

**POTENSI EKSTRAK LAMUN (*Enhalus acoroides*) SEBAGAI
ANTIKANKER TERHADAP JARINGAN HEPAR MENCIT**

(Mus musculus L.)

(Skripsi)

Oleh

Tiffany Nurya Safitri

1817021063



FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS LAMPUNG

BANDAR LAMPUNG

2022

**POTENSI EKSTRAK LAMUN (*Enhalus acoroides*) SEBAGAI
ANTIKANKER TERHADAP JARINGAN HEPAR MENCIT**

(Mus musculus L.)

Oleh

TIFFAN Y NURYA SAFITRI

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

**Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG**

2022

ABSTRAK

POTENSI EKSTRAK LAMUN (*Enhalus acoroides*) SEBAGAI ANTIKANKER TERHADAP JARINGAN HEPAR MENCIT (*Mus musculus*)

Oleh :

TIFFANY NURYA SAFITRI

Salah satu zat karsinogenik yang kerap dijumpai di dalam kehidupan sehari-hari yaitu benzo(α)piren. Karsinogenesis dapat dihentikan dengan antioksidan dan antikanker (kemoprotektif), pada kasus tersebut tanaman Lamun (*Enhalus acoroides* (L.f.) Royle) diduga memiliki senyawa alami dengan potensi antioksidan dan antikanker sebagai agen kemoprotektif. Adapun tujuan penelitian ini untuk mengetahui dan menganalisis pengaruh kandungan flavonoid dan saponin yang terdapat pada ekstrak lamun terhadap hepar mencit yang didinduksi benzo(α)piren.

Penelitian ini dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan 24 ekor mencit jantan yang dibagi dalam 4 kelompok dengan masing-masing 6 ulangan yang diinduksi benzo(α)piren secara subkutan dengan dosis 0,3 mg/bb selama 10 hari, yang selanjutnya diberi ekstrak etanol lamun dengan konsentrasi yang berbeda. Hasil uji analisis ANOVA pada kelompok perlakuan tidak mempengaruhi berat badan mencit. Pada pemberian ekstrak lamun (*Enhalus acoroides* (L.f.) Royle) dosis 8,7 mg/bb/hari (P2) dan dosis 17,4 mg/bb/hari (P3) lebih baik untuk mempertahankan atau mencegah kerusakan sel hepatosit akibat terpapar senyawa karsinogenik benzo(α)piren dibandingkan dosis 4,4 mg/bb/hari.

Kata Kunci : Antikanker, Lamun (*Enhalus acoroides* (L.f.) Royle), benzo(α)piren, karsinogenesis

Judul Proposal Penelitian : POTENSI EKSTRAK LAMUN (*Enhalus acoroides*) SEBAGAI ANTIKANKER TERHADAP JARINGAN HEPAR MENCIT (*Mus musculus L.*)

Nama Mahasiswa : Tiffany Nurya Safitri

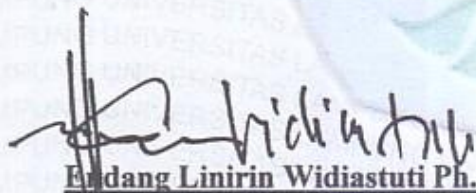
Jurusan/ Program Studi : Biologi / S1 Biologi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

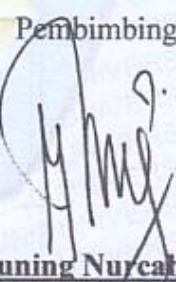
MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing


Pembimbing I


Endang Linirin Widiastuti Ph. D
NIP.196106111986032001

Pembimbing II


Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc
NIP. 196603051991032001

2. Ketua Jurusan Biologi FMIPA

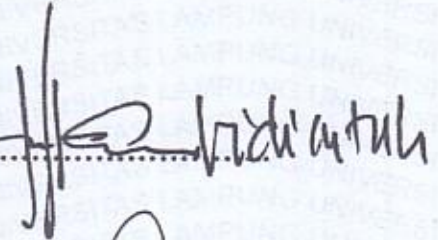

Dr. Jani Master, S.Si., M.Si.
NIP. 198301312008121001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

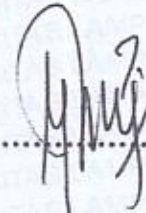
Ketua

: Endang Linirin W., Ph.D.....



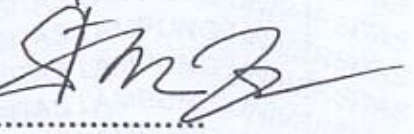
Sekretaris

: Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc.....



Penguji Utama

: Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed.....



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Satripto Dwi Yuwono, M.T.
NIP. 197407052000031001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi :

01 September 2022

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Tiffany Nurya Safitri
NPM : 1817021063
Juusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa apa yang tertulis dalam karya ilmiah ini adalah hasil karya sendiri berdasarkan pengetahuan dan informasi yang telah saya dapatkan. Karya ilmiah ini tidak berisi material yang telah dipublikasikan sebelumnya atau dengan kata lain hasil plagiat karya orang lain.

Demikian pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila di kemudian hari terdapat kecurangan dalam karya ilmiah ini, maka saya siap mempertanggung jawabkannya.

Bandar Lampung, 17 Agustus 2022

Yang menyatakan,



Tiffany Nurya Safitri
NPM. 1817021063

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Provinsi DKI Jakarta, Kota Jakarta Barat Kecamatan Palmerah pada tanggal 18 Desember 2000. Penulis merupakan anak kedua dari tiga bersaudara, dari pasangan Bapak Mulyadi dan Ibu Siti Nuraini. Penulis mulai menempuh pendidikan pertamanya di Taman Kanak-Kanak Pelita Maja pada tahun 2004.

Setelah itu penulis melanjutkan pendidikan pada tahun 2006 di SDN 4 Maja. Kemudian pada tahun 2013, penulis masuk kesalah satu Sekolah Menengah Pertama Negeri yaitu SMPN 2 Solear. Lalu pada tahun 2015, penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah Atas Negeri (SMAN) 1 Maja.

Pada tahun 2018, penulis tercatat sebagai salah satu mahasiswa Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur seleksi Beasiswa AFIRMASI. Penulis juga aktif di Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO) sebagai anggota pada periode 2019, kemudian pada periode 2020 menjabat sebagai Kepala Biro Dana dan Usaha HIMBIO, sekaligus Koordinator Biro Dana dan Usaha (DANUS) Pekan Konservasi Sumberdaya Alam (PKSDA).

Penulis pernah mengikuti pertandingan pencak silat Tadjimalela Cup tingkat kabupaten dan meraih juara 2. Selama menjadi mahasiswi penulis pernah mengikuti lomba FMIPA Got Talent dengan penampilan Seni Pencak Silat Ganda Putri dan meraih juara 2. Penulis pernah melaksanakan Praktik Kerja Lapangan

(PKL) di Balai Uji Standar Karantina Ikan, Pengendalian mutu dan Keamanan Hasil Perikanan (BUSKIPM) pada tahun 2021 dengan judul “**Identifikasi Bakteri Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Di Laboratorium Balai Uji Standar Karantina Ikan, Pengendalian Mutu Dan Keamanan Hasil Perikanan Jakarta**”. Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di desa Kedaung Kecamatan Pamulang Provinsi Banten dari bulan Agustus- September 2021.

Setelah itu, Penulis melaksanakan penelitian di Laboratorium Biologi molekuler Universitas Lampung, dan Balai Uji Penelitian Veteriner (BBLITVET) Bogor, di bawah payung penelitian Ibu Endang Linirin W., Ph.D dengan judul “**Potensi Ekstrak Lamun (*Enhalus acoroides*) Sebagai Antikanker Terhadap Jaringan Hepar Mencit (*Mus musculus*)**”

PERSEMBAHAN



Puji dan syukur atas kehadiran Allah SWT, Dzat yang maha agung yang memberikan kenikmatan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan mengharap ridho dari Allah SWT maka karya ini ku persembahkan kepada Orangtuaku tersayang Bapak (Mulyadi) dan Ibu (Siti Nuraini), terimakasih telah memberikan cinta dan kasih sayangnnya serta doa yang tak henti-hentinya, memberikan dukungan moril maupun materil, menjadi teladan yang baik untuk pribadi ini, serta menjadi pengajar terbaik sepanjang hayat.

Teruntuk kakakku tercinta (Lodin Satriani) dan adikku tersayang (Danish Kayla Payyaza), terima kasih telah menjadi pelipur lara serta penyemangatku, disaat aku hampir menyerah pada keadaan, membuatku bangkit dari keterpurukan dengan canda dan tawa yang kalian berikan.

Terima kasih ku ucapkan kepada dosen-dosen yang telah menjadi orang tua kedua dikampus yang tak bosan mengajarkan saya ilmu serta membimbing dengan tulus dan penuh keikhlasan.

Serta Almamaterku tercinta Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung

MOTTO

“Maka Sesungguhnya setiap kesulitan ada kemudahan. Sesungguhnya beserta kesulitan itu ada kemudahan. apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain). dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap” (Q.S. Al- Insyirah: 4-8)

BE KIND, BE BRAVE AND FEARLES

(Penulis)

SANWACANA

Alhamdulillahirobbil'alamin penulis haturkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan berkat dan pertolongan-Nya kepada penulis sehingga mampu menyelesaikan skripsi ini yang berjudul **“Potensi Ekstrak Lamun (*Enhalus acoroides*) Sebagai Antikanker Terhadap Jaringan Hepar Mencit (*Mus musculus*)”** dibuat sebagai bentuk pertanggung jawaban penulis selama menempuh pendidikan S1 dan merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si.) di Universitas Lampung.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
2. Bapak Dr. Jani Master, S.Si., M.Si., selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk membimbing, memberikan masukan, saran, perhatian, motivasi dan semangat dalam penyempurnaan skripsi ini.
3. Ibu Endang Linirin Widiastuti, Ph.D., selaku pembimbing utama atas kesediannya untuk memberikan bimbingan, saran dan kritik dalam penyelesaian skripsi ini
4. Ibu Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc., selaku pembimbing kedua atas kesediannya untuk memberikan bimbingan, saran dan kritik dalam penyelesaian skripsi ini
5. Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed. ., selaku Dosen Pembahas yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk membimbing, memberikan kemudahan, motivasi, kritik, dan saran dalam penyempurnaan skripsi ini.
6. Ibu Dr. Kusuma Handayani, S.Si., M.Si., selaku Ketua Program Studi S1 Biologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang telah memberikan semangat dan motivasi serta kesediaan waktunya dalam mengurus hal akademik.

7. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung yang telah memberikan bekal ilmu dan pengalaman belajar yang bermanfaat kepada penulis.
8. Bapak Ir. Salman Farisi, M. Si., selaku dosen pembimbing akademik yang selalu memberikan saran, masukan serta dukungan kepada penulis.
9. Rekan seperjuangan serta orang terkasih, Aditya Maulana dan Novita Nurdianti yang telah menemani penulis selama menempuh jenjang perguruan tinggi
10. Rekan-rekan satu penelitian antikanker, Argauli Sidabalok dan Ulfah Astriani yang telah membantu dan bekerja sama dalam penelitian dan tiada hentinya untuk memberikan semangat kepada penulis.
11. Sahabat terkasih Vira Resti Abdalla, Ristia Agustiana, Derlian Ella Tamara, Nurul Fadhillah, Lulu Anbiya, Yulia Rahma Syari, Desma Ramadhina Putri yang selalu menghibur dan membantu penulis
12. Sahabat tercinta Lidya Septaria Sinurat, Metari Arsitalia, Aura Priscilla Sabatini, Feriza Yolanda Putri, Rizka Dwi Damayanti, Putri Oktaria, Afifah Khairunisa, Heni Erlita Sari, Shelly Prisilia Mawardi, M. Rizky Mukhtadin, Hamdani yang selalu memberi dukungan, semangat, dan pertolongan bagi penulis.
13. Kakak-kakak tingkat, Kak Yosi Dwi Saputra, Kak Iffa Afiqah Khairani dan Kak bayu, yang telah mengajarkan dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan skripsi.
14. Teman-teman seperjuangan Biologi Angkatan 2018 yang namanya tidak bisa disebutkan satu per satu, terima kasih untuk rasa kekeluargaan yang terjalin selama ini.
15. Para Staff jurusan Biologi
16. Orang-orang yang tidak bisa disebutkan namanya, yang telah memberikan pengalaman dan pelajaran hidup serta memotivasi penulis untuk menjadi pribadi yang lebih baik lagi di masa depan.
17. Almamater tercinta, Universitas Lampung yang menjadi tempat belajar dan mendewasakan diri.

Semoga Allah SWT senantiasa memberikan berkat, kasih sayang, dan kebahagiaan kepada semua yang telah membantu penulis menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulis menyadari bahwa ini jauh dari kata sempurna, namun penulis berharap semoga skripsi ini dapat berguna dan bermanfaat bagi pembaca

Bandar Lampung, 26 Agustus 2022

Penulis

Tiffany Nurya Safitri

DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL DEPAN	i
HALAMAN JUDUL DALAM	ii
ABSTRAK	iii
HALAMAN PERSETUJUAN	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	vi
RIWAYAT HIDUP	vii
PERSEMBAHAN.....	ix
MOTTO	x
SANWACANA	xi
DAFTAR ISI	
DAFTAR TABEL	
DAFTAR GAMBAR	
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang	1
1.2 Tujuan	3
1.3 Manfaat	3

1.4 Kerangka Pikir.....	3
1.5 Hipotesis.....	4

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karsinogenesis	5
2.2 Hepar	6
2.2.1. Anatomi Organ Hepar	6
2.2.2. Histologi Hepar	8
2.3 Karsinogenesis Hepar.....	11
2.4 Biologi tumbuhan Lamun (<i>Enhalus acoroides</i> (R. f.) Royle)..	12
2.3.1. Klasifikasi Lamun	12
2.3.2. Morfologi dan Manfaat Tumbuhan Lamun.....	12
2.5 Benzo(α)piren.....	14
2.6 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	16

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat	18
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	18
3.3 Rancangan Percobaan	19
3.4 Bagan Alir Penelitian	20
3.5 Pelaksanaan Penelitian	21
3.5.1 . Persiapan Hewan Uji	21
3.5.2 . Persiapan Bahan Uji.....	21
3.5.3 . Pengujian Fitokimia Ekstrak <i>Enhalus acoroides</i>	22
3.5.4 . Induksi Zat Karsinogenik benzo(α)piren.....	22

3.5.5 . Pemberian Bahan Uji Ekstrak Etanol Lamun (<i>Enhalus acoroides</i>).....	23
3.5.6 . Pengukuran Berat Badan Mencit, Pembedahan dan Pengukuran Berat Basah Organ Mencit.....	23
3.5.7 . Pembuatan Preparat Histologi Hepar Mencit	24
3.6 Parameter Penelitian.....	26
3.6.1 . Parameter Utama.....	26
3.6.2 . Parameter Pendukung	27
3.7 Analisis Data	27
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Uji Fitokimia	28
4.2 Pengamatan Histologi Hepar Menci	29
4.2.1. Penginduksian Benzo(α)piren Rerata Berat Badan.....	29
4.2.2. Rerata Berat Basah dan Index Organ Hepar Mencit.....	31
4.2.3. Skoring Hepar Mencit yang Diinduksi Benzo(α)piren....	33
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	44
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA.....	45
LAMPIRAN	50

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. (A) Hepar Normal, (B) Hepar Upnormal Dengan Warna Pucat.....	7
2. Lobulus Hepar.....	8
3. Lamun <i>Enhalus acoroides</i> (L. F.) Royle	13
4. Struktur Molekul Benzo(A)Piren.....	15
5. Sigma Benzo(A)Piren Yang Diinduksi Pada Hewan Uji.....	15
6. Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	17
7. Bagan Alir Penelitian	20
8. Histogram Rerata Berat Badan Mencit Seluruh Kelompok.....	29
9. Rerata Berat Basah Organ Hepar Mencit.....	31
10. Rerata Index Organ Hepar Mencit	31
11. Skor Kerusakan Histologi Organ Hepar Mencit Seluruh.....	33
12. Histologi Sel Hepatosit Hepar Mencitk-	35
13. Histologi Sel Hepatosit Hepar Mencit P1	36
14. Histologi Sel Hepatosit Hepar Mencit P1 <i>Portal</i>	36
15. Histologi Sel Hepatosit Hepar Mencit P2 <i>Portal Area</i>	39
16. Histologi Sel Hepatosit Hepar Mencit P3 <i>Portal Area</i>	40
17. Histologi Data Sekunder Sel Hepatosit Kontrol Positif.....	41
18. Histologi Data Sekunder Portal Area Kontrol Positif	42

19. Persiapan Hewan Uji.....	51
20. Persiapan Bahan Uji.....	51
21. Induksi Benzo(A)Piren	51
22. Pencengkokan Ekstrak Lamun.....	51
23. Eutanasia Mencit.....	51
24. Nekropsi Mencit.....	51
25. Pembuatan Preparat Mikroteknik.....	52
26. Pengamatan Preparat Mikroteknik.....	52
27. Hasil Uji Saponin	52
28. Hasil Uji Steroid.....	52
29. Hasil Uji Tanin.....	52
30. Hasil Uji Alkaloid	52
31. Hasil Uji Flavonoid.....	53
32. Proses Maserasi Lamun	53
33. Proses Fiksasi.....	53
34. Proses Dehidrasi.....	53
35. Proses <i>Cutting</i>	53
36. Proses Pengeringan Lamun	53
37. Penimbangan simplisia	54
38. Penimbangan CMC 1%.....	54
39. Minyak Jagung	54
40. Proses Evaporasi	54
41. Perendaman Lamun.....	54
42. BBLITVET Bogor	54

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Dosis Ekstrak Lamun Pada setiap Kelompok Perlakuan	19
2. Uji Fitokimia Lamun	22
3. Skor Derajat Kerusakan	26
4. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Lamun.	28
5. Anova Berat Badan	55
6. Uji Normalitas	56
7. Uji <i>Kruskal- Wallis</i>	57
8. Uji <i>Mann- Whitney</i>	57

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kajian epidemiologis, pemicu penyakit kanker pada manusia 60-90 % terdapat pada faktor lingkungan (paparan zat karsinogenik seperti golongan *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*, formaldehida, benzena, pestisida, dan logam berat; konsumsi alkohol dan rokok; mikroorganisme seperti virus, bakteri dan jenis lainnya; serta radiasi elektromagnetik, sinar X dan sinar ultraviolet), sementara 10% sisanya merupakan penyakit kanker akibat kelainan genetik (Kartawiguna, 2001 dan Irigaray *et al.*, 2007). Salah satu zat karsinogenik yang kerap dijumpai di dalam kehidupan sehari-hari yaitu benzo(α)piren. Senyawa ini merupakan prokarsinogen kuat golongan *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon(PAH)* sebagai hasil pirolisis lemak pada daging yang dipanggang menggunakan arang dan makanan yang diasap, ditemukan pula pada asap rokok dan asap kendaraan (Terzi *et al.*, 2008).

Benzo(α)piren merupakan radikal bebas yang dapat terakumulasi pada 2 jaringan hati, ginjal, maupun adiposa atau lemak tubuh. Benzo(α)piren mampu membentuk reaksi peroksidasi lipid yang mengakibatkan struktur sel menjadi abnormal dan dapat menyebabkan mutasi pada DNA sehingga berdampak pada gangguan proses replikasi DNA dan mendorong terjadinya karsinogenesis (Elisabeth *et al.*, 2000, Georgieva, 2005, dan Walker, 2009).

Karsinogenesis merupakan proses mikroevolusioner yang dapat berlangsung selama beberapa bulan atau beberapa tahun. Secara umum, karsinogenesis terjadi dalam tiga tahapan yaitu inisiasi, promosi, dan progresi (Benchimol, 1992). Pada tahap inisiasi sebagai proses awal karsinogenesis, senyawa

karsinogenik yang masuk ke dalam tubuh akan membentuk kerusakan pada DNA dalam waktu beberapa menit setelah paparan. Selanjutnya, karsinogenik akan mengakibatkan kerusakan jaringan kronis, perubahan sistem imun tubuh, perubahan susunan komposisi protein tubuh, perubahan gambaran histologis dan perubahan biokimiawi sel tubuh (Ryser, 1975). Paparan zat toksik dan karsinogenik dapat memengaruhi berat. Hal tersebut merupakan respon fisiologis adanya gangguan metabolisme (Agata *et al.*, 2016; Marlinda *et al.*, 2016; Hervidea *et al.*, 2018; Widiastuti dan Khairani, 2018; dan Sa'adah *et al.*, 2016). Secara teori, proses karsinogenesis dapat dihentikan melalui proses perbaikan sel akibat paparan zat toksik dan radikal bebas dengan berbagai zat yang mengandung antioksidan sebagai agen pencegah terjadinya kanker (kemoprotektif). Penelitian mengenai bahan alami yang memiliki potensi sebagai antikanker terus dikembangkan. Salah satu potensi sumber daya alam yang dapat dieksplorasi yaitu daerah pesisir dan laut Indonesia.

Golongan lamun (*Enhalus acoroides* (L. f.) Royle) diketahui mengandung metabolit sekunder yang dapat berperan sebagai antioksidan dan berpotensi sebagai antikanker. Sifat antikanker yaitu asam organik turunan dari asam amino sistein yang mengandung sulfur (*sulfhidril*) (Shuo Tu *et al.*, 2015; Amudha *et al.*, 2017, dan Vijayaraj *et al.*, 2017). Sedikitnya penelitian terkait lamun (*Enhalus acoroides* (L.f.) Royle), terhadap perubahan berat badan mencit serta perubahan histologi hepar mencit jantan (*Mus musculus* L.), yang diinduksi benzo(α)piren. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk melihat potensi senyawa dari lamun tersebut yang diharapkan dapat dijadikan agen kemoprotektif untuk mencegah terjadinya kanker khususnya pada fase awal (inisiasi) sebelum timbulnya jaringan kanker yang dapat bermetastasis (fase promosi dan fase progresi).

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini sebagai berikut:

1. Mengetahui kandungan yang berpotensi sebagai agen kemoprotektif pada ekstrak lamun (*Enhalus acoroides (L.f.) Royle*).
2. Mengetahui dan menganalisis pengaruh kandungan flavonoid dan saponin yang terdapat pada ekstrak lamun terhadap hepar mencit yang telah diinduksi senyawa karsinogenik benzo(α)piren.

1.3 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi lebih lanjut tentang ekstrak lamun yang berpotensi menjadi agen kemoprotektif untuk mencegah terjadinya kanker, dengan melihat perubahan histologi organ hati mencit yang diinduksi Benzo(α)piren.

1.4 Kerangka Pikir

Adanya zat-zat toksik yang bersifat karsinogenik pada tubuh dapat memicu terjadinya terjadinya karsinogenesis. Karsinogenesis sendiri ditandai dengan terbentuknya lesi pada DNA, kemudian pada tahap yang lanjut dapat mengakibatkan kerusakan jaringan, perubahan sistem imun, perubahan susunan protein tubuh dan mengganggu proses biokimiawi sel tubuh. Karsinogenesis dapat dihentikan dengan antioksidan dan antikanker (kemoprotektif), pada kasus tersebut tanaman lamun (*Enhalus acoroides (L.f.) Royle*) diduga memiliki senyawa alami dengan potensi antioksidan dan antikanker sebagai agen kemoprotektif.

Berdasarkan permasalahan tersebut maka penelitian akan dilakukan dengan menguji mencit yang telah diinduksi karsinogenik benzo(α)piren, kemudian diberikan ekstrak lamun, setelah itu dilakukan pengukuran pada organ hepar

mencit untuk melihat berat basah organ, indeks skor organ, skor kerusakan organ dan histologi organ hepar.

1.5 Hipotesis

Adapun hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini yaitu pemberian ekstrak lamun (*Enhalus acoroides (L.f.) Royle*) berpengaruh dalam menurunkan tingkat kerusakan pada histologi hepar mencit yang telah diinduksi benzo(α)piren.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karsinogenesis

Proses karsinogenesis melalui beberapa tahap, yaitu dimulai dari inisiasi, promosi, progresi, sampai terjadi invasif dan metastasis. Dalam keadaan normal, pertumbuhan dan diferensiasi sel diatur oleh protoonkogen (*growth promoting gens*) yang berperan dalam berbagai aspek proliferasi dan diferensiasi sel, di antaranya *gen ras, myc, c-erb*. Di lain pihak, pertumbuhan itu dikendalikan secara ketat oleh antionkogen (tumor suppressor gens), P53, dan beberapa gen lain yang berfungsi menghambat pertumbuhan. Selain kontrol protoonkogen dan antionkogen, sel dikendalikan pula oleh mekanisme kematian sel terprogram (apoptosis), yaitu bertujuan menyingkirkan sel-sel yang sudah tidak dikehendaki (Cotran&Ramzis, 1999).

Pada penelitian dalam biologi molekuler, para peneliti telah banyak mengungkapkan bahwa terjadinya mutasi atau aktivitas onkogen secara berlebihan dan atau inaktivasi maupun mutasi gen supresor dapat menyebabkan proliferasi sel secara tak terkendali, satu atau lebih untai DNA bertambah (amplifikasi) atau hilang atau translokasi resiprokal maupun nonresiprokal sehingga terjadi rekombinasi DNA yang salah. Mutasi gen ini menyebabkan sel berfungsi abnormal (Havieb B Rochette, *etc.* 1998). Proses karsinogenesis berlangsung melalui beberapa tahap. Tahap awal adalah proses inisiasi, yaitu proses yang melibatkan sel target

oleh rangsangan karsinogen yang menyebabkan pertumbuhan gen yang ireversibel. Sel yang terinisiasi belum dapat dideteksi sebelum terjadiperubahan fenotip. Proses yang kedua adalah proses promosi, misalnya seseorang yang terus menerus merokok atau terjadi infeksi virus kronis. Selanjutnya, proses progresi yaitu dengan terjadinya pengaktifan mutasi dari onkogen atau inaktivasi mutasi dari tumor suppressor gen (Heidifieg1, *etc.* 2006)

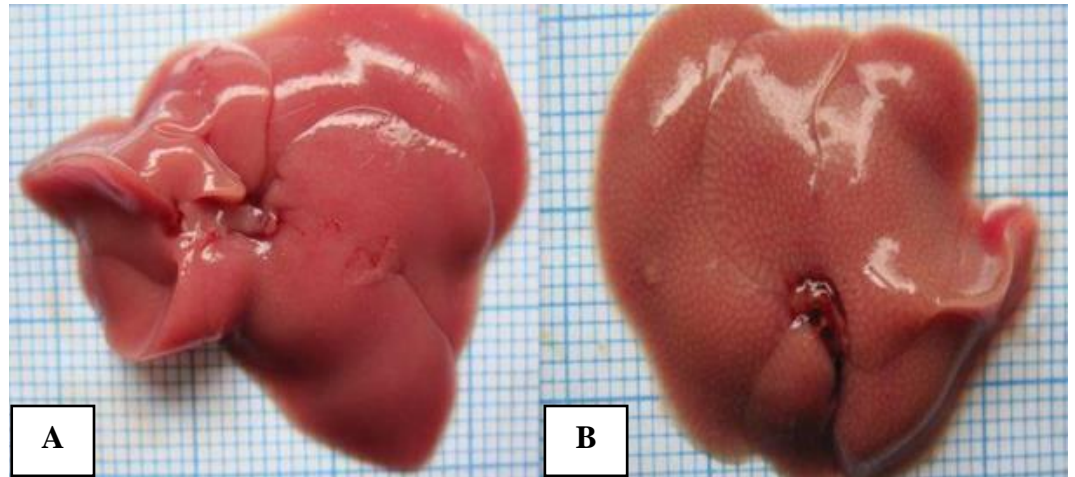
2.2 Hepar

Hepar merupakan organ tubuh yang rentan mengalami kerusakan. Hal ini terjadi karena hepar mempunyai peran penting dalam proses metabolisme, konjugasi dan detoksifikasi, sehingga pemaparan berbagai bahan toksik akan memperparah kerusakan hepar (Underwood, 2000). Kerusakan hepar dapat disebabkan oleh peradangan yang sebagian besar merupakan akibat infeksi virus, paparan alkohol, keracunan obat-obatan atau bahan kimia (Yenny *et al.*, 2010).

2.2.1 Anatomi Organ Hepar

Secara anatomi, hepar merupakan organ viseral terbesar pada tubuh. Hepar terletak di bawah diafragma dan di atas *cavitas abdominalis*, tersusun atas dua lobus yang masing-masing berfungsi secara mandiri. Kedua lobus tersebut yakni lobus *hepatis dextra* (berukuran besar) dan lobus *hepatis sinistra* (berukuran kecil). Hepar menerima darah dari dua sumber yaitu 30% berasal dari arteri hepatica propria dan 70% berasal dari vena porta. Darah dari arteri dan vena pada hepar berjalan di antara sel-sel hepar melalui sinusoid dan dialirkan ke vena sentralis yang akan bermuara ke vena hepatica. Sistem syaraf pada hepar tersusun atas syaraf simpatis dan parasimpatis (Moore *et al.*, 2002; Sloane, 2004 dan Snell, 2006). Hepar dibungkus oleh jaringan fibrosa tipis yang tidak elastis yang disebut capsula fibrosa perivascularis (Glisson) dan sebagian tertutupi oleh lapisan

peritoneum (Wibowo & Paryana, 2009). Lipatan peritoneum membentuk ligamen penunjang yang melekatkan hepar pada permukaan inferior diafragma (Waugh & Grant, 2011). Dalam keadaan segar, hepar berwarna merah tua atau kecoklatan yang disebabkan oleh adanya darah yang sangat banyak dalam organ ini (Leeson *et al.*, 1996).



Gambar 1. (A) Hepar mencit normal, (B) Hepar mencit abnormal dengan warna pucat dan berbintik.
Sumber (Wardanella, 2008)

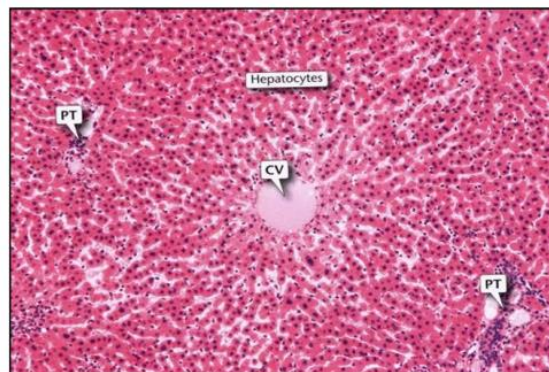
Lobulus-lobulus hepatis adalah penyusun hepar. Vena sentralis pada masing-masing lobus bermuara ke vena hepatica dan di antara lobulus-lobulus terdapat canalis hepatis, yang berisi cabang-cabang arteria hepatica, vena porta, dan sebuah cabang dari ductus choledochus (trias hepatis).

Darah arteri dan vena berjalan di antara sel-hepatosit melalui sinusoid dan dialirkan ke vena sentralis (Snell, 2012). Ligamentum falciforme memisahkan lobus dexter dan lobus sinister dan diantara kedua lobus ini terdapat porta hepatis, yang merupakan jalur masuk dan keluar antar pembuluh darah, saraf, dan ductus (Sloane, 2004). Ligamentum ini memiliki pinggir bebas dan berbentuk bulan sabit dan terdapat ligamentum teres hepatis yang merupakan sisi vena umbilicalis. Ligamentum falciforme berjalan ke permukaan anterior dan kemudian ke permukaan superior hepar serta akhirnya membelah menjadi dua lapis. Lapisan kanan akan membentuk lapisan atas ligamentum coronarium dan lapisan kiri

membentuk lapisan atas ligamentum triangulare. Bagian kanan ligamentum coronarium dikenal sebagai ligamentum triangulare dextrum (Snell, 2012). Ligamentum falciforme berjalan dari hepar ke diaphragma dan dinding anterior abdomen. Permukaan hepar diliputi oleh peritoneum visceralis, kecuali daerah kecil pada permukaan hepar diliputi oleh peritoneum visceralis, kecuali daerah kecil pada permukaan posterior yang melekat langsung pada diaphragma (Price & Wilson, 2012).

2.2.2 Histologi Hepar

Secara histologi, hepar dibungkus oleh simpai tipis jaringan ikat yang disebut kapsula Glisson yang menebal di hilus (tempat masuknya vena porta, dan arteri hepatica, tempat keluarnya duktus hepatica kiri dan kanan serta tempat keluarnya pembuluh limfe dari hepar). Pembuluh-pembuluh dan duktus pada hepar dikelilingi oleh jaringan ikat (Junquiera *et al.*, 2007). Junquiera *et al.* (2007) menjelaskan bahwa hepar tersusun atas satuan heksagonal yang dinamakan lobulus. Di dalam lobulus hepar, terdapat sel hepatosit yang berderet secara radier membentuk lapisan sebanyak 1- 2 sel menyerupai susunan bata. Lempengan sel ini mengarah dari tepi ke pusat lobulus kemudian beranastomosis membentuk struktur seperti labirin dan busa, diantara lempengan sel terdapat celah yang mengandung kapiler disebut sinusoid. Sinusoid hepar merupakan suatu saluran yang berliku dan melebar dengan diameter tidak teratur.



Gambar 2. Lobulus Hepar. Keterangan: CV= Vena sentralis, PT= Saluran portal (Pewarnaan H-E Perbesaran 60X
Sumber (Kerr, 2010)

Sel-sel pada asinus hepar dibagi menjadi 3 zona oleh Rappaport berdasarkan sistem aliran darah di dalam lobulus, yaitu: zona 1 yang menerima darah dari arteri hepatica dan vena porta pertama yang disebut zona perifer atau periportal; zona 3 terletak di sekitar vena sentralis, disebut zona sentrilobuler; zona 2 (midzonal) terletak di antara zona 1 dan zona 3 (Suriawinata & Thung, 2007). Sel-sel pada zona 1 merupakan sel yang terdekat dengan pembuluh darah, sehingga sel-sel tersebut kaya akan nutrisi dan oksigen, serta sedikit metabolit-metabolit. Sel-sel pada zona 2 menerima darah dengan nutrisi dan oksigen yang tidak sebanyak pada zona 1. Sel-sel pada zona 3 adalah sel-sel yang paling dekat dengan vena sentralis, sehingga mengandung sedikit oksigen dan nutrisi serta tinggi konsentrasi metabolitnya, akibatnya daerah sekeliling vena sentralis lebih sering mengalami kerusakan (nekrosis) dibanding daerah perifer (Junquiera & Carneiro, 2012). Hepatosit yaitu kumpulan glikogen yang tampak secara ultrastruktural sebagai granula padat elektron yang kasar dan sering berkumpul dalam sitosol dekat dengan RE halus. Hepatosit juga menyimpan trigliserida berupa droplet lipid kecil dan tidak menyimpan protein dalam granula sekretorik, tetapi secara terus menerus melepaskannya ke dalam aliran darah. Lisosom hepatosit sangat penting untuk pergantian dan degradasi organel intrasel. Peroxisom juga banyak dijumpai dan penting untuk oksidasi kelebihan asam lemak. Setiap hepatosit dapat memiliki hingga 50 kompleks golgi yang terlibat dalam pembentukan lisosom dan sekresi protein, glikoprotein dan lipoprotein ke dalam plasma. Pada keadaan tertentu obat yang dinonaktifkan dalam hepar dapat menginduksi penambahan RE halus dalam hepatosit, sehingga kapasitas detoksifikasi hepar meningkat (Janqueira & Carneiro, 2012).

Hepatosit mengeluarkan empedu ke dalam saluran yang halus disebut kanalikulus biliaris (canaliculus bilier) yang terletak di antara hepatosit. Kanalikulus menyatu di tepi lobulus hepar di daerah porta sebagai ductus biliaris. Ductus biliaris kemudian mengalir ke dalam ductus hepaticus yang

lebih besar yang membawa empedu keluar dari hepar. Di dalam lobulus hepar, empedu mengalir di dalam kanalikulus biliaris dari hepar. Di dalam lobulus hepar, empedu mengalir di dalam kanalikulus biliaris ke ductus biliaris di daerah porta, sementara darah dalam sinusoid mengalir ke vena centralis, sehingga empedu dan darah tidak bercampur (Eroschenko, 2012).

Hepatosit tersusun atas ribuan lobulus kecil dan setiap lobulus memiliki 3 sampai 6 area portal di bagian perifer dan suatu vena yang disebut vena centralis di bagian pusatnya. Taut celah juga terdapat di antara hepatosit, yang memungkinkan tempat komunikasi antar sel dan koordinasi aktivasi sel-sel. Zona portal di sudut lobulus terdiri atas trias porta, yaitu jaringan ikat dengan suatu vena (cabang vena porta), arteriol (cabang arteri hepatica), dan ductus epitel kuboid (cabang sistem ductus biliaris) (Junqueira & Carneiro, 2012).

Sinusoid hepar adalah saluran yang berliku-liku dan melebar, diameternya tidak teratur, dan kebanyakan dilapisi sel endotel bertingkat yang tidak utuh. (Gibson, 2003). Lapisan sinusoid tidak utuh, sel endotel berfenestra (endotheliocytus fenestratum) yang menunjukkan lamina basalis yang berpori dan tidak utuh. Sinusoid hepar dipisahkan dari hepatosit di bawahnya oleh spatium perisinusoideum subendotelial. Zat makanan yang mengalir di dalam sinusoid memiliki akses langsung langsung melalui dinding endotel yang tidak utuh dengan hepatosit. Struktur dan jalur sinusoid yang berliku di hepar memungkinkan pertukaran zat yang efisien antara hepatosit dan darah (Eroschenko, 2012).

Hepatosit pada lobulus hepar tersusun radier dari bagian tengah dan berakhir di vena sentralis. Di antara susunan hepatosit tersebut terdapat sinusoid-sinusoid kapiler, dinamakan sinusoid hepar. Sinusoid hepar mengandung sel-sel fagosit dari sel retikuloendotel (sel Kupffer) dan sel-sel endotel (Junquiera & Carneiro, 2012). Sel Kupffer mempunyai inti besar, pucat dan sitoplasmanya lebih banyak dengan cabang-cabangnya meluas

dan melintang di dalam ruang-ruang sinusoid (Leeson *et al.*, 1996). Makrofag ini lebih besar daripada sel-sel epitel dan dapat dikenalkan oleh adanya bahan-bahan yang difagosit di dalamnya (Gartner dan Hiatt, 2012). Sel Kupffer berperan penting pada proses metabolisme eritrosit tua, pencernaan hemoglobin, sekresi protein yang berhubungan dengan proses imunologis dan fagositosis bakteri. Sel ini paling banyak ditemukan pada daerah periportal di lobulus hepar (Junquiera & Carneiro, 2012).

2.3 Karsinogenesis Hepar

Peningkatan atau penurunan ekspresi protein sering terjadi pada kasus kanker hepar, yang mana protein siklus sel, faktor pertumbuhan, dan protein antiapoptosis biasa menjadi faktor pemicunya (King, 2000). Peningkatan ekspresi dan atau mutasi pada N-ras juga ditemukan pada kanker hepar (Adjei, 2001). Selain itu juga terjadi aneuploidi dan perubahan genetik seperti mutasi p53 pada kanker hepar (Kim dan Wang, 2003). Pada HCC telah diketahui adanya Ras yang termutasi, tetapi relative berbeda dengan kanker lain. Ekspresi Ras yang berlebihan ini dapat menaikkan jumlah Myc dalam semua kasus pada HCC dan memberikan kesan bahwa 2 onkogen ini dapat bekerja sama satu dengan yang lain (Macdonald dan Ford, 1997) . Gen tersebut dapat dipengaruhi oleh adanya infeksi virus Hepatitis B dan Hepatitis C.

Hal ini memberi kesan bahwa gen tersebut dapat diaktivasi oleh virus tersebut secara spesifik (Macdonald dan Ford, 1997) . Studi kinetik kanker menemukan adanya berbagai jenis onkogen yang berperan dalam karsinogenesis di hepar. Overekspresi N-ras dan c-myc oleh senyawa karsinogen merupakan abnormalitas genetik yang sering terjadi pada kanker (Peters dan Vousden, 1997).

CYP1A2 di hepar telah diketahui dapat mengaktivasi senyawa prokarsinogen (benzo(a)pyrene) menjadi intermediet reaktif yang berinteraksi dengan nukleofil selular dan akhirnya memicu karsinogenesis

dengan ditandai terjadinya overekspresi N-Ras dan c-myc (Kawajiri *et al.*, 1993). Selain itu ditemukan insiden yang tinggi pada titik mutasi kodon spesifik di p53 suatu tumor supresor gene, pada hepatoseluler yang secara epidemiologis berkaitan dengan aflatoksin. Mutasi pada p53 merupakan penyebab utama kasus kanker hepar di Asia Selatan dan Asia Tenggara (King, 2000) .

2.4 Biologi Lamun

2.3.1 Klasifikasi Lamun

Berdasarkan taksonominya berikut merupakan klasifikasi dari lamun (Guiry, 1999).

Kerajaan: Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Liliopsida

Bangsa : Hydrocharitales

Suku : Hydrocharitaceae

Marga : *Enhalus*

Jenis : *Enhalus acoroides* (L. f.) Royle

2.3.2 Morfologi Dan Manfaat Tumbuhan Lamun

Enhalus acoroides merupakan lamun yang secara morfologis memiliki batang (rimpang) dan sistem perakaran jangkar yang terbenam dalam substrat, yang membuatnya dapat berdiri dengan kuat menghadapi arus dan ombak. Akar *E. acoroides* tidak berfungsi penting dalam pengambilan air, dikarenakan daunnya mampu menyerap nutrisi secara langsung dari dalam air laut. *E. acoroides* berdaun tipis, memanjang seperti pita sekitar 30–150 cm, dengan lebar daun 1,2–1,4 cm dan memiliki saluran air. Ujung daun membulat, tulang-tulang daun sejajar, terdapat 2 – 6 daun pada setiap tunasnya, serta memiliki bunga dengan benang sari yang berukuran besar

dan bunga betina dengan tangkai pendukung yang panjang, yang dapat menghasilkan buah. Lamun jenis *E. acoroides* ini tumbuh pada sedimen medium dan kasar. Pertumbuhan *E. acoroides* terbilang lebih cepat dibandingkan jenis lamun yang lainnya, sehingga kerap mendominasi padang lamun, sebaran vertikal jenis lamun ini dapat tumbuh hingga kedalaman 25 m. *E. acoroides* memiliki peran penting sebagai naungan yang melindungi juvenil ikan (BTNKpS, 2007; Departemen Kelautan dan Perikanan, 2008).



Gambar 3 Lamun *Enhalus acoroides* (L. f.) Royle
Sumber (Nurdini, 2020)

Berdasarkan hasil pemurnian senyawa bioaktif yang dilakukan Qi *et al.*, (2008) disebutkan bahwa ekstrak etanol *E. acoroides* mengandung sebelas senyawa kimia murni, empat diantaranya tergolong dalam golongan flavonoid dan lima lainnya termasuk kedalam steroid. Flavonoid yang diisolasi dari lamun tersebut diketahui memiliki aktivitas *antifeedant* terhadap larva *Spodoptera litura*, antibakteri terhadap beberapa bakteri laut, dan antilarva *Bugula neritina*. Penelitian uji fitokimia lainnya juga pernah dilakukan oleh Dewi *et al.* (2012) dan Santoso, *et al.* (2012), ekstrak metanol dan n-heksan *E. acoroides* mengandung senyawa bioaktif dari jenis flavonoid, alkaloid, steroid, serta dilaporkan mengandung serat larut yang cukup tinggi.

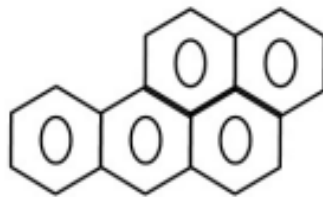
Hasil kromatografi lapis tipis terhadap ekstrak metanol-air dari *E. acoroides* juga dilaporkan mengandung senyawa bioaktif golongan fenolik sebesar 0,2878 mg (setara mg/g tannic acid), kandungan total fenolik yang tinggi pada ekstrak metanol *E. acoroides* dapat menjadi sumber senyawa antioksidan alami (Kannan *et al.*, 2010). Dalam penelitian lain, Kannan *et al.*, (2010) menguji aktivitas antioksidan sampel daun *E. acoroides* secara in vitro, hasil menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan total cukup tinggi yaitu $11,770 \pm 0,026$ mg (setara asam askorbat/g), hasil ini menunjukkan bahwa *E. acoroides* memiliki potensi antioksidan yang kuat, yang dapat digunakan untuk mengobati berbagai penyakit yang terkait dengan stres oksidatif. Lebih lanjut mengenai potensi *E. acoroides* sebagai antioksidan dipaparkan oleh Amudha *et al.* (2017), dimana terdapat korelasi yang kuat antara kandungan total fenolik, flavonoid dan tanin pada ekstrak kasar *E. acoroides* dengan aktivitas penangkal dan pengurangan radikal bebas secara efektif. Dengan demikian, spesies lamun ini berpotensi dapat dikembangkan sebagai agen antikanker dan agen terapeutik.

2.5 Benzo(α)piren

Polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) merupakan produk sisa pembakaran tidak sempurna bahan organik. Istilah PAH merujuk pada senyawa yang hanya terdiri atas atom karbon dan hidrogen. Beberapa anggota PAH memiliki sifat toksik, mutagenik dan atau karsinogenik. Senyawa PAH secara cepat terdistribusi pada berbagai jenis jaringan dan cenderung terlokalisir pada lemak tubuh (Abdel-Shafy dan Mansour, 2016).

Benzo(a)piren (BaP) merupakan salah satu anggota PAH yang memiliki efek karsinogenik (Irigaray *et al.*, 2006; Defois *et al.*, 2017), selain efek tersebut BaP juga menunjukkan efek toksik dan neurotoksik dalam dosis yang tinggi (Saunders *et al.*, 2006).

Benzo(α)piren merupakan senyawa *PAH (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon)* yang tergolong prokarsinogen kuat. Senyawa dengan rumus kimia $C_{20}H_{12}$, memiliki 5 buah cincin alkil aromatik dan memiliki berat molekul 252,3. Benzo(α)piren berbentuk padatan atau kristal berwarna kuning dengan titik leleh $179-179,3^{\circ}C$ dan titik didih $310-312^{\circ}C$. Senyawa ini secara alami ditemukan sebagai bagian dalam dari material larva gunung api, batu bara, dan jatuhnya dari atmosfer yaitu *airborne particulate*. Di lingkungan, benzo(α)piren dijumpai sebagai hasil pirolisis lemak atau pembakaran arang yang tidak sempurna seperti pada daging yang dipanggang menggunakan arang dan makanan yang diasap, ditemukan pula pada asap rokok dan asap kendaraan (Terzi *et al.*, 2008 dan Nebert *et al.*, 2013).



Gambar 4. Struktur molekul Benzo(α)piren
Sumber (Mukhtar *et al.*,2010)



Gambar 5. Sigma Benzo(α)piren Yang diinduksi pada Hewan Uji

Walker (2009) menyebutkan bahwa sebagai senyawa karsinogenik, benzo(α)piren mampu menimbulkan mutasi DNA pada onkogen (gen yang bertanggung jawab pada pertumbuhan dan diferensiasi sel secara normal).

Ikatan kimia antara benzo(α)piren dengan DNA akan mengganggu proses replikasi DNA dan mempengaruhi jaringan pada saat pembelahan sel. Yana (2009) juga menyebutkan bahwa benzo(α)piren dapat merusak DNA dan menimbulkan mutasi pada gen p53 (gen pengatur pertumbuhan). Senyawa ini dapat menyebabkan kerusakan kromosom dengan membentuk aberasi atau patahan kromosom.

Benzo(a)piren secara spesifik menargetkan gen protektif p53, kemudian menonaktifkan kemampuan supresi tumor pada beberapa sel sehingga timbul tumor ganas (Liang *et al.*, 2003). Senyawa benzo(a)piren sering digunakan dalam penelitian untuk menginduksi tumor ganas fibrosarkoma. Tumor ganas atau lebih dikenal dengan istilah kanker merupakan penyakit yang kompleks diakibatkan oleh interaksi antara gen dan lingkungan, dan merupakan salah satu penyebab kematian tertinggi di seluruh dunia (Mattox, 2017).

2.6 Mencit (*Mus musculus*)

Klasifikasi mencit putih menurut Pramono dan Malole (1989) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Mamalia
Bangsa	: Rodentia
Suku	: Muridae
Marga	: <i>Mus</i>
Jenis	: <i>Mus musculus L.</i>



Gambar 6. Mencit (*Mus musculus*)

Mencit telah digunakan sebagai hewan uji penelitian sejak abad ke-19. Mencit banyak digunakan karena memiliki gen yang relatif mirip dengan manusia. Mencit merupakan hewan yang mudah dipelihara, dikarenakan morfologinya kecil, jinak, lemah, mudah ditangani, mengkonsumsi makanan relatif sedikit dan memiliki harga yang relatif murah. Mencit juga memiliki daya reproduksi yang tinggi dengan masa kebuntingan yang singkat (Soegijanto *et al.*, 2003 dan Yuwono, 2009).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Maret- Juni 2022. Untuk aklimatisasi mencit, pembuatan ekstrak lamun serta pembedahan dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Pembuatan preparat histologi bertempat di Balai Besar Penelitian Veteriner (BBLITVET) Bogor.

3.2 Alat dan Bahan

Adapun alat-alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya set peralatan pemeliharaan mencit (bak berbahan plastik berukuran 20x30cm dilengkapi dengan penutup berbahan kawat, wadah pakan, dan botol minum) untuk aklimatisasi mencit, beaker glass, erlenmeyer, set alat ekstraksi (blender, oven, kertas saring, corong buchner, dan rotary evaporator) untuk maserasi lamun *Enhalus acoroides (L. f.) Royle*, neraca analitik untuk menimbang bahan dan mengukur berat badan mencit, jarum suntik untuk menginduksi zat karsinogenik benzo(α)piren, sonde lambung untuk mencekikkan bahan uji, set alat mikroteknik (*stainless steel mold, embedding cassette, waterbath*, inkubator, mikrotom, dan bak pewarnaan) untuk pembuatan preparat organ hepar mencit, object glass, cover glass, mikroskop, serta kamera untuk dokumentasi.

Adapun bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi, hewan uji berupa mencit jantan, lamun (*Enhalus acoroides*), zat karsinogenik

benzo(a)piren, *Etanol For Analysys* sebagai pelarut ekstraksi bahan uji, dan bahan-bahan pembuatan preparat mikroteknik (*xylol*, alkohol bertingkat, parafin, larutan pewarnaan *Harris Hematoxylin Eosin*, dan Entellan).

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan dua sumber data, yaitu data yang diambil secara langsung (data primer) dan data yang diambil secara tidak langsung (data sekunder). Pada data primer penelitian kali ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat kelompok perlakuan, dimana masing-masing perlakuan berisi enam ekor mencit sebagai ulangan, yang kemudian akan diinduksi Benzo(a)piren dengan dosis 0,3 mg/bb/ hari selama 10 hari. Pada penelitian ini, dosis untuk ekstrak lamun tersebut dtambahkan menjadi 3 kelompok berbeda seperti Tabel 1.

Tabel 1. Dosis Ekstrak Lamun (*Enhalus acoroides* (L. f.) Royle) pada setiap kelompok perlakuan

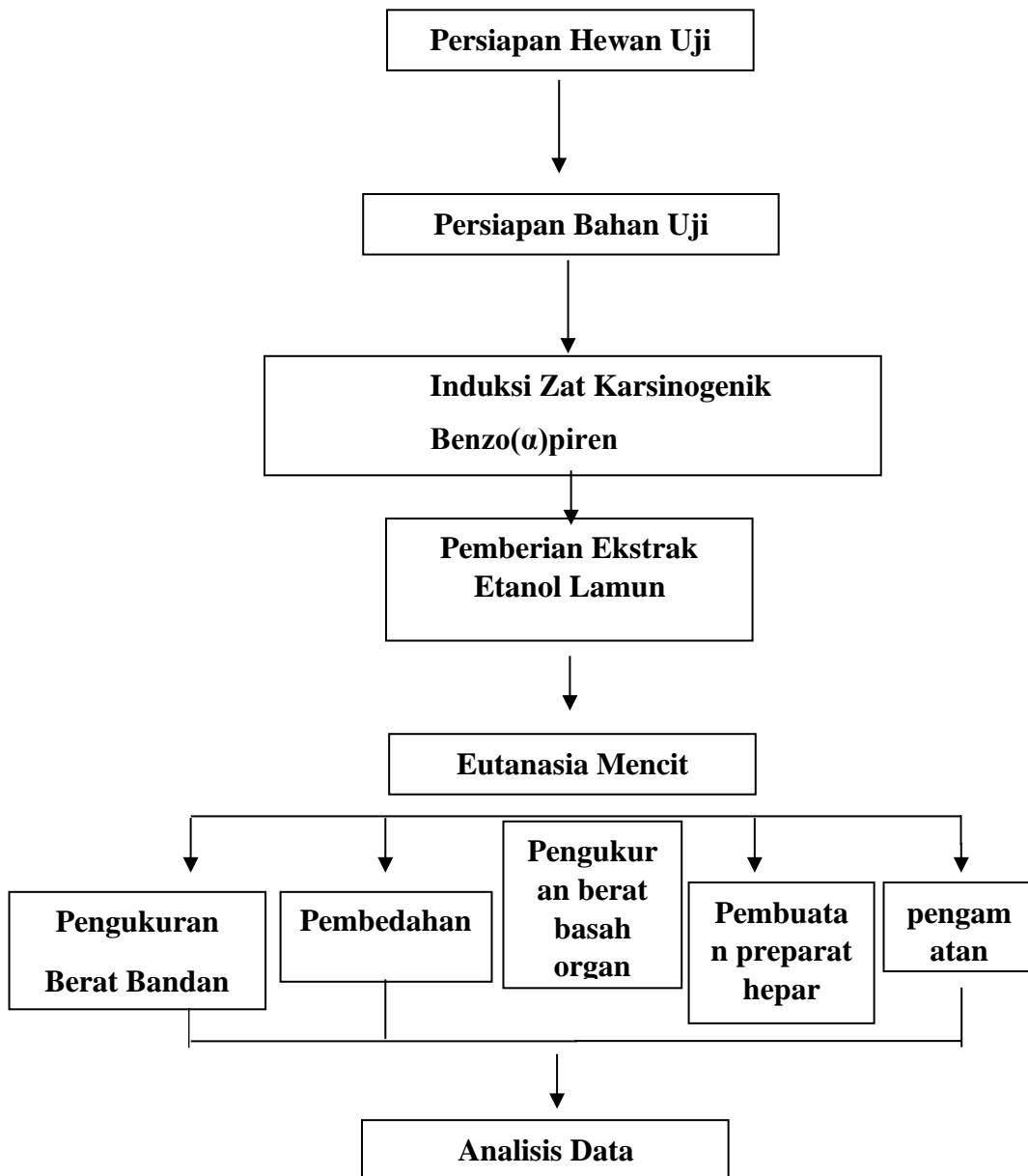
Kelompok Perlakuan	Dosis Lamun (<i>Enhalus acoroides</i>) per mg/bb/hari selama 15 hari
K (-)	Tidak diberi bahan uji
P1	4,4
P2	8,7
P3	17,4

Keterangan: (K-) kelompok kontrol negatif, (P1) Kelompok perlakuan dosis 4,4 mg/hari, (P2) Kelompok perlakuan dosis 8,7 mg/hari, (P3) Kelompok perlakuan dosis 17,4 mg/hari.

Menurut literatur pada penelitian sebelumnya hanya digunakan satu dosis ekstrak lamun sebanyak 4,4 mg/bb/hari selama 15 hari (Khairani *et al.*, 2019).

3.4 Bagan alir Penelitian

Tahapan Penelitian disajikan dalam bentuk alir seperti yang tercantum Pada Gambar 7.



Gambar 7. Bagan Alir Penelitian

3.5 Pelaksanaan

3.5.1 Persiapan Hewan Uji

Hewan uji berupa mencit jantan (*Mus musculus L.*) berjumlah 24 ekor dengan berat badan + 30-35 g. Mencit (*Mus musculus L.*) diperoleh dari Balai Veteriner Lampung. Mencit dipelihara pada lingkungan homogen secara individu di dalam bak berbahan plastik berukuran 20x30 cm dengan penutup berbahan kawat yang dilengkapi wadah pakan, dan wadah air minum.

Aklimatisasi mencit dilakukan selama 7 hari sebelum perlakuan, hal ini bertujuan agar mencit dapat menyesuaikan dengan kondisi laboratorium dan kandang. Selama proses aklimatisasi, mencit diberi pakan standar (pelet) dan air minum secara *ad libitum* (sampai kenyang), namun saat pelaksanaan penelitian mencit diberi pakan ± 14 g per hari.

3.5.2 Persiapan bahan uji

Bahan uji yang digunakan yaitu ekstrak etanol lamun, yang mana pada proses ekstraksinya lamun dikumpulkan kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Kemudian lamun dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 35-40°C selama 48 jam. Selanjutnya dilakukan penggilingan hingga di dapat bubuk kering daun lamun. Proses maserasi dilakukan dengan cara merendam bubuk kering lamun menggunakan pelarut *Etanol For Analysis* selama 1 x 24 jam dengan perbandingan 1 : 10 (1 liter etanol digunakan untuk merendam 500g bubuk kering), hingga diperoleh maserat. Selanjutnya maserat disaring menggunakan corong buchner. Filtrat dari maserat tersebut dipisahkan dengan *rotary evaporator* pada suhu sesuai dengan titik didih etanol yaitu 54,6°C hingga didapat ekstrak kental. Terakhir, ekstrak kental dimasukkan ke dalam oven hingga diperoleh ekstrak dalam bentuk pasta yang siap untuk dilakukan perhitungan dosis.

Ekstrak yang diperoleh tidak dapat dilarutkan dalam akuades, sehingga dibutuhkan emulsifier turunan selulosa untuk memudahkan pelarutan ekstrak, yaitu larutan CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) 1% (1 g CMC dilarutkan dalam 100 ml akuades) (Hervidea, 2018).

3.5.3 Pengujian Fitokimia Ekstrak Etanol Lamun (*Enhalus acoroides*)

Pengujian fitokimia pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa metabolit yang terdapat pada suatu tanaman tersebut. prosedur pengujian fitokimia tertera pada Tabel 2 (Hadi dan Permatasari, 2019).

Tabel 2. Uji Fitokimia Lamun (*Enhalus acoroides*)

Jenis uji	Perlakuan	Indikator
Flavonoid	0,5 ml + 0,5 serbuk Mg + 5 ml HCL pekat	Perubahan warna menjadi merah dan terbentuk busa.
Alkaloid	0,5 sampel + 5 tetes kloform + 5 tetes pereaksi meyer (1 g KI dilarutkan dalam 20 ml aquades dan ditambahkan 0,271 g HgCL ₂)	Perubahan warna menjadi putih kecoklatan dan terbentuknya endapan.
Tanin	1 ml sampel + tetes larutan FeCL ₂	Perubahan warna hijau, biru kehijauan atau biru kehitaman dan adanya endapan.
Saponin	0,5 ml sampel + 5 ml akuades, dikocok dengan kuat kemudian diamkan selama 30 detik	Ketinggian busa 1cm dalam waktu 30 detik

3.5.4 Induksi Zat Karsinogenik Benzo(α)piren

Induksi zat karsinogenik dilakukan dengan cara menyuntikkan larutan benzo(α)piren pada jaringan subkutan mencit di bagian tengkuk. Sebanyak

0,3 mg benzo(α)piren dilarutkan dalam 0,2 ml minyak jagung. Semua kelompok perlakuan (kecuali kontrol negatif) diinduksi dengan benzo(α)piren selama 10 hari kemudian dilanjutkan dengan pemberian zat uji selama 15 hari.

Setelah dilakukan induksi benzo(α)piren, pada hari ke 9, akan terlihat pembengkakan (edema) yang membentuk nodul pada bagian tengkuk, hal ini mengindikasikan adanya efek pemberian zat karsinogenik terhadap fisiologi hewan uji (Juliyarsi dan Melia, 2007).

3.5.5 Pemberian Bahan Uji Ekstrak Etanol Lamun (*Enhalus acoroides*)

Pemberian bahan uji dilakukan dengan cara mencengkokkan per oral kepada masing-masing kelompok perlakuan, dengan dosis yang telah ditentukan selama 15 hari. Dosis ekstrak etanol lamun dalam penelitian ini mengacu dan memodifikasi penelitian Hervidea (2018) yang menggunakan ekstrak etanol makroalga *Gracillaria sp.* dengan dosis 8,7 mg/bb per hari selama 15 hari. Dosis tersebut mampu memperbaiki kerusakan histologi hepar dan ginjal mencit yang diinduksi benzo(α)piren.

3.5.6 Pengukuran Berat Badan Mencit, Pembedahan dan Pengukuran Berat Basah Organ Hepar Mencit

Selama penelitian berlangsung dilakukan pengukuran berat badan mencit pada setiap kelompok. Pengukuran berat badan mencit dibagi menjadi tiga tahap yaitu berat badan mencit hari ke-1 (berat badan awal), berat badan hari ke-10 (berat badan setelah diinduksi benzo(α)piren), dan berat badan mencit hari ke 25 (berat badan akhir penelitian). Pada akhir penelitian, dilakukan pembiusan pada mencit secara inhalasi menggunakan kloroform yang diteteskan pada kapas selanjutnya dilakukan pembedahan dengan mengambil organ hepar mencit, kemudian dilakukan pengukuran berat basah organ hepar tersebut.

3.5.7 Pembuatan Preparat Histologi Hepar Mencit

Proses pembuatan preparat histologi, terdiri dari beberapa tahapan yaitu tahap fiksasi, tahap dehidrasi, tahap embedding, tahap cutting, tahap staining dan tahap mounting (Ali, 2007).

1. Fiksasi

Fiksasi bertujuan untuk menghentikan metabolisme sel secara cepat, sehingga jaringan tidak mengalami autolisis atau membusuk. Potongan organ hepar yang telah dipilih dimasukkan ke dalam larutan fiksatif yaitu buffer formalin 10%. Fiksasi ini dilakukan minimal 24 jam. Setelah dilakukan fiksasi, organ hepar dicuci dengan air mengalir.

2. Trimming

Organ hepar dipotong menjadi ukuran lebih kecil yaitu ± 3 mm, kemudian dimasukkan ke dalam embedding cassette.

3. Dehidrasi, Clearing, dan Impregnasi

Dehidrasi dilakukan dengan merendam organ hati dalam alkohol bertingkat 80% dan 90% berturut-turut masing-masing selama 2 jam. Selanjutnya dilakukan perendaman dalam alkohol 95%, alkohol absolut I, II, III selama 1 jam. Untuk membersihkan sisa alkohol, dilakukan clearing dengan merendam embedding cassette ke dalam larutan xylol I, II, III masing-masing selama 1 jam. Impregnasi dilakukan dengan menggunakan parafin I, II, dan III masing-masing selama 2 jam.

4. Embedding

Parafin yang telah dicairkan dituangkan ke dalam stainless steel mold yang berisi organ hepar dan ditutup dengan embedding cassette 55 hingga terendam seluruhnya dan membentuk suatu blok. Kemudian blok parafin didinginkan dan dimasukkan ke dalam freezer suhu 4°C.

Blok parafin dipotong sesuai dengan letak jaringan menggunakan scalpel dan siap dipotong dengan mikrotom.

5. Cutting

Pemotongan dilakukan pada ruang dingin. Pemotongan dilakukan dengan ketebalan 4 μ m. Hasil pemotongan yaitu berupa pita jaringan tipis. Pita jaringan diapungkan pada air untuk menghilangkan kerutan pada jaringan, lalu dipindahkan ke dalam waterbath selama beberapa detik hingga mengembang sempurna. Setelah itu, pita jaringan diambil dengan object glass (slide) bersih yang telah diberi larutan albumin meyer dan ditempatkan pada bagian sepertiga atas object glass. Slide yang berisi jaringan ditempatkan pada inkubator (suhu 37°C) selama 24 jam hingga jaringan melekat sempurna.

6. Staining

Pewarnaan diawali dengan perendaman slide jaringan dalam larutan xylol I, II, III masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya direndam dalam alkohol absolute I, II, III masing-masing selama 5 menit. Perendaman selanjutnya yaitu dengan aquades selama 1 menit. Potongan organ dimasukkan ke dalam larutan pewarnaan Harris Hematoxylin Eosin selama 20 menit. Slide jaringan dimasukkan ke dalam aquades selama 1 menit dengan sedikit mengoyanggoyangkan organ. Slide jaringan dicelupkan dalam asam alkohol 56 sebanyak 2-3 celupan, lalu dibersihkan dalam aquades bertingkat masing-masing 15menit, dimasukkan dalam eosin selama 2 menit dan berturut-turut dimasukkan dalam alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 96%, alkohol III dan IV masing-masing selama 3 menit. Terakhir slide jaringan dimasukkan ke dalam xylol IV dan V masingmasing selama 5 menit.

7. Mounting

Setelah pewarnaan selesai slide jaringan ditempatkan di atas kertas tisu pada tempat datar, dan ditetesi dengan bahan mounting yaitu kanada

balsam kemudian ditutup dengan *cover glass*. Dalam proses ini jangan sampai terbentuk gelembung udara pada preparat histologi hepar. Pengamatan preparat menggunakan mikroskop. Preparat histologi hepar diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Metode yang digunakan dalam melihat preparat adalah prosedur *double blinded* (Ali, 2007).

3.6 Parameter Penelitian

3.6.1 Parameter utama

Gambaran histologi hepar mencit, dengan cara mengamati kerusakan jaringan pada preparat histologi hepar mencit seluruh kelompok perlakuan, kemudian dilakukan skoring derajat kerusakan pada seluruh lapang pandang. Skoring hepar merupakan akumulasi dari skor dua bagian, yaitu skoring bagian sel hepatosit dan skoring bagian pembuluh hepar (*portal area*). Kriteria skor derajat kerusakan sel hepar mencit mengacu dan memodifikasi prosedur skoring di Balai Besar Penelitian Veteriner (BBLITVET) Bogor (Iskandar *et al.*, 2006).

Tabel 3. Skor Derajat Kerusakan Hepar

Skoring Kerusakan Sel Hepatosit				
Kriteria Kerusakan	Skor		Faktor pengali	Skor
Normal	0		Kerusakan Fokal	1
Degenerasi	1		Kerusakan Regional	2
Nekrosis	2		Kerusakan Difus	3
Infiltrasi Sel Radang	3			
Skoring Kerusakan <i>portal Area</i>				
Kriteria Kerusakan	Skor		Faktor Pengali	
Normal	0		Jumlah pembuluh yang terdeteksi mengalami perubahan (abnormal)	
Dilatasi	1			
Kongesti	2			
Infiltrasi Sel Radang	3			
Infiltrasi Jaringan Ikat	4			

3.6.2 Parameter pendukung

Parameter pendukung yang digunakan pada penelitian ini meliputi :

1. Rerata berat badan mencit yang diukur sebanyak tiga tahap, yaitu berat badan hari ke-1, hari ke-10, dan hari ke-25.
2. Rerata berat basah organ hepar mencit, dilakukan dengan menimbang organ hepar sesaat setelah dilakukan nekropsi (pembedahan).
3. Rerata nilai indeks organ hepar mencit, yang dihitung dengan rumus berikut (Dewi *et al.*, 2014)

$$\text{Indeks hepar} = \frac{\text{Berat Basah Hepar Mencit (g)}}{\text{Berat Badan Mencit (g)}}$$

3.7 Analisis Data

Data profil hepar mencit dianalisis secara deskriptif, sedangkan data lainnya yang bersifat kuantitatif (data yang dinyatakan dalam bentuk angka) dianalisis secara deskriptif dengan metode statistik ANOVA (Analysis of Variance), dengan uji lanjut BNT (Beda Nyata Terkecil) pada taraf nyata 5%. Sementara data yang bersifat kualitatif (data yang dinyatakan dalam bentuk kata-kata, yaitu skoring kerusakan histologi hepar mencit) dianalisis dengan metode statistik *Kruskal-Wallis*, dengan uji lanjut *Wilcoxon–Mann–Whitney* pada taraf nyata 5%.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Adapun kesimpulan dalam penelitian ini yaitu :

1. Ekstrak etanol lamun (*Enhalus acoroides*) memiliki kandungan saponin dan flavonoid
2. Pemberian keseluruhan bahan uji mampu menurunkan tingkat kerusakan pada histologi hepar mencit yang diinduksi senyawa karsinogenik benzo(α)piren. Namun pada dosis 8,7 mg/bb/hari (P2) dan dosis 17,4 mg/bb/hari (P3) diduga lebih baik untuk mempertahankan atau mencegah kerusakan sel hepatosit akibat terpapar senyawa karsinogenik benzo(α)piren dibandingkan dosis 4,4 mg/bb/hari.

5.2 Saran

Saran yang diajukan dalam penelitian ini yaitu :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pemberian benzo(α)piren dengan kadar berbeda untuk mengetahui apakah semakin tinggi konsentrasi benzo(α)piren dapat meningkatkan tingkat mortalitas, laju penghambatan bobot badan

DAFTAR PUTAKA

- Abdel- Shafy, H. I. and Mansour, M. S. M. 2016. A Review On *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* : Source, Environmental Impact, Effect On Human Health And Remediation. *Egypt J Petrol.* 25:107-123.
- Agata, A., E.L. Widiastuti, G.N. Susanto, dan Sutyarso. 2016. Respon Histologi Hepar Mecit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Benzo(α)piren terhadap Pemberian Taurin dan Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*). *Jurnal Natur Indonesia* 16(2): 54-63.
- Adjei, Alex A., 2001, Review: Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy, *J. Nat. Canc. Inst.*, 93(14), 1062-1074
- Amudha, P., V. Vanitha, N. P. Bharathi, M. Jayalakshmi, dan S. Mohanasundaram. 2017. Phytochemical Analysis and Invitro Antioxidant Screening of Sea Grass-*Enhalus Acoroides*. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences* 8(2): 251–58.
- Benchimol, S. 1992. Viruses and cancer. In: Tannock JF, Hill RP, editors. *The basic science of Oncology*, 2nd ed. Mc Graw-Hill. New York.
- Balai Taman Nasional Kepulauan Seribu. 2007. Laporan Rehabilitasi dan Perlindungan Habitat Lamun. BTNKpS. Jakarta.
- Cotran, Ramzis, Vinay Kumar, Tuccercoln. 1999. *Breast Cancer, Pathologic Basic of Disease*, WB Saunders, International Edition, Four Edition: 192-200
- Departemen Kelautan dan Perikanan. 2008. *Kajian Asosiasi Ekosistem Padang Lamun dan Terumbu Karang*. Tri tunggal pratyaksa konsultan. Bandung.

- Dewi, C. S. U., D. Soedharma, dan M. Kawaroe. 2012. Komponen Fitokimia dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Lamun *Enhalus Acoroides* dan *Thalassia Hemprichii* Dari Pulau Pramuka, DKI Jakarta. *Jurnal Teknologi Perikanan dan Kelautan* 3(1): 23–28.
- Elisabeth, J., T. Haryati dan D. Siahaan. 2000. *Polycyclic Aromatik Hydrocarbon*. (PAH): Kaitannya dengan Minyak Sawit dan Kesehatan dalam Warta PPKS (Pusat Penelitian Kelapa Sawit). Medan.
- Eroschenko, VP. 2012. *Atlas Histologi difiore: dengan korelasi fungsional Ed.11*. EGC. Jakarta.
- Gao M, Li Y, Sun Y, Shah W, Yang S, Wang Y, Long J. 2011. Benzo[a]pyrene Exposure Increases Toxic Biomarkers and Morphological Disorders in Mouse Cervix. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 109(5): 398-406.
- Gartner, LP, Hiatt, JL. 2012. *Atlas berwarna histologi, edk 5, diterjemahkan oleh: Gunawijaya, Binarupa Aksara, Tangerang*.
- Georgieva, N.V. 2005. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems—a review. *Bulgarian Journal Veterinary Medicine* 8(1): 1–11.
- Gibson, James L., John M. Ivancevich, dan James H. Donnelly. 2003. *Organizations Behaviour, Structure and Process*. 8th ed. Boston: Richard D. Irwin Inc.

- Guiry, M. D. 1999. *Enhalus acoroides* (Linnaeus f.) Royle. AlgaeBase
Worldwide electronic publication, National University of Ireland,
Galway. Diakses pada 27 November 2018.
http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=21547
- Havieb B Rochette Egiy C Bradey WE. Tumor suppressor effect of retinoic acid
by human epidermoid in cancer cell. *Bros Natt Acad Sci USA*, 1998; 90:
985-989.
- Heidifieg1, Milinger S., Goebell G., Muller E., Heaznewr, Mark C., Petter W,
Laird and Martin, Watchwenter. Breast Cancer DNA Methylation Profile
in Cancer cell and Tumor Stroma, Association with HER2/Neu Status in
Primary Breast Cancer, *Cancerest, American Association for Cancer
Research*, 2006: 29-32.
- Hervidea, R., E. L. Widiastuti, E. Nurcahyani, Sutyarso, dan G.N. Susanto. 2018.
Efek Ekstrak Metanol Makroalga Cokelat (*Sargassum sp.*), Merah
(*Gracillaria sp.*) dan Taurin Terhadap Gambaran Histologi Hepar Mencit
Jantan (*Mus musculus*) yang Diinduksi Benzo(α)Piren. *Jurnal Biologi
Indonesia* 14(1): 123-131.
- Khairani, I. A, E. L. Widiastuti, Yonathan. C, E. Nurcahyani, N. Nurcahyani, dan
H. Satria. 2019. Pemberian Ekstrak Metanol Daun Jeruju (*Acanthus
Ilicifolius L.*), Lamun (*Enhalus acoroides (L. F.) Royle*), Dan Taurin
Terhadap Profil Protein Plasma Darah, Serta Histologi Hepar Mencit
Jantan (*Mus musculus L.*) Yang Diinduksi Benzo(a)Piren. Tesis. Bandar
Lampung.
- Kim, J.W. dan Wang, X.W., 2003, Gene Expression Profiling of Preneoplastic
Liver Disease and Liver Cancer: a new era for improved early detection and
treatment of these deadly diseases, *Carcin*, 24(3), 363-369.

- Irigaray, P., J.A. Newby, R. Clapp, L. Hardell, V. Howard, L. Montagnier, S. Epstein, dan D. Belpomme. 2007. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 61:640-658
- Junqueira, L.C. dan J. Carneiro. 2007. Histologi Dasar Teks Dan Atlas, Edisi ke10. EGC. Jakarta
- Junquiera, LC and Carneiro, J 2012. Histologi dasar, Edisi 10. trans. A Dharma, EGC, Jakarta.
- Kang HW, Jeong SH, Cho MH, Cho JH. 2007. Changes of biomarkers with oral exposure to benzo(a)pyrene, phenanthrene and pyrene in rats. *Journal Veterinary Sci* 8(4): 361- 368.
- Kannan, R. R. R., R. Arumugam, dan P. Anantharaman. 2010. In Vitro Antioxidant Activities of Ethanol Extract from *Enhalus acoroides (L.F.) Royle.*” *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3(11): 898–901.
- Kerr JB 2010, Functional histology, 2nd Ed, Mosby Elsevier, Australia, Pp. 356-357
- King, R.J.B., 2000, Cancer Biology, 2nd Ed., Pearson Education Limited, London.
- Leeson, CR., Leeson, TS., Paparo, AA. 1996. Buku ajar histologi, 5th Ed, trans. J Tambayong, EGC, Jakarta, Hal. 383-396.
- Liang Z, Lippman SM, Kawabe A, Shimada Y, Xu X. 2003. Identification of Benzo(a)pyrene Diol Epoxide-binding DNA Fragments Using DNA Immunoprecipitation Technique. *Cancer Research* 63: 1470-1474

- Macdonald, F., Ford C.H.J., 1997. *Molecular Biology of Cancer*. Bio Scientific Publisher, Oxford, United Kingdom.
- Marlinda, H., E. L. Widiastuti, dan G. N. Susanto. 2016. Pengaruh Pemberian Senyawa Taurin dan Ekstrak Daun Dewa *Gynura segetum (Lour) Merr* terhadap Eritrosit dan Leukosit Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Benzo [α] Piren. *Jurnal Natur Indonesia* 17(1):13-21
- Mattox TW. 2017. *Cancer Cachexia: Cause, Diagnosis, and Treatment*. *Nut Clin Pract* 32: 599-606
- Moore, K.L. dan A. M. R. Agur. 2002. *Anatomi Klinis Dasar*. Hipokrates. Jakarta
- Muljono, D.H. 2004. *Keterlibatan mitokondria pada penyakit hati*. Lembaga Biologi Molekul Eijkman. Jakarta.
- Nebert, D.W., Z. Shi, M. Gálvez-Peralta, S. Uno dan N. Dragin. 2013. Oral Benzo[a]pyrene: Understanding Pharmacokinetics, Detoxication and Consequences—Cyp1 Knockout Mouse Lines as a Paradigm. *Molecular Pharmacology Fast Forward* DOI: 10.1124/mol.113.086637
- Peters, Gordon., dan Vousden, K.H., 1997, *Oncogenes dan Tumor Supressors*, Oxford University Press, New York.
- Price, S. A., & Wilson, L.M., (2012). *Patofisiologi: konsep klinis proses-proses penyakit*, 6 ed. vol. 1. Alih bahasa : Pendit BU, et al. Editor : Hartanto, H., et al. Jakarta: EGC
- Ravasco P. 2019. *Nutrition in Cancer Patients*. *J Clin Med* 8(8): 1211
- Ryser, H. J. P. 1975. *Chemical carcinogenesis*. In: Kruse LC, Reese JL, Hart LK, editors. *Cancer pathophysiology, etiology and management* 4th ed. The C.V. Mosby Co. St. Louis

- Terzi, G., T. H. Çelik dan C. Nisbet. 2008. Determination of benzo[a]pyrene in Turkish döner kebab samples cooked with charcoal or gas fire. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, (47) : 187–19.
- Sa'adah, N. N., A. P. D. Nurhayati dan M. Shovitri. 2016. The Anticancer Activity of the Marine Sponge *Aaptos suberitoides* to Protein Profile of Fibrosarcoma Mice (*Mus musculus*). *IPTEK, The Journal for Technology and Science* 27(3):53-58
- Santoso, J., S. Anwariyah, R. O. Rumiantin, A. P. Putri, N. Ukhty, dan Y. YoshieStark. 2012. Phenol Content, Antioxidant Activity and Fibers Profile of Four Tropical Seagrasses from Indonesia. *Journal of Coastal Development* 15(2): 1410–5217
- Sloane, E. 2004. *Anatomi dan Fisiologi Untuk Pemula*. EGC. Jakarta
- Soegijanto, S., F.A. Ratam, Soetjipto, K. Sudiyana, Y. Priyatna. 2003. Uji Coba Vaksin Dengue Rekombinan pada Hewan Coba Mencit, Tikus, Kelinci dan Monyet. *Sari Pediatri* 5(2): 64 – 71
- Snell, R.S. 2006. *Anatomi Klinik untuk Mahasiswa Kedokteran*, edisi ke-6. EGC. Jakarta
- Snell, R. S. 2012. *Anatomi Klinis Berdasarkan Sistem*. Dialih bahasakan oleh Sugarto L. EGC. Jakarta.
- Shuo, Tu, X. Zhang, D. Luo, Z. Liu, X. Yang, H. Wan, L. Yu, H. Li dan F. Wan. 2015. Effect Of Taurine On The Proliferation And Apoptosis Of Human Hepatocellular Carcinoma Hepg2 Cells. *Experimental and Therapeutic Medicine* 10(1): 193–200.

- Vijayaraj, R., N. S. Kumaran, Swarnakala. 2017. Evaluation of Anti-Tumour Potential of *Acanthus ilicifolius* (Linn.) in HepG2 Cell Line Induced Hepatocellular Carcinoma in Mice. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 9(6):892-897
- Walker, C. H. 2009. *Organic pollutants : an ecotoxicological perspective*. CRC Press. London.
- Waugh, Anne and Grant, Allison. 2011. *Anatomy and Phsysiology in Health and Illness* 10th ed. Singapore : Elsevier.
- Wibowo, Daniel S. Widjaja Paryana. 2009. *Anatomi Tubuh Manusia : Graha Ilmu*, Yogyakarta.
- Widiastuti, E. L. dan I. A. Khairani. 2018. Antioxidant effect of taurine and macroalgae (*Sargassum sp. and Gracilaria sp.*) extraction on numbers of blood cells and protein profile of mice induced by benzo(α)piren. *Journal of Physics: Conference Series* 1116(052073): 1-9
- Qi, SH., S. Zhang, PY. Qian, dan BG Wang. 2008. Antifeedant, Antibacterial, and Antilarval Compounds from the South China Sea Seagrass *Enhalus Acoroides*. *Botanica Marina* 51(5): 441–47.
- Yana, S. 2009. Uji Mutagenisitas Benzo(alfa)piren dengan Metode Mikronukleus pada Sumsum Tulang Mencit Albino (*Mus musculus*). *Cermin Dunia Kedokteran* 36(1):167
- Yuwono. 2009. *Mencit strain CBR Swiss Derived*. Pusat Penelitian Penyakit Menular Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan RI. Jakarta.