mangrove as Herbal Medicine Daftar Pustaka. JMIPA Unair, 1(1998), pp.125–126.
- Putra AP, 2009. Efektivitas pemberian kedelai pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) bunting dan menyusui terhadap pertumbuhan dan kinerja reproduksi anak tikus betina[Skripsi], Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, *et al.*, 2014. Oxidative stress, prooxidants , and antioxidants: the interplay. Pubmed Central, 2014(Mei), pp.3–4.
- Rahim AA, Rocca E, Steinmetz J, Kassim JM., Ibrahim SM. & Osman, H., 2008. Antioxidant activities of mangrove *Rhizophora apiculata* bark extracts. Food Chemistry, 107(June), pp.200–207.
- Repine J, Bast A & Lankhorst I, 1997. Oxidative stress in chronic obstructive. american journal of respiratory and critical care medicine, 156(10), pp.341–57.
- Ridwan E, 2013. Etika Pemanfaatan Hewan Percobaan dalam Penelitian Kesehatan. Journal Indonesian Medical Association, 63(3), pp.112–116.
- Sayuti K & Yenrina R, 2015. Antioksidan Alami dan Sintetik, Padang: Andalas University Press.

- Sherwood L, 2009. Fisiologi manusia dari sel ke sistem Edisi 6. N. Yesdelita, ed., Jakarta: EGC.
- Sujarnoko T, 2012. Studi meta-analisis efek senyawa metabolit sekunder tanin terhadap kualitas silase[Skripsi], Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Vijayavel K, Anbuselvam C. & Balasubramanian MP, 2006. Free radical scavenging activity of the marine mangrove *Rhizophora apiculata* bark extract with reference to naphthalene induced mitochondrial dysfunction. *Chemico-Biological Interactions*, 163(1–2), pp.170–175.
- WHO, 2012. Global adult tobacco survey: Indonesia Report 2011, Jakarta: WHO Library Cataloguing.
- WHO, 2010. World health organization guidelines for indoor air quality-selected pollutants, Copenhagen: WHO Regional Office for Europe.
- Widiartini W, Siswati E, Setiawan A, Rohmah IM. & Prasetyo E, 2013. Pengembangan usaha produksi tikus putih (*rattus norvegicus*) tersertifikasi dalam upaya memenuhi kebutuhan hewan laboratorium. *Dikti*, 1(Mei), p.2.