

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1. Latar Belakang**

Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu penyakit menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>1</sup> *Mycobacterium tuberculosis* kemungkinan masih menginfeksi sekitar seperempat populasi dunia, meskipun vaksin telah dikenal secara global dan penemuan regimen pengobatan empat obat yang efektif.<sup>2</sup>

Tuberkulosis ditemukan di setiap negara dan kelompok usia yang merupakan salah satu penyebab kematian di dunia. Secara global pada tahun 2019 sekitar 10 juta orang menderita tuberkulosis. Indonesia sendiri menduduki urutan ke-2 di dunia dengan penderita tuberkulosis tertinggi setelah India. Pada tahun 2020 di Indonesia ditemukan sebanyak 351.936 kasus tuberkulosis dengan jumlah kasus tertinggi di beberapa provinsi yang besar yaitu Jawa Barat, Jawa Timur dan Jawa Tengah yang hampir mencapai setengah dari kasus yang dilaporkan yaitu sebanyak 46%.<sup>3</sup>

Salah satu upaya untuk mengendalikan tuberkulosis yaitu dengan pengobatan. etambutol, isoniazid, pirazinamid, rifabutin, rifampisin, dan rifapentin adalah beberapa obat anti tuberkulosis (OAT) lini pertama. streptomisin, kapreomisin, sikloserin, ethionamide, amikacin, levofloxacin, moksifloksasin, dan asam para-aminosalisilat adalah OAT lini kedua.<sup>4</sup> Obat anti tuberkulosis yang paling umum digunakan, yang juga dikenal sebagai HRZE, adalah kombinasi dari empat obat: pirazinamid (PZA), isoniazid (INH), etambutol (EMB), dan rifampisin (RMP). Diantara OAT tersebut, pirazinamid dan isoniazid merupakan obat yang paling sering menginduksi kerusakan hepar atau lebih sering dikenal dengan *drug induced liver injury* (DILI).<sup>5</sup>

Hepar merupakan organ penting bagi manusia di mana organ ini terletak di antara saluran cerna dan sirkulasi. Hepar berperan pula dalam mengurangi paparan zat kimia toksik seperti obat-obatan.<sup>6</sup> Hepatotoksisitas

adalah keadaan yang menyebabkan sel-sel hepar mengalami kerusakan karena zat-zat kimia yang bersifat toksik. Penggunaan rejimen OAT merupakan salah satu penyebab tersering terjadinya hepatotoksisitas.<sup>7</sup> Penggunaan isoniazid sendiri dengan adanya enzim CYP450 akan mengubah metabolit dari isoniazid menjadi senyawa toksik dan menghasilkan senyawa radikal bebas. Sedangkan pada pirazinamid memperlihatkan adanya perubahan nikotinamid kadar asetil dehidrogenase pada hepar yang menghasilkan pembentukan radikal bebas. Stres oksidatif adalah mekanisme utama radikal bebas yang berhubungan dengan obat anti tuberkulosis yang menyebabkan terjadinya hepatotoksisitas serta kerusakan pada hepar.<sup>8</sup>

Berbagai keadaan tersebut menyebabkan penggunaan bahan alam sebagai obat beragam penyakit bertambah tinggi saat ini. Tanaman adalah sumber bahan alam yang banyak dipakai menjadi obat. Senyawa yang ada di tanaman bertanggung jawab atas aktivitasnya terhadap beragam penyakit. Banyak penelitian yang telah dilakukan untuk mengenali senyawa aktif pada tanaman dan memastikan aksi farmakologi dari unsurnya terhadap penyakit. *Annona muricata* Linn, sering disebut sirsak, merupakan salah satunya. *Annona muricata* Linn mengandung berbagai senyawa yang memiliki aksi farmakologis. Acetogenin, alkaloid, dan flavonoid merupakan komponen yang paling aktif dalam *Annona muricata* Linn. Analisis senyawa dalam ekstrak daun *Annona muricata* Linn menunjukkan metabolit sekunder seperti flavonoid, terpenoid, saponin, kumarin, lakton, antrakuinon, glikosida, tanin, dan fitosterol.<sup>9</sup>

Tubuh membutuhkan antioksidan sebagai hepatoprotektor untuk mengurangi efek hepatotoksik akibat obat. Daun sirsak adalah salah satu antioksidan yang dapat mengurangi efek hepatotoksik. Senyawa antioksidan yang terkandung dalam daun sirsak memiliki efek hepatoprotektor yang dapat membantu menghambat proses terjadinya pembentukan radikal bebas sehingga tidak ada kerusakan oksidatif di dalam sel hepar.<sup>10</sup>

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Parapaga pada tahun 2018 mendapati adanya pengaruh daun sirsak terhadap pencegahan kerusakan sel hepar akibat efek toksik obat anti tuberkulosis rifampisin dan menunjukkan gambaran terjadinya regenerasi sel hepar dengan pemberian ekstrak daun sirsak ini. Pada penelitian Parapaga tersebut ekstrak daun sirsak diberikan selama 7 hari dengan dosis 600 mg/kgBB/hari.<sup>10</sup>

Berdasarkan hal-hal tersebut di atas, peneliti tertarik untuk mengetahui efek pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap gambaran histopatologi hepar tikus *wistar* (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi isoniazid dan pirazinamid.

## **1.2.Rumusan Masalah**

Apakah pemberian ekstrak daun sirsak berpengaruh terhadap gambaran histopatologi hepar tikus yang diinduksi isoniazid dan pirazinamid?

## **1.3.Hipotesis**

Pemberian ekstrak daun sirsak dapat mengurangi tingkat kerusakan pada gambaran histopatologi hepar tikus yang diinduksi isoniazid dan pirazinamid.

## **1.4.Tujuan Penelitian**

### **1.4.1. Tujuan Umum**

Mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak terhadap gambaran histopatologi hepar pada tikus yang diinduksi isoniazid dan pirazinamid.

### **1.4.2. Tujuan Khusus**

Mengetahui apakah dengan peningkatan dosis ekstrak daun sirsak akan memberikan pengaruh yang semakin baik terhadap gambaran histopatologi hepar tikus yang diinduksi isoniazid dan pirazinamid.

## **1.5. Manfaat Penelitian**

### **1.5.1. Bagi Peneliti**

Memberikan informasi ilmiah mengenai efek yang ditimbulkan ekstrak daun sirsak terhadap gambaran histopatologi hepar tikus yang telah diinduksi isoniazid dan pirazinamid.

### **1.5.2. Bagi Instansi Kesehatan**

Memberikan informasi tambahan dan pertimbangan penelitian lebih lanjut mengenai sifat ekstrak daun sirsak sebagai bahan alami yang dapat mencegah kerusakan hepar.

### **1.5.3. Bagi Masyarakat**

Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai sifat daun sirsak sebagai salah satu bahan alami yang dapat mencegah kerusakan hepar.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Tanaman Sirsak (*Annona muricata* Linn)

##### 2.1.1. Morfologi Tanaman Sirsak

Tanaman sirsak (*Annona muricata* Linn) memiliki tinggi pohon yang dapat mencapai 10 meter. Daunnya berbentuk lonjong dengan susunan tidak sejajar pada setiap helainya di bagian sisi kiri dan kanan serta mengkilap pada bagian sisi atasnya. Daun agak membundar dan meruncing pada bagian ujung. Bunga dari tanaman sirsak memiliki benang sari dan putik yang biasanya berjumlah banyak. Buah sirsak berbentuk bulat seperti telur dan sering juga tidak beraturan, bagian kulit buahnya berwarna hijau ditutupi oleh tonjolan-tonjolan seperti duri yang agak lunak dan daging buah memiliki rasa yang manis serta aroma yang khas.<sup>11</sup>



Gambar. 2. 1. *Annona muricata* Linn(A) Seluruh tanaman (B) Daun (C) Bunga (D) Buah (E) Biji.<sup>12</sup>

### 2.1.2. Klasifikasi Tanaman Sirsak

Tanaman sirsak ini tersebar di beberapa negara sehingga ada pula perbedaan penyebutan namanya. Di Indonesia tanaman ini disebut sirsak ataupun ada yang menyebutnya nangka belanda. Dalam bahasa Amerika latin disebut guanabana sedangkan dalam bahasa Portugis disebut graviola dan masih banyak nama lainnya.<sup>12</sup> Tanaman ini diklasifikasikan sebagai berikut .<sup>13</sup>

|            |                                |
|------------|--------------------------------|
| Kingdom    | : <i>Plantae</i>               |
| Divisi     | : <i>Spermatophyta</i>         |
| Sub Divisi | : <i>Angiospermae</i>          |
| Kelas      | : <i>Dicotyledonae</i>         |
| Ordo       | : <i>Polycarpiceae</i>         |
| Famili     | : <i>Annonaceae</i>            |
| Genus      | : <i>Annona</i>                |
| Spesies    | : <i>Annona muricata</i> Linn. |

### 2.1.3. Kandungan Daun Sirsak

Salah satu manfaat daun sirsak adalah sebagai antioksidan. Daun sirsak memiliki kandungan antioksidan yaitu senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, triterpenoid, tannin.<sup>14</sup>

### 2.1.4. Aktivitas Farmakologis Daun Sirsak

Aktivitas farmakologis dari daun sirsak sebagai pengobatan diantaranya adalah sebagai antikanker, antihiperlipidemia, antiinflamasi, antibakteri, antifungi/antimikosis dan antioksidan. Ekstrak daun sirsak dapat memperlambat pertumbuhan dan proliferasi sel tumor pada payudara dengan dihambatnya suatu ekspresi protein yang terdapat pada sel kanker yaitu protein Ki-67 sehingga berpotensi mempunyai efek kemoterapi.<sup>15</sup> Ekstrak daun sirsak mampu menurunkan kadar glukosa darah sehingga efektif digunakan sebagai terapi pada hiperglikemia.<sup>15</sup>

Daun sirsak berpotensi pada dosis efektif etanol daun sirsak terendah adalah 0,182 g/kgBB sebagai antiinflamasi. Selain itu, ekstrak daun sirsak

diketahui memiliki efek aditif bila dikombinasikan dengan natrium diklofenak yang digunakan sebagai anti inflamasi. Hal ini memungkinkan pengurangan dosis natrium diklofenak bila digunakan ekstrak daun sirsak.<sup>15</sup>

Ekstrak daun sirsak *Annona muricata* Lin. berpotensi menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus aureus*. Selain memiliki aktivitas antimikroba terhadap *E. coli* dan *Bacillus subtilis*, ekstrak metanol daun sirsak. Senyawa tanin terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dalam suatu fraksi aktif daun sirsak yang diolah dengan obat sintetis *Ciprofloxacin*. Bakteri *Streptococcus mutans* dapat dieliminasi dengan ekstrak metanol daun sirsak pada semua konsentrasi percobaan. Zona hujam lebat yang meluas pada tingkat ekstrak yang mengkhawatirkan. Efektivitas ekstrak daun sirsak juga memiliki kesamaan dengan natrium hipoklorit dalam mencegah pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*. Pengujian ekstrak daun sirsak secara in-vitro dengan menggunakan uji Anova dan Tukey post-hoc test terbukti efektif menurunkan pertumbuhan bakteri *S. mutans*.<sup>15</sup>

Ekstrak etanol daun sirsak membuktikan aktivitas terhadap *Candida albicans* dengan potensi variabel berdasarkan sensitivitas. Hasil yang sama juga diperoleh Wahyuningsih dan Wiryosoendjoyo pada tahun 2019 yang mengatakan bahwa ekstrak infusa daun sirsak memiliki aktivitas daya hambat yang kuat terhadap patogen *Candida albicans* dengan cara memperlambat dan menghilangkan pertumbuhan *Candida albicans*. Selain terhadap jamur *Candida albicans*, daun sirsak juga berperan pada jamur *Pityrosporum ovale* dan *Malassezia furfur*. Daun sirsak juga memiliki daya hambat pertumbuhan jamur *Pityrosporum ovale* pada konsentrasi 70%, 80%, 90%, dan 100%.<sup>15</sup>

Aktivitas antioksidan tinggi pada ekstrak daun sirsak. Hasil ekstraksi antioksidan etanol 96 persen dengan metode DPPH cukup baik. Selain itu, etanol daun sirsak menunjukkan tingkat aktivitas radikal DPPH yang lebih tinggi dari pada ekstrak kenikir dan mutiara. Nilai IC50 ekstrak kenikir dan mutiara adalah sekitar 37,91 g/mL sementara ekstrak etanol daun sirsak

adalah 141.127 g/mL jika diuji dengan metode yang sama yaitu DPPH. Aktivitas antioksidan daun sirsak juga meningkat secara signifikan dalam uji methanol, daun sirsak sebagai respons terhadap kerusakan DNA yang diinduksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>15</sup>

## 2.2. Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)

*Rattus* (tikus) adalah binatang percobaan yang sering digunakan dalam kepentingan penelitian ilmiah. Lama hidup tikus dapat mencapai usia 3,5 tahun dengan tingkat pertumbuhan harian 5 g. Dibandingkan dengan tikus lainnya, tikus laboratorium lebih cepat dewasa, tidak memperhatikan musiman perkawinan, dan lebih cepat berkembang biak. Berat badan tikus dewasa dapat mencapai 450 g.<sup>16</sup>

Hewan coba tikus sering digunakan dalam penelitian dikarenakan hewan tersebut memiliki beberapa keunggulan dibandingkan hewan yang lain, termasuk menjadi model biologis yang lebih layak, lebih mudah ditangani, lebih murah, mampu beradaptasi dengan perilaku manusia, dan dapat dilakukan eksperimen dalam berbagai cara yang biasanya tidak dilakukan pada manusia.<sup>17</sup> Tikus memiliki kemiripan proses biologisnya dengan manusia dalam sistem reproduksi, sistem saraf, penyakit (kanker dan diabetes), dan kecemasannya. Hal ini terjadi karena adanya kesamaan organisasi DNA dan ekspresi gen di mana 98% gen manusia memiliki gen sebanding dengan gen tikus.<sup>16,17</sup>

Taksonomi tikus wistar (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut:

|         |                            |
|---------|----------------------------|
| Kingdom | : <i>Animalia</i>          |
| Filum   | : <i>Chordate</i>          |
| Kelas   | : <i>Mamalia</i>           |
| Ordo    | : <i>Rodentia</i>          |
| Famili  | : <i>Murinae</i>           |
| Genus   | : <i>Rattus</i>            |
| Spesies | : <i>Rattus norvegicus</i> |



Gambar. 2. 2 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*).<sup>18</sup>

Tikus memiliki nilai-nilai fisiologi normal yang dapat dijadikan patokan dalam menentukan kriteria inklusi penelitian dan pemberian intervensi perlakuan penelitian.<sup>16</sup>

1. Suhu tubuh 99,9°F (37,3°C)
2. Denyut jantung 300–500 bpm
3. Respirasi 70–150 kali per menit
4. Berat lahir 5–6 gram
5. Berat dewasa jantan 267–500 gram sedangkan betina 225–325 gram
6. Masa hidup 2–3 tahun (tikus betina dapat hidup lebih lama)
7. Maturitas seksual 37–75 hari
8. Target suhu lingkungan 50–68°F (18–26°C)
9. Target kelembapan lingkungan 40–70%
10. Gestasi 20–22 hari
11. Penyapihan 21 hari
12. Minum 22–33 ml/hari

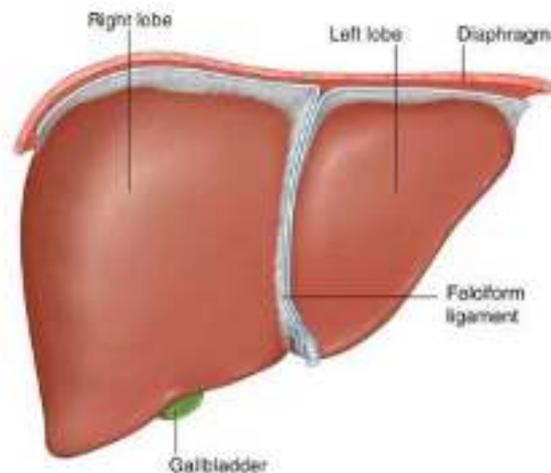
## 2.3. Hepar

### 2.3.1. Anatomi Hepar

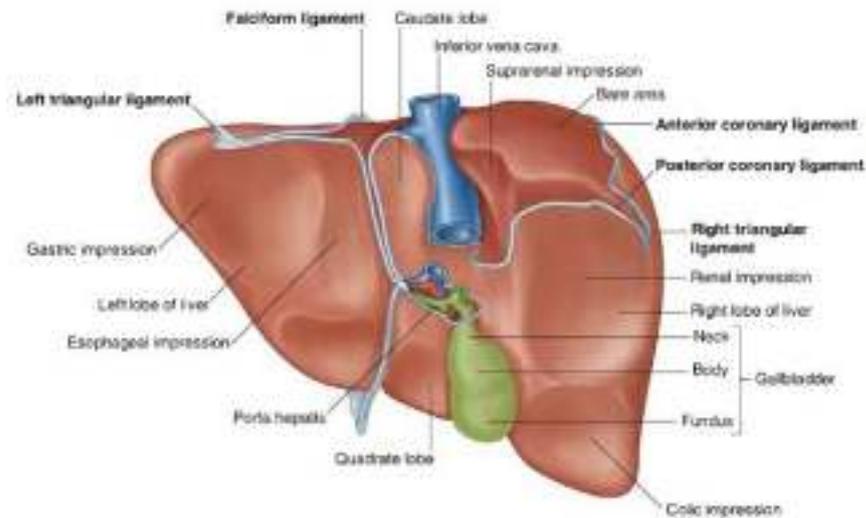
Hepar merupakan organ terbesar tubuh yang kedua setelah kulit. Memiliki berat rata-rata pada orang dewasa yaitu sekitar 1,4 kg. Sebagian

besar hepar menempati hipokondrium kanan berada di daerah epigastrium rongga abdomen pelvis dan lebih rendah dari diafragma. Peritoneum viseral menutupi hampir seluruh bagian hepar.<sup>19</sup>

Hepar terbagi menjadi dua lobus utama yaitu lobus kanan dan lobus kiri. Lobus kanan merupakan lobus terbesar sedangkan lobus kiri memiliki ukuran yang lebih kecil. Lobus kanan hepar tersebut terdiri atas lobus kuadratus dan lobus kaudatus. Lobus kuadratus terletak di bagian permukaan anterior yang dibatasi oleh fisura dari ligamentum teres di sebelah kiri dan fossa dari kantong empedu di sebelah kanan. Lobus kaudatus terletak di bagian permukaan posterior dibatasi oleh fisura dari ligamentum venosum.<sup>20</sup>



Gambar. 2.3 Lobus kanan dan kiri (anterior).<sup>20</sup>



Gambar. 2.4 Bagian hepar dan ligamen (posterior).<sup>20</sup>

Peredaran darah pada hepar berasal dari dua sumber. Arteri hepatic menerima darah teroksigenasi, dan vena portal hepatic menerima darah terdeoksidasi yang mengandung nutrisi, obat-obatan, dan kemungkinan mikroorganisme serta toksin yang baru saja diserap dari saluran pencernaan. Cabang-cabang arteri hepatica dan vena porta darah sinusoidal hepatic tempat oksigen, sebagian besar nutrisi, dan zat toksik tertentu diambil oleh hepatosit. Produk yang dihasilkan oleh hepatosit dan nutrisi yang dibutuhkan oleh sel lain disekresikan ke dalam darah, kemudian ke vena sentral, dan akhirnya ke vena hepatica. Hepar sering menjadi lokasi kanker metastatik yang disebabkan oleh saluran pencernaan karena darah dari saluran pencernaan mengalir melalui hepar sebagai bagian dari sirkulasi portal hepatic.<sup>19</sup>

### 2.3.2. Fisiologi Hepar

Kelenjar terbesar pada tubuh adalah hepar yang mempunyai berbagai macam fungsi. Ada 3 fungsi dasar hepar yaitu memproduksi serta mensekresikan empedu ke dalam saluran pencernaan, berperan dalam metabolisme karbohidrat, lipid, dan protein, juga berperan untuk menyaring darah, menyingkirkan bakteri serta benda asing yang masuk ke dalam peredaran darah.<sup>21</sup>

Hepatosit menghasilkan 800-1000 mililiter empedu, cairan berwarna kuning, agak coklat, ataupun hijau zaitun setiap harinya. Empedu memiliki pH 7,6–8,6 dan kebanyakan terdiri atas air, garam empedu, kolesterol, lipid yang disebut dengan lesitin, pigmen empedu, serta beberapa ion lainnya. Bilirubin merupakan pigmen utama dari empedu. Bilirubin berasal dari heme pada sel darah merah. Bilirubin ini akan disekresikan ke dalam empedu dan akan berlanjut ke usus dimana pada akhirnya akan dipecah. Bilirubin ini pula yang memberikan warna pada feses.<sup>19</sup>

Hepar berperan penting dalam metabolisme karbohidrat terkait penyimpanan glikogen, konversi galaktosa dan fruktosa menjadi glukosa dan glukoneogenesis, serta masih banyak lainnya. Hepar juga memainkan peran penting dalam mempertahankan kadar glukosa darah postprandial yang stabil dengan membuang kelebihan glukosa dari darah dan memulihkannya sesuai kebutuhan yang disebut fungsi buffer glukosa hepar.<sup>22</sup>

Hepar juga terlibat dalam metabolisme lemak. Organ ini mendukung tingkat oksidasi asam lemak yang tinggi untuk mendistribusikan energi ke dirinya sendiri dan ke organ yang lain.<sup>22</sup>

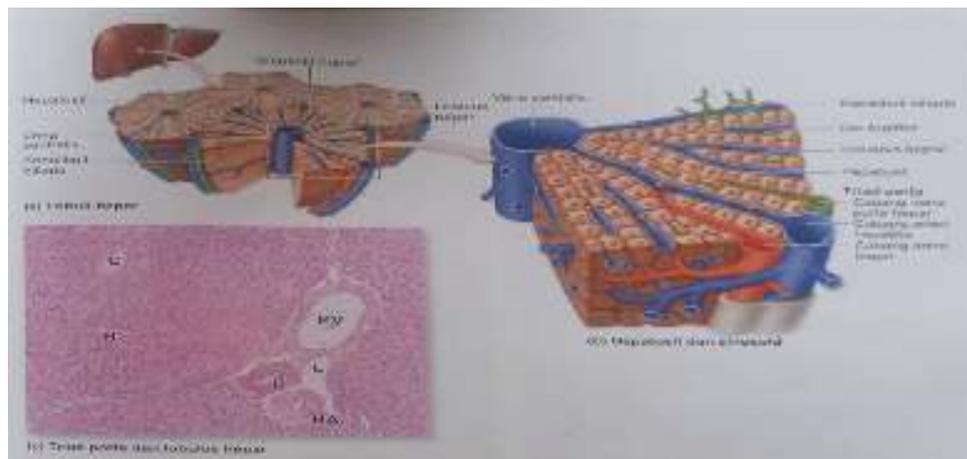
Hepar berperan pula dalam hal mendetoksifikasi darah dari bahan asing atau toksin berupa makanan, obat-obatan dan bahan lainnya ataupun zat-zat yang berasal dari usus atau bagian lain dari tubuh. Enzim sitokrom P450 yang diekspresikan di hepatosit. Mengubah zat asing dan racun lainnya menjadi metabolit tidak aktif yang kurang lipofilik. Reaksi detoksifikasi terdiri dari fase I (oksidasi, hidroksilasi dan reaksi yang dimediasi sitokrom P450) dan fase II (esterifikasi). Metabolit selanjutnya disekresikan ke dalam empedu untuk dieliminasi melalui saluran pencernaan.<sup>22</sup>

### **2.3.3. Histologi Hepar**

Sel utama dari organ hepar adalah hepatosit dengan berbagai fungsi metabolik, eksokrin dan endokrin. Sel hepatosit merupakan sel epitel

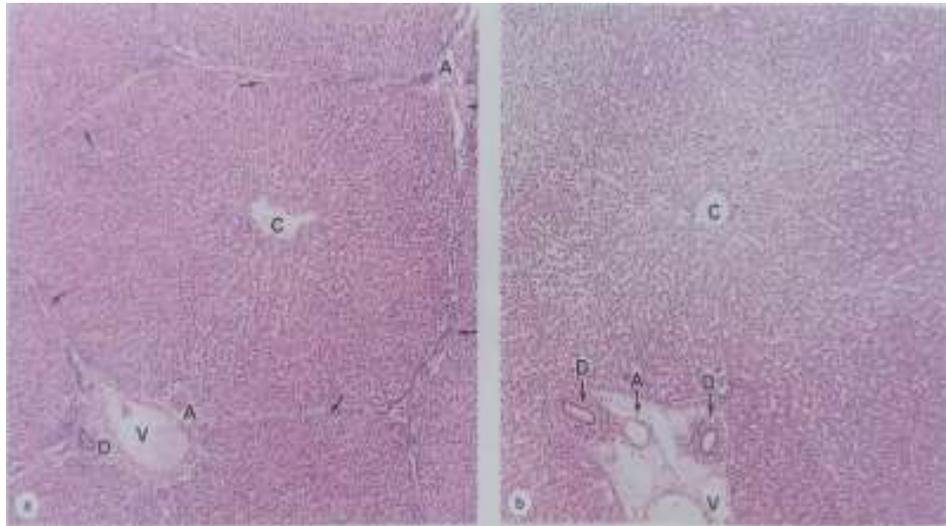
polihedral atau kuboid besar, dengan intinya yang bulat besar di bagian pusat dan sitoplasma eosinofilik yang kaya dengan mitokondria. Parenkim hepar tersusun menjadi ribuan lobuli hepar yang berukuran kecil yaitu 0,7 x 2 mm yang akan menjadi tempat hepatosit membentuk ratusan lempeng yang tidak beraturan dan tersusun dari arah tengah menuju ke luar pada sekeliling vena sentralis yang kecil.<sup>23</sup>

Lempengan hepatosit tersebut ditopang oleh stroma halus dari serat-serat retikuli. Di bagian tepi dari setiap lobus mempunyai 3-6 area porta dengan jaringan ikat fibrosa. Setiap area porta terdiri atas 3 susunan interlobular yang membentuk triad porta. Triad porta terdiri dari venul, arteriol dan duktus biliaris.<sup>23</sup>

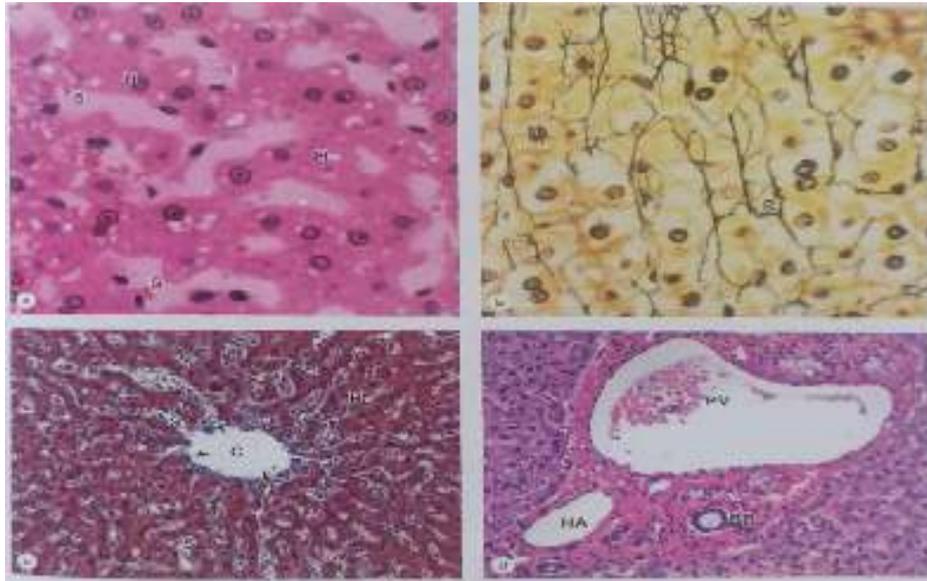


Gambar. 2.5 Hepar terdiri atas ribuan struktur poligonal yang disebut lobuli hepar, yang merupakan unit fungsional dasar organ ini. (a) Diagram menunjukkan vena sentralis kecil di sentral lobulus hepar dan beberapa kumpulan pembuluh darah di bagian perifer. Pembuluh perifer ini berkelompok dalam jaringan ikat saluran porta dan terdiri dari cabang vena porta, cabang arteri hepar, dan cabang duktus biliaris (triad porta). (b) Kedua pembuluh darah pada triad ini bercabang sebagai sinusoid, berjalan di antara lempeng hepatosit dan mengalir ke dalam vena sentralis. (c) Mikrograf sebuah lobulus menunjukkan vena sentralis (C), lempeng hepatosit (H), dan pada area porta di dekatnya sebuah limfatik kecil (L) dan

komponen triad porta: sebuah venul porta (PV), arteriol hepar (HA), dan duktus biliaris (B). (220X; H&E).<sup>23</sup>



Gambar. 2. 6 Lobus hepar. Potongan lintang lobulus hepar adalah unit poligonal yang menunjukkan lempeng sel-sel epitelial disebut hepatosit menyebar dari venul sentralis (C). (a) Lobuli hepar beberapa mamalia, seperti babi, semua sisinya dibatasi oleh jaringan ikat. (b) Pada manusia, lobuli tersebut memiliki jauh lebih sedikit jaringan ikat dan batasnya lebih sulit dibedakan. Pada keduanya, jaringan ikat perifer area porta terdapat triad porta: duktuli biliaris kecil (D), venul (V) cabang vena porta, dan arteriol (A) cabang arteri hepar. (Keduanya 150X, H&E).<sup>23</sup>



Gambar. 2.7 Vaskular mikro lobus hepar.

- (a) Hepatosit (H) adalah sel epitel poligonal yang membentuk lempeng-lempeng bercabang tidak beraturan dipisahkan oleh sinusoid vena (S). (400X; H&E)
- (b) Serat-serat retikulin (kolagen tipe III) (R) terdapat di sepanjang lempeng hepatosit (H), menyokong lempeng tersebut dan sinusoid diantaranya. Sebagian besar jaringan ikat pada hepar ditemukan pada septa dan saluran porta. (400X; Perak)
- (c) Dengan lempeng-lempeng hepatosit (H) tampak menyebar darinya, vena sentralis (C) lobulus mengandung lebih banyak kolagen daripada sinusoid (S) yang lebih kecil, mengalir ke dalamnya (panah) dari segala arah, (200X; Mallory trikrom).
- (d) Area porta perifer mengandung lebih banyak jaringan ikat dan merupakan lokasi triad porta: sebuah venul porta (PV), cabang arteriol yang keluar dari arteri hepar (HA), dan satu atau dua duktuli biliaris (BD). (200X; H&E).<sup>23</sup>

Ada 2 jenis sel penting pada sinusoid lobuli hepar yaitu makrofag stelata (sel Kupffer) dan sel stelata hepar (sel Ito). Makrofag stelata (sel Kupffer) terdapat di dalam lapisan sinusoid, berperan dalam mengenali dan

memfagisitas eritrosit yang sudah tua serta membunuh bakteri yang ada pada darah porta. Sel stelata hepar terdapat di ruang perisinusoid, berperan dalam menyimpan vitamin A dan vitamin yang larut dalam lemak serta menghasilkan komponen matriks ekstrasel yang nantinya akan membentuk miofibroblas setelah terjadi kerusakan pada hepar.<sup>23</sup>

## **2.4. Isoniazid**

### **2.4.1. Mekanisme Kerja**

Mekanisme kerja dari isoniazid yaitu dengan menghambat sintesis daripada asam mikolat yang merupakan suatu komponen yang penting dari dinding sel mikobakterium.<sup>24</sup> Isoniazid ini merupakan prodrug yang diaktivasi oleh enzim katalase-peroksidase:L (KatG).<sup>25</sup>

InhA merupakan target utama dari isoniazid. InhA adalah eynol-acyl carrier protein reduktase yang penting dalam sintesis asam mikolat pada *M.tuberculosis*. *Isonicotinic acyl-NADH adduct* (INA) yang merupakan spesies aktif isoniazid, akan terikat pada InhA sehingga menghambat sintesis asam mikolat. Sintesis ini penting agar dinding sel tetap utuh, namun karena adanya kekurangan biosintesis asam mikolat akan mengakibatkan hilangnya keutuhan dinding sel sehingga sel bakteri menjadi mati.<sup>26</sup>

### **2.4.2 Farmakokinetik**

Absorpsi isoniazid di saluran cerna paling baik pada waktu perut dalam kondisi kosong. Konsentrasi puncak isoniazid dapat berkurang hingga 50% jika dikonsumsi bersamaan dengan makanan berminyak. Dalam waktu sekitar satu sampai dua jam, pada dosis oral 300 mg (5 mg/kg untuk anak-anak) konsentrasi plasma mencapai 3-5 mcg /mL. Isoniazid mudah tersebar di seluruh cairan tubuh dan jaringan. Dalam sistem saraf pusat dan cairan serebrospinal, konsentrasi serum simultan berkisar antara 20% dan 100%.<sup>27</sup>

Metabolisme isoniazid, yaitu asetilasi yang disebabkan oleh hepar N-asetiltransferase hepar, ditentukan dengan pengujian genetik. Dibandingkan

dengan asetilator lambat, konsentrasi plasma isoniazid kira-kira dua kali lebih tinggi dalam asetilator cepat. Pembersihan isoniazid yang lebih cepat disampaikan oleh asetilator sering tidak memiliki konsekuensi terapi, tetapi toksisitas subterapeutik dapat terjadi jika antibiotik diberikan sebagai dosis setiap minggu atau jika ada masalah penyerapan. Metabolit isoniazid dan beberapa obat kecil yang tidak cepat rusak terdeteksi dalam urin. Tidak perlu menyesuaikan dosis untuk gagal ginjal. Dosis penyesuaian tidak didefinisikan sebagai aman untuk orang yang sudah memiliki fungsi sawar darah yang tidak mencukupi dan harus diberikan dengan persetujuan serum jika dosis dianggap perlu. Beberapa enzim Sitokrom P450 dirusak oleh isoniazid, yang menghasilkan peningkatan toleransi obat untuk obat-obatan seperti fenitoin, karbamazepin, dan benzodiazepin. Tetapi bila dikombinasikan dengan rifampisin, yang menyebabkan penginduksi enzim CYP menjadi sangat aktif, efektivitas obat tersebut biasanya berkurang.<sup>27</sup>

### **2.4.3 Efek Samping**

Gejala-gejala berikut merupakan efek samping yang berhubungan dengan sistem saraf, meliputi parestesia, neuritis perifer, gangguan penglihatan, neuritis optik, atrofi optik, tinnitus, vertigo, ataksia, somnolensi, mimpi berlebihan, insomnia, amnesia, euforia, psikosis toksis, perubahan tingkah laku ataupun depresi. Reaksi hipersensitivitas, gangguan saluran cerna dan gangguan hematologi juga dapat dijumpai pada penggunaan isoniazid. Reaksi hipersensitivitas berupa demam, menggigil, erupsi kulit (bentuk morbili, mapulo papulo, purpura, urtikaria), limfadenitis, vaskulitis dan keratitis. Gangguan metabolisme dan endokrin dapat berupa defisiensi vitamin B6, pelagra, ginekomastia, hiperglikemia, glukosuria, asetonuria, asidosis metabolik ataupun proteinuria. Gangguan hematologi yang dapat dijumpai antara lain agranulositosis, anemia aplastik, atau hemolisis, anemia, trombositopenia, eosinofillia dan methemoglobinemia. Hepatotoksik dapat timbul karena adanya gangguan di saluran cerna, mulai dari mual, muntah, nyeri ulu hati, sampai terjadinya

hepatitis yang dapat dinilai dari bilirubinemia serta peningkatan nilai SGOT dan SGPT. Reaksi intoksikasi lain dapat muncul, berupa sakit kepala, takikardia, dispnea, mulut kering, retensi kandung kemih pada pria, hipotensi postural, sindroma lupus eritematosus dan rematik.<sup>26</sup>

## **2.5 Pirazinamid**

### **2.5.1 Mekanisme Kerja Pirazinamid**

Pirazinamid diubah menjadi asam pirazinoat bentuk aktif dari obat oleh pirazinamidase mikrobakteri, yang dikodekan oleh *pncA*. Asam pirazinoat mengganggu membran sel mikrobakteri metabolisme dan fungsi transportasi. Perlawanan mungkin karena gangguan penyerapan pirazinamid atau mutasi pada *pncA* yang mengganggu konversi PZA ke bentuk aktifnya.<sup>27</sup>

### **2.5.2 Farmakokinetik**

Pirazinamid mudah penyerapannya ke dalam usus dan menyebar ke seluruh tubuh. Setelah minum obat selama dua jam, dosis satu gram menghasilkan plasma dengan sekitar 45 ug/mL. Ekskresinya terutama melalui filtrasi glomerulus. Proses eliminasi rata-rata memakan waktu 10 hingga 16 jam.<sup>24</sup>

### **2.5.3 Efek Samping Pirazinamid**

Efek penggunaan PZA antara lain leukemia hepar, arthralgia, anoreksia, mual muntah, disuria, malaise, demam, dan anemia sideroblastik. Selain itu, reaksi hipersensitif termasuk urtikaria, pruritus, dan eksim kulit dapat terjadi akibat fungsi abnormal dari mekanisme darah atau vaskular. Pirazinamid direkomendasikan untuk penderita asam urat aktif atau kerusakan parah hepar. PZA meningkatkan kadar asam urat serum, yang menyebabkan arthralgia non gout. Bila digunakan bersama dengan INH dan /atau RIF, sering menyebabkan hepatotoksitas. Jika masalah hepar atau hiperurisemia yang terkait dengan asam urat atau radang sendi akut berkembang, pirazinamid harus dihentikan dan tidak diminum lagi.<sup>26</sup>

## 2.6. Hepatotoksisitas Isoniazid dan Pirazinamid

*Mycobacterium tuberculosis* (MT) rentan terhadap isoniazid, yang merupakan komponen kunci pada dinding sel bakteri yang dapat mendeteksi infeksi bakteri. Jalur metabolisme primer isoniazid dimediasi oleh enzim N-asetiltransferase (NAT), yang dapat mentransfer asetil dari asetil CoA ke asetil nitrogen dari substrat arylamin dan mengubah isoniazid menjadi asetil. Isoniazid kemudian akan mengalami hidrolisis, yang akan menghasilkan pembentukan isonikotinat dan monoasetil hidrazin. Setelah dipadukan dengan glisin dan diekskresikan keluar tubuh, asam nikotinat. Sebaliknya, monoasetil-hidrazin akan menghasilkan yang pertama dari tiga fase metabolisme yang dapat menghasilkan produk diasetil-hidrazin, hidrazon, atau teroksidasi. Dua generasi pertama dapat diekskresikan keluar, tetapi produk teroksidasi memiliki komponen listrik yang reaktif dan dapat dikonsumsi tanpa menyebabkan hepatotoksisitas. Langkah selanjutnya adalah pengembangan antigenik makromolekul yang merangsang respon imun dan akan menyebabkan terbentuknya metabolit-protein kompleks. Proses ini kemungkinan besar merupakan mekanisme hepatotoksik tunggal yang terjadi setelah pengobatan dengan isoniazid. Hepatotoksisitas isoniazid dan pertahanan enzim NAT terkait. Polimorfisme genetik diduga mempengaruhi fisiologi tubuh dan laju metabolisme, membuat individu menjadi asetilator yang cepat, sedang, dan lambat. Proses asetilasi yang cepat dapat memicu produksi produk samping metabolisme yang bersifat toksik. Pada fenotip asetilator lambat terjadi peningkatan konsentrasi isoniazid dan asetilisoniazid. Pada kelompok ini, isoniazid dapat mengalami hidrolisis menjadi hidrazin, yang dapat menyebabkan kerusakan permanen pada jantung.<sup>28</sup>

Pirazinamid memiliki efek kerusakan hepar yang tergantung pada dosis yang digunakan. Enzim yang aktif dalam metabolisme pirazinamid adalah xantin oksidase dan mikrosomal deamidase. Enzim deaminase mikrosomal mengkatalisis metabolisme pirazinamid untuk menghasilkan asam pirazinoat (POA). Pada akhirnya, xanthin oksidase mengubah POA

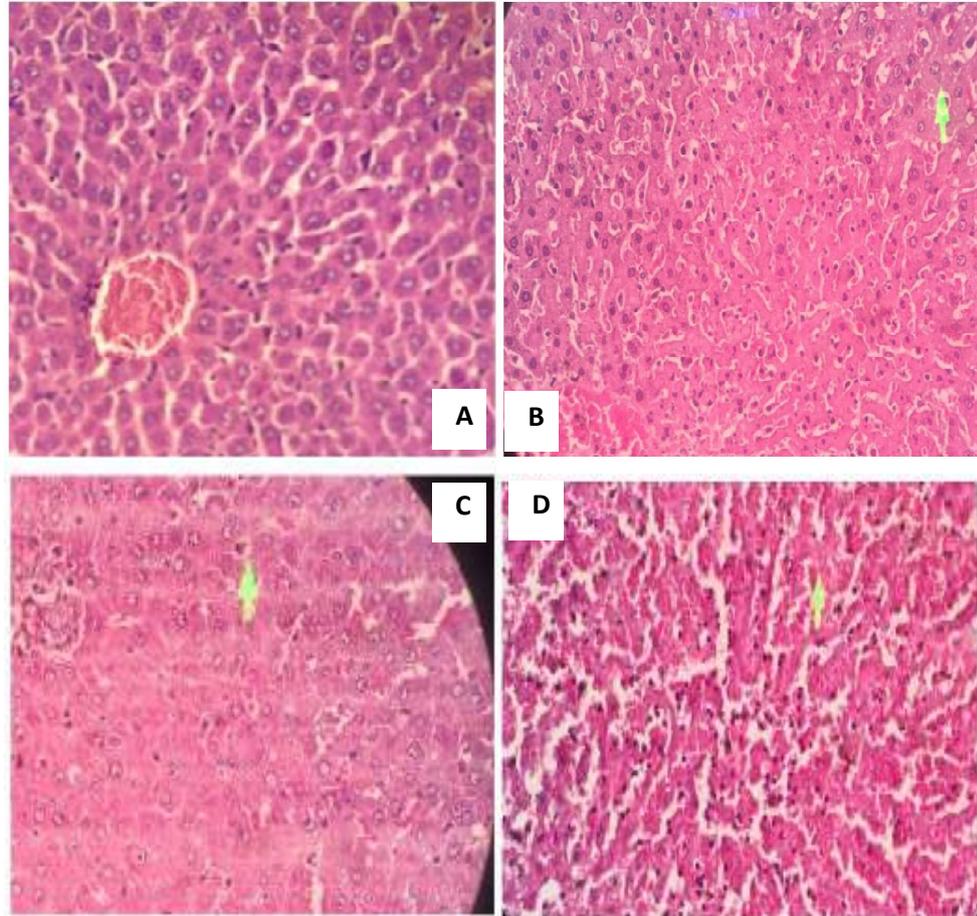
menjadi asam hidroksi pirazinoat/asam hidroksi pirazinoat (5-OH-POA). Pirazinamid memasuki ruang intraseluler bakteri melalui difusi pasif dan diubah menjadi POA oleh enzim pirazinamidase bakteri. Molekul POA kemudian berdifusi secara pasif ke ekstrasel, dan jika pH lingkungan asam, sebagian besar POA akan berubah menjadi HPOA dan kembali ke MTb intrasel. Penghambatan enzim bakteri kunci, asidifikasi lingkungan internal, dan sintesis protein dan RNA adalah semua efek dari mutagenesis HPOA. Berdasarkan studi yang pernah dilakukan terhadap hewan coba mengungkapkan bahwa 5-OH-POA dan POA lebih toksik terhadap sel HepG2 dibandingkan metabolit lainnya. Selain itu, terdapat hubungan antara peningkatan kadar POA dengan kejadian cedera hepar dan metabolit rasial 5-OH-POA. Hal ini menunjukkan bahwa metabolit yang dimaksud adalah penyebab utama penyakit hepar akibat penggunaan pirazinamid.<sup>28</sup>

## **2.7. Kerusakan Hepar**

Tingkat kerusakan hepar tikus dinilai dengan melihat perubahan struktur histopatologi sel hepar tikus menggunakan sistem skoring yang mengacu pada sistem *skoring Manja Roenigk*. Tingkat kerusakan sel hepar menurut *skoring Manja Roenigk* ada 4 tingkatan kerusakan sel hepar dengan gambaran yang berbeda-beda, yaitu normal, degenerasi parenkimatososa, degenerasi hidropik dan nekrosis.<sup>29</sup>

Sel hepar normal berbentuk bulat, mempunyai sitoplasma utuh dan berwarna ungu, membran sel tidak rusak, dan inti sel bulat tidak padat. Degenerasi parenkimatososa terjadi pembengkakkan sel dan kekeruhan sitoplasma. Pada degenerasi hidropik sitoplasma mengalami vakuolisasi, vakuola-vakuola nampak jernih dan terjadi karena peningkatan pemasukan air ke dalam sel dan kemudian air memasuki vakuola-vakuola tersebut, sitoplasma pucat, sel tampak membesar karena akumulasi air dalam sitoplasma namun inti berada di tengah. Nekrosis sel ditandai dengan nukleus mengkerut (piknosis), nukleus pecah menjadi fragmen-fragmen (kariokinesis), nukleus lisis (kariolisis), membran sel mengalami lisis

sehingga batas antar sel tidak nampak jelas. Gambaran nekrosis dapat dilihat pada gambaran sebagai berikut:



Gambar. 2.8 Gambaran histopatologi hepar *skoring Manja Roenigk*; A. Normal; B. Degenerasi parenkimatosa; C. Degenerasi hidropik; D. Nekrosis.<sup>29</sup>

## 2.8. Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan suatu atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan dan elektron yang tidak berpasangan memiliki keadaan yang sangat tidak stabil sehingga menarik pasangannya dengan bergabung ke molekul–molekul lain didekatnya.<sup>30</sup> Adanya molekul yang sangat reaktif untuk menarik elektron molekul lain dalam tubuh yang bertujuan untuk mencapai stabilitas, menyebabkan molekul tersebut berpotensi menyebabkan kerusakan pada biomolekul

dengan cara merusak integritas lipid, protein dan DNA yang mengarah pada peningkatan stres oksidatif.<sup>31</sup>

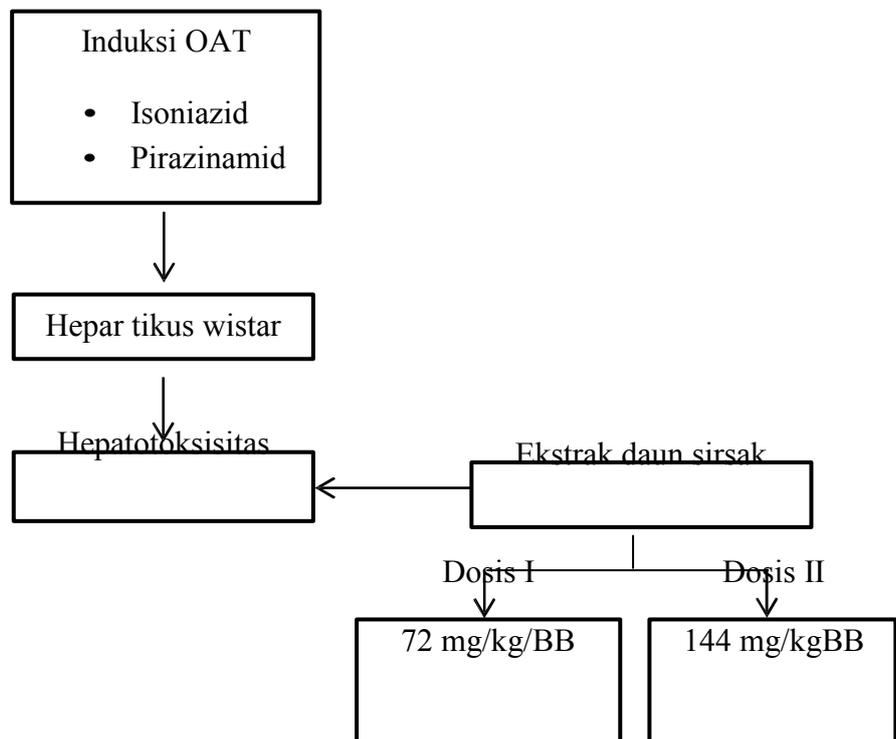
## 2.9. Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa alami yang dapat melindungi sel-sel dalam tubuh dari kerusakan yang terjadi karena adanya suatu molekul yang reaktif yang disebut dengan radikal bebas.<sup>30</sup> Antioksidan dapat diproduksi baik secara endogen maupun eksogen. Antioksidan endogen yang dihasilkan oleh tubuh antara lain yaitu glutation, ubiquinone, dan asam urat. Sedangkan antioksidan eksogen diantaranya yaitu vitamin C, E, dan beta karoten.<sup>31</sup>

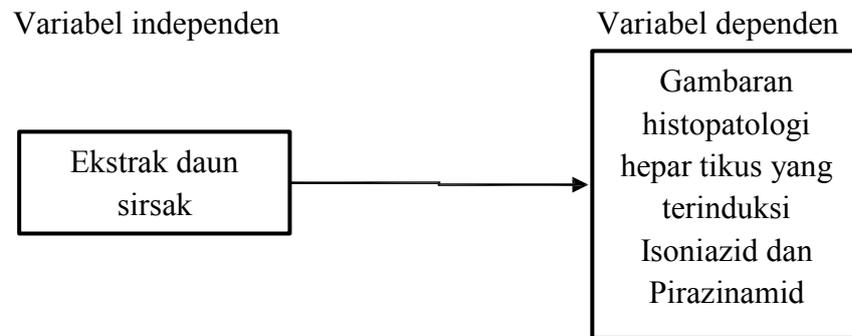
## 2.10. Kaitan Antioksidan dan Radikal Bebas

Antioksidan dapat menetralkan, menurunkan dan menghambat pembentukan radikal bebas karena antioksidan akan menghambat oksidasi dengan menyumbang satu elektron agar radikal bebas yang tadinya tidak berpasangan menjadi berpasangan sehingga dapat terhindar dari kerusakan dan menjaga sel tetap normal.<sup>30,31</sup>

## 2.11. Kerangka Teori



## 2.12. Kerangka Konsep



## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan rancangan *posttest only control group design*, yaitu jenis penelitian yang hanya melakukan pengamatan terhadap kelompok kontrol dan perlakuan setelah diberi suatu tindakan.

#### 3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak dan pemeliharaan tikus dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara. Pembuatan dan pemeriksaan preparat histopatologi tikus wistar (*Rattus norvegicus*) dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Grand Medistra Lubuk Pakam. Penelitian dilakukan mulai bulan September.

#### 3.3. Populasi Penelitian

Seluruh anggota populasi yaitu tikus wistar putih jantan yang memenuhi kriteria inklusi dimasukan kedalam sampel penelitian.

#### 3.4. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang memenuhi kriteria inklusi.

#### 3.5. Estimasi Besar Sampel

Pada penelitian ini tikus dibagi dalam empat kelompok perlakuan yang terdiri dari satu kelompok kontrol negatif (-), satu kelompok kontrol positif (+) (diberi isoniazid + pirazinamid) dan dua kelompok perlakuan (diberi isoniazid + pirazinamid dan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*)) dengan dosis bertingkat. Jumlah tikus yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan pada rumus Federer:

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

Keterangan:

n = jumlah kelompok

$t$  = jumlah sampel tiap kelompok

$$(4 - 1) (t - 1) \geq 15$$

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

$$3t - 3 \geq 15$$

$$3t \geq 18$$

$$t \geq 6$$

Besar sampel =  $n \times t$

$$= 4 \times 6$$

= 24 ekor tikus

Maka untuk 4 kelompok setiap kelompok menggunakan 6 ekor tikus.

### **3.6. Kriteria Inklusi dan Eksklusi**

#### **3.6.1. Kriteria Inklusi**

1. Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain Wistar*)
2. Umur 2 – 3 bulan
3. Berat badan 150 – 200 gram

#### **3.6.2. Kriteria Eksklusi**

1. Tikus yang sudah pernah dipakai dalam penelitian
2. Tikus sakit selama proses penelitian
3. Tikus mati selama proses penelitian

### **3.7. Instrumen penelitian**

#### **Alat**

- Kandang hewan percobaan sebanyak 4 buah
- Sonde
- Alat untuk pembuatan suspensi
- Alat bedah untuk hewan percobaan
- Alat untuk pembuatan preparat histologi
- Mikroskop Olympus BX 53

#### **Bahan**

- Daun sirsak
- OAT Isoniazid dan pirazinamid
- Aquadest

- Makanan hewan percobaan dan air PAM
- Chloroform
- Bahan pembuatan untuk preparat histologi

### 3.8. Prosedur Kerja

Untuk mendapat gambaran secara jelas, jalannya penelitian adalah sebagai berikut.

1. Peneliti meminta izin dengan mengurus Ethical Clearance (EC). Peneliti meminta izin permohonan pelaksanaan penelitian yang akan diajukan pada institusi pendidikan Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen.
2. Mengajukan surat izin penelitian pada laboratorium tempat penelitian.
3. Adaptasi hewan dilakukan selama 1 minggu di *animal house*, dimana hewan uji dikelompokkan dalam 4 kelompok dan masing-masing kelompok diletakkan dalam satu kandang.
4. Pembuatan hewan model kerusakan hepar tikus.  
Dalam pembuatan kerusakan hepar pada tikus dilakukan dengan induksi isoniazid dan pirazinamid secara oral dengan dosis isoniazid 189 mg/hari dan dosis pirazinamid 252 mg/hari pemberian dilakukan selama 14 hari. Terminasi dilakukan pada hari ke-15 selanjutnya dilakukan pembedahan untuk melihat kondisi histopatologi hepar tikus.
5. Pembuatan ekstrak daun sirsak.  
Pembuatan ekstrak daun sirsak dengan pemilihan daun sirsak yang tidak terlalu tua dan tidak pula terlalu muda. Helaiian daun sirsak dibersihkan dari kotoran. Bagian tulang daunnya dibuang, dicuci dengan air bersih, dan ditiriskan untuk mengurangi kandungan airnya lalu ditimbang. Setelah itu dikeringkan di lemari pengering pada suhu  $\pm 40^{\circ}\text{C}$  hingga daun sirsak tersebut menjadi rapuh. Sampel yang telah kering dijadikan serbuk dengan dihancurkan menggunakan blender lalu disimpan dalam wadah kering dan ditutup rapat. Serbuk yang telah kering dimaserasi dimasukkan ke dalam wadah, lalu ditambahkan pelarut etanol 70%

sampai serbuknya terendam. Diamkan dan sambil sekali-kali diaduk selama 5 hari. Selanjutnya rendaman serbuk tersebut dipisahkan maseratnya, lalu dengan cara yang sama ampas dimaserasi kembali dengan pelarut etanol 70% selama 2 hari, dan setelah itu maserat dipisahkan kembali. Hasil dari maserat yang diperoleh digabungkan, kemudian diuapkan dengan alat *rotary evaporator* dengan suhu  $\pm 40$  °C, maka diperoleh ekstrak kental.<sup>32</sup>

6. Perhitungan dosis ekstrak daun sirsak.

Dosis pemberian ekstrak daun sirsak dalam penelitian ini yaitu berdasarkan penelitian sebelumnya yang ditingkatkan dosisnya dimana pemberian ekstrak daun sirsak dengan OAT rifampisin dosis yang digunakan yaitu dosis 400 mg dan 600 mg.

Kelompok perlakuan 1 =  $800 \text{ mg} \times 0,018 = 14,4 \text{ mg}/200\text{g} = 72 \text{ mg}$

Kelompok perlakuan 2 =  $1600 \text{ mg} \times 0,018 = 28,8 \text{ mg}/200\text{g} = 144 \text{ mg}$

72 mg/hari dan 144 mg/hari.<sup>10</sup>

7. Perhitungan dosis OAT isoniazid dan pirazinamid.

Dosis pemberian isoniazid dan pirazinamid dilakukan dengan dikonversikan terlebih dahulu dari dosis manusia ke tikus. Maka dosis manusia dikali dengan 0,018 (berdasarkan konversi tabel Laurence and Bacharach).

Konversi dosis manusia ke tikus:

$$\text{Konversi dosis} = \text{Dosis manusia (mg/kg)} \times \text{Faktor konversi}$$

Dosis toksik isoniazid untuk manusia adalah 30 mg/kgBB/hari.

Maka dosis isoniazid:

$30 \text{ mg/kgBB} \times 70 \text{ kg} = 2.100 \text{ mg/kgBB}$

Konversi dosis =  $2.100 \text{ mg/kgBB} \times 0,018 = 37,8 \text{ mg/kgBB}$

=  $37,8 \text{ mg} \times 1.000/200 = 189 \text{ mg}$

Dosis toksik pirazinamid untuk manusia adalah 40-50 mg/ kgBB/hari.<sup>8</sup>

Maka dosis pirazinamid:

$40 \text{ mg/kgBB} \times 70 \text{ kg} = 2.800 \text{ mg/kgBB}$

$$\begin{aligned}\text{Konversi dosis} &= 2.800 \text{ mg} \times 0,018 = 50,4 \text{ mg/kgBB/hari} \\ &= 50,4 \text{ mg} \times 1.000/200 = 252 \text{ mg}\end{aligned}$$

8. Cara pemberian.

Sebanyak 24 ekor tikus yang sudah dibagi dan diadaptasi menjadi 4 kelompok. Perlakuan terhadap tiap kelompok adalah sebagai berikut:

1. Kelompok Perlakuan 1 diberi makan dan minum tetapi tidak diberi perlakuan dengan isoniazid + pirazinamid dan ekstrak daun sirsak.
2. Kelompok Perlakuan 2 diberikan perlakuan dengan isoniazid 189 mg/kgBB/hari dan pirazinamid 252 mg/kgBB/hari per tikus tanpa diberikan ekstrak daun sirsak selama 14 hari.
3. Kelompok Perlakuan 3 diberikan perlakuan dengan isoniazid 189 mg/kgBB/hari dan pirazinamid 252 mg/kgBB/hari setelah itu 1 jam kemudian diberikan ekstrak daun sirsak dengan dosis 72 mg/kgBB/hari per tikus selama 14 hari secara per oral.
4. Kelompok Perlakuan 4 diberikan perlakuan dengan isoniazid 189 mg/kgBB/hari dan pirazinamid 252 mg/kgBB/hari setelah itu 1 jam kemudian diberikan ekstrak daun sirsak dengan dosis 144 mg/kgBB/hari per tikus selama 14 hari secara per oral.

9. Pengambilan sampel hepar tikus.

Pengambilan sampel hepar tikus putih jantan dilakukan di hari ke-15. Tikus terlebih dahulu dieuthanasia. Setelah itu tikus dibedah lalu diambil organ heparnya dan dimasukkan ke dalam botol yang berisi *Neutral Buffer Formalin (NBF)* 10%.

10. Prosedur pembuatan preparat histopatologi.

Organ hepar tikus yang sudah dimasukkan ke dalam botol yang berisi *Neutral Buffer Formalin (NBF)* 10% kemudian diproses untuk pembuatan preparat histopatologi. Dilakukan pemotongan

spesimen kemudian dimasukkan ke dalam *cassette*. Proses pembuatan preparat dilakukan dengan beberapa tahap yaitu diawali dengan melakukan fiksasi dilakukan untuk memberhentikan aktifitas sel agar tidak membelah dan mencegah sel/jaringan mengalami pembusukan. Tahap fiksasi dilakukan dengan penambahan *Neutral Buffer Formalin (NBF)* 10% selama 2 jam, selanjutnya larutan *Neutral Buffer Formalin (NBF)* 10% selama 1,5 jam. Setelah tahap fiksasi, kemudian dilanjutkan dengan tahap dehidrasi yang bertujuan untuk mengeluarkan air dari dalam jaringan dengan menggunakan alkohol konsentrasi bertingkat dalam waktu tertentu menggunakan empat konsentrasi alkohol yaitu alkohol 70%, alkohol 96%, alkohol 96% dan alkohol absolut (100%). Penggunaan alkohol konsentrasi bertingkat pada proses ini bertujuan untuk mengeluarkan air secara bertahap pada sampel. Tahap *clearing* dilakukan untuk membersihkan sisa alkohol dari jaringan, dilakukan *clearing* dengan xylol I selama 1 jam dan xylol II selama 1,5 jam. Tahap selanjutnya impregnasi yang bertujuan untuk mengeluarkan cairan xylene (*clearing agent*) dari dalam jaringan dan diganti dengan parafin. Tahapan dari proses dehidrasi, *clearing* dan impregnasi tersaji pada tabel.

Tabel 3. 1. Estimasi waktu proses dehidrasi, clearing dan impregnasi

| <b>Proses</b>    | <b>Waktu</b> |
|------------------|--------------|
| NBF 10%          | 2 jam        |
| NBF 10%          | 1,5 jam      |
| <b>Dehidrasi</b> |              |
| Alkohol 70 %     | 1,5 jam      |
| Alkohol 96 %     | 1,5 jam      |
| Alkohol 96%      | 1,5 jam      |
| Alkohol 100%     | 1,5 jam      |

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Alkohol 100%      | 1,5 jam |
| Alkohol 100%      | 1,5 jam |
| <b>Clearing</b>   |         |
| Xylol             | 1 jam   |
| Xylol             | 1,5 jam |
| <b>Impregnasi</b> |         |
| Parafin           | 1,5 jam |
| Parafin           | 2 jam   |

Selanjutnya adalah proses *embedding* yaitu proses pengecoran sampel menggunakan cetakan dengan parafin. Hal ini dilakukan untuk memudahkan saat proses pemotongan. Preparat dipotong dengan ukuran 4  $\mu\text{m}$  menggunakan alat mikrotom. Potongan sampel tersebut kemudian diregangkan dengan terlebih dahulu dimasukkan ke dalam *water bath* yang berisikan air dengan suhu 49°C. Setelah itu sampel diletakkan pada kaca preparat. Kaca preparat kemudian diletakkan di atas *hot plate* agar sampel pada preparat tersebut mengering.

Tahapan selanjutnya adalah pewarnaan (*staining*) agar pengamatan terhadap sel ataupun jaringan menjadi lebih mudah. Pewarnaan sampel dilakukan dengan menggunakan pewarna hematoksilin dan eosin. Setelah proses pewarnaan selesai maka tahap selanjutnya adalah menutup dengan cover glass (*mounting*) dengan menggunakan *entellan* yang merupakan cairan perekat untuk menempelkan *cover glass* pada kaca preparat. Ini dilakukan agar index biasanya rata sehingga tidak kesulitan pada saat pengamatan dilakukan.<sup>33</sup>

#### 11. Pemeriksaan preparat histologi.

Kerusakan hepar tikus diperiksa dengan mengamati preparat histologi dengan menggunakan mikroskop Olympus BX53 dengan perbesaran 400x kemudian lapangan pandang diperiksa dan

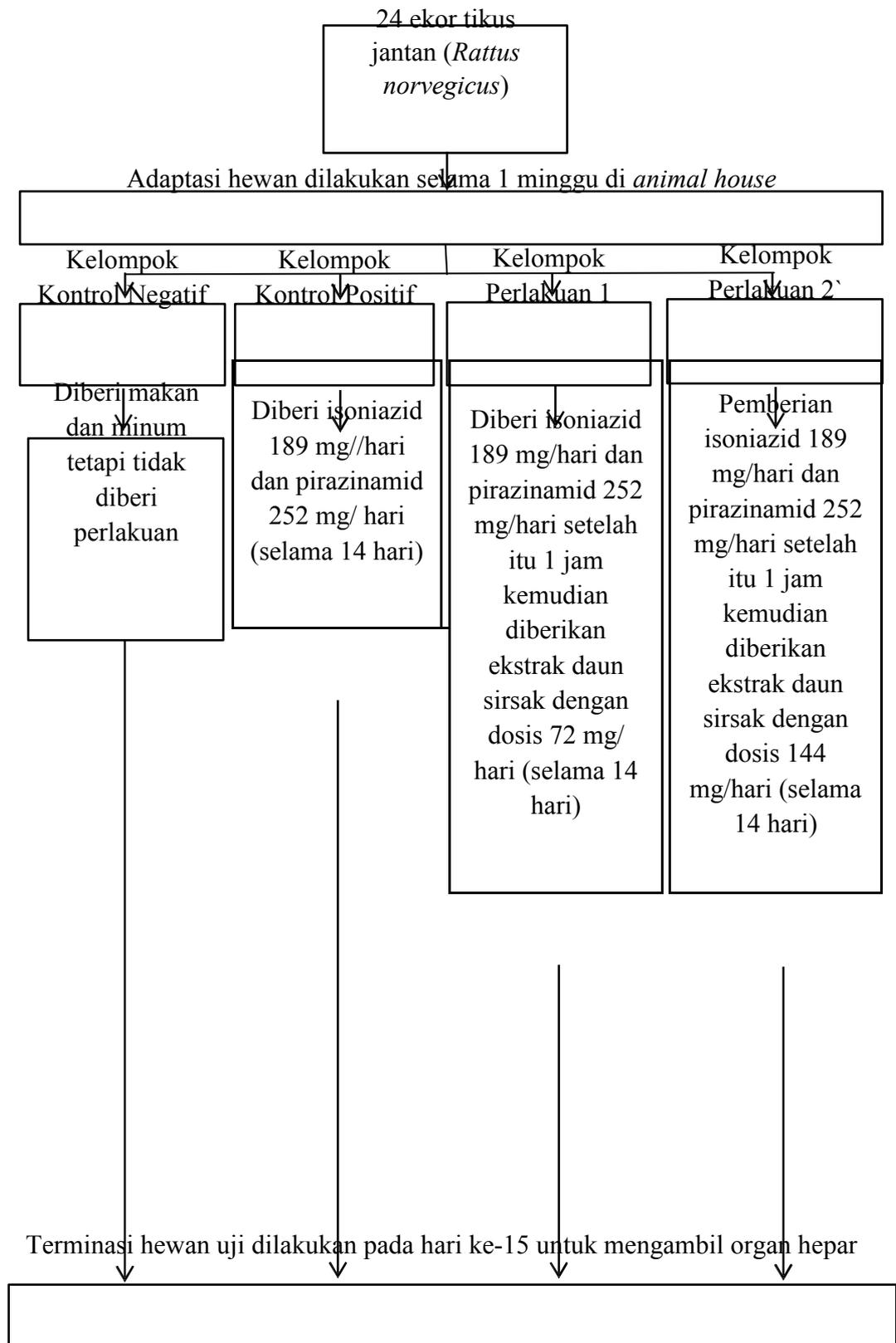
ditentukan perubahan yang terjadi dengan *Scoring Histopathology Manja Roenigk*.

Tabel 3.2. Kriteria Penilaian Derajat Histopatologi Sel Hepar Model *Scoring Histopathology Manja Roenigk*

| Tingkat Perubahan        | Nilai | Kriteria  |
|--------------------------|-------|---|
| Normal                   | 1     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sel bulat</li> <li>• Sitoplasma utuh</li> <li>• Membran sel tidak rusak</li> <li>• Inti sel bulat</li> </ul>   |
| Degenerasi Parenkimatosa | 2     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pembengkakan sel</li> <li>• Sitoplasma keruh</li> </ul>  |
| Degenerasi Hidropik      | 3     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sitoplasma mengalami vakuolisasi</li> <li>• Vakuola tampak jernih</li> <li>• Sitoplasma pucat</li> <li>• Sel tampak membesar</li> <li>• Inti berada di tengah</li> </ul> |
| Nekrosis                 | 4     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nukleus mengerut(piknosis)</li> <li>• Nukleus pecah menjadi fragmen-fragmen(kariokinesis)</li> <li>• Nukleus lisis(kariolisis)</li> <li>• Membran sel lisis</li> </ul>   |

Setelah pengamatan selesai maka hasil penilaian pengamatan berdasarkan parameter dicatat dan disusun ke dalam bentuk tabel. Data kemudian diuji kemaknaannya terhadap pengaruh kelompok perlakuan dengan bantuan program *SPSS*.

### 3.9. Alur Penelitian



### 3.10. Identifikasi Variabel

Variabel penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dan variabel terikat yakni gambaran histopatologi hepar tikus yang diinduksi isoniazid dan pirazinamid.

### 3.11. Definisi Operasional

| No | Variabel   | Definisi Operasional Variabel  | Hasil Ukur (Indikator Variabel)              | Cara Ukur Variabel  | Alat Ukur                     | Skala Ukur Variabel |
|----|--|--|--|---|-------------------------------|---------------------|
| 1. | Ekstrak daun sirsak ( <i>Annona muricata</i> Linn) | Ekstrak daun sirsak ( <i>Annona muricata</i> Linn) diekstrak dengan menggunakan etanol 70% | Dosis I: 72 mg/hari<br>Dosis II: 144 mg/hari | Diberikan secara oral dengan sonde setiap hari selama 14 hari, 1 jam setelah pemberian induksi obat isoniazid dan pirazinamid | Timbangan (Milligram Balance) | Rasio               |
| 2. | Obat anti-tuberkulosis                             | Obat anti-tuberkulosis   | Dosis isoniazid 189 mg/hari                  | Diberikan secara oral   | Timbangan                     | Ordinal             |

|    |   |  |   |  |                       |          |
|----|---|--|---|--|-----------------------|----------|
|    | tuberku<br>losis<br>Isoniazid<br>dan<br>Pirazinamid | is<br>Isoniazid<br>dan<br>Pirazinamid yang<br>mengindu<br>ksi<br>kerusakan<br>hepar              | dan<br>pirazinamid<br>252 mg/hari   | per oral<br>dengan<br>sonde<br>setiap<br>hari<br>selama<br>14 hari | (Miligram<br>Balance) |          |
| 3. | Gambaran<br>histopatologi<br>hepar<br>tikus         | Gambaran<br>histopatologi<br>hepar<br>tikus yang<br>diinduksi<br>isoniazid<br>dan<br>pirazinamid | Derajat<br>kerusakan<br>hepatosit,<br>yaitu:<br>1= normal<br>2=degradasi<br>parenkimatos<br>3=degradasi<br>hidropik<br>4=nekrosis | observasi<br>kerusakan<br>hepar                                    | Mikroskop<br>cahaya   | Kategori |

### 3.12. Analisa Data

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer menggunakan *SPSS* dan dilakukan uji normalitas untuk mengetahui persebaran datanya normal menggunakan uji *Shapiro Wilk*. Apabila didapati datanya tidak terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal-wallis* untuk membuktikan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Hasil uji dikatakan ada perbedaan yang bermakna jika  $p < 0,05$ .