PENGARUH PEMBERIAN KARBON TETRAKLORIDA TERHADAP FUNGSI HATI DAN GINJAL TIKUS

Ruqiah Ganda Putri Panjaitan[1], Ekowati Handharyani[2], Chairul[3], Masriani[4], Zulfa Zakiah[5], Wasmen Manalu[6]

1. Program Studi Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Tanjungpura, Pontianak, Indonesia
2. Bagian Klinik, Reproduksi, dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680
3. Bidang Botani, Puslit. Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong
4. Program Studi Kimia, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Tanjungpura, Pontianak
5. Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Tanjungpura, Pontianak
6. Bagian Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

E-mail: ruqiah_gpp@yahoo.com

Abstrak

Karbon tetraklorida (CCl_4) lazim dipakai sebagai penginduksi kerusakan hati sehingga sering digunakan dalam pengujian aktivitas hepatoprotektor suatu zat. Karbon tetraklorida dosis tunggal 0,1; 1,0; dan 10 ml/kg bobot badan diberikan secara intraperitoneal pada tikus jantan, dan diamati kerusakan yang terjadi pada hati dan ginjal. Kerusakan hati ditandai dengan peningkatan kadar enzim alanin transaminase (ALT), aspartat transaminase (AST), alkali fosfatase (ALP), bilirubin total, dan protein total dalam serum. Peningkatan kreatinin serum merupakan indikator gangguan fungsi ginjal. Lebih lanjut juga dilakukan pengamatan terhadap gambaran histopatologi hati dan ginjal. Dibandingkan dengan kontrol, CCl_4 dosis 0,1 dan 1,0 ml/kg bobot badan mengakibatkan peningkatan ALT dan penurunan AST, dan pada dosis 10 ml/kg bobot badan kadar kedua enzim tersebut sudah sangat turun ($p<0{,}05$). Kadar ALP, bilirubin total, dan protein total semua kelompok tidak berbeda ($p>0{,}05$). Karbon tetraklorida dosis 0,1 dan 1,0 ml/kg bobot badan mengakibatkan peningkatan kreatinin, sebaliknya pada dosis 10 ml/kg bobot badan kadar kreatinin sudah sangat turun ($p<0{,}05$). Gambaran histopatologi kelompok yang mendapatkan 1,0 dan 10 ml CCl_4/kg bobot badan menunjukkan terjadinya steatosis pada sel-sel hati, namun pada glomerulus tidak terlihat adanya perubahan. Karbon tetraklorida menimbulkan kerusakan sebanding dengan dosis yang diinduksikan.

Abstract

The Effects of Carbon Tetrachloride Administration on Liver and Renal Function. Carbon tetrachloride (CCl_4) that induces liver damage is widely used in hepatoprotector experiments. Carbon tetrachloride at a single dose 0,1; 1,0; and 10 ml/kg body weight was administrated intraperitoneally in male rats to investigate liver and renal damage. Liver damage was monitored by increased alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin, and serum total protein. Increased serum creatinine is an indicator of renal problem. Futhermore, liver and renal tissues were subjected to histopathological studies. Compared with control, injection of 0,1 and 1,0 ml CCl_4/kg body weight increased ALT and decreased AST, and at dose 10 ml/kg body weight both ALT and AST decreased to a greater extent ($p<0.05$). Alkaline phosphatase, total bilirubin, and total protein were not different in all treatments ($p>0.05$). Carbon tetrachloride at dose 0,1 and 1,0 ml/kg body weight increased creatinine. However, injection of 10 ml CCl_4/kg body weight decreased creatinine ($p<0.05$). Histopathological studies confirmed the presence of steatosis in hepatic cells at single dose of 1,0 and 10 ml CCl_4/kg body weight, with no significant effect in glomerulus. Administration of single dose of CCl_4 can induce liver and renal damage that dependent on CCl_4 received.

Keywords: Carbon tetrachloride, hepatotoxicity, histopathology of liver and renal

1. Pendahuluan

Karbon tetraklorida (CCl_4) merupakan xenobiotik yang lazim digunakan untuk menginduksi peroksidasi lipid dan keracunan. Dalam endoplasmik retikulum hati CCl_4 dimetabolisme oleh sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) menjadi radikal bebas triklorometil (CCl_3^*) [1,2]. Triklorometil dengan oksigen akan membentuk radikal triklorometilperoxi yang dapat menyerang lipid membran endoplasmik retikulum dengan kecepatan yang melebihi radikal bebas triklorometil. Selanjutnya triklorometilperoxi menyebabkan peroksidasi lipid sehingga mengganggu homeostasis Ca^{2+}, dan akhirnya menyebabkan kematian sel [3].

Penyusun utama membran sel adalah lipid, protein, dan karbohidrat. Lipid yang menyusun membran adalah fosfolipid. Fosfolipid merupakan molekul yang bersifat amfipatik, artinya memiliki daerah hidrofilik dan hidrofobik. Keberadaan dua lapis fosfolipid mengakibatkan membran memiliki permeabilitas selektif, tetapi protein juga ikut menentukan sebagian besar fungsi spesifik membran. Membran plasma dan membran organel memiliki ragam protein yang spesifik. Molekul lipid dan molekul protein pada membran tidak terikat secara kovalen, melainkan melalui interaksi nonkovalen yang kooperatif [4,5].

Asam lemak penyusun membran sel khususnya asam lemak rantai panjang tak jenuh (PUFAs) amat rentan terhadap radikal bebas [6]. Menurut Jeon *et al.* [4] jumlah PUFAs dalam fosfolipid membran endoplasmik retikulum akan berkurang sebanding dengan jumlah CCl_4 yang diinduksikan. Pemberian CCl_4 dalam dosis tinggi dapat merusak endoplasmik retikulum, mengakumulasi lipid, mengurangi sintesis protein, mengacaukan proses oksidasi, menurunkan bobot badan, menyebabkan pembengkakan hati sehingga bobot hati menjadi bertambah, dan pemberian jangka panjang dapat menyebabkan nekrosis sentrilobular serta degenerasi lemak di hati.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari kerusakan sel hati serta gangguan fungsi hati dan ginjal yang terjadi akibat pemberian CCl_4 pada berbagai tingkatan dosis. Lebih lanjut akan dipilih satu dosis untuk digunakan dalam tahap penelitian berikutnya, yakni pengujian aktivitas hepatoprotektor akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.).

2. Metode Penelitian

Waktu dan Tempat Penelitian. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi, Bagian Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi dan Laboratorium Patologi, Bagian Klinik, Reproduksi, dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan IPB.

Hewan Percobaan. Sebelum percobaan dimulai semua hewan coba diaklimatisasi selama kurang lebih tujuh hari untuk beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Hewan coba yang digunakan adalah tikus jantan strain Sprague Dawley umur 2,5-3 bulan dengan bobot badan berkisar antara 200-250 g sebanyak 12 ekor, yang berasal dari Laboratorium Non Ruminansia dan Satwa Harapan, Fakultas Peternakan IPB. Selama masa aklimatisasi, hewan coba diberi makan dengan pakan standar dan minum *ad libitum*.

Karbon Tetraklorida. Sediaan CCl_4 diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi, Bagian Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi. Sediaan diberikan tunggal pada hewan percobaan.

Penentuan Daya Hepatotoksik CCl_4. Hewan coba dibagi ke dalam empat kelompok, tiap kelompok terdiri atas tiga ekor. Kelompok pertama merupakan kontrol (tanpa CCl_4), kelompok selanjutnya dibedakan pada dosis pemberian CCl_4 berturut-turut 0,1; 1,0; dan 10 ml/kg BB masing-masing hanya diberikan satu kali selama percobaan. Pemberian CCl_4 dilakukan dengan penyuntikan secara *intraperitoneal*. Pengamatan dilakukan sampai dengan 24 jam setelah penyuntikan.

Evaluasi Biokimiawi. Fungsi Hati dan Ginjal. Setelah 24 jam pengamatan dilakukan pengambilan sampel darah dari jantung, Untuk mendapatkan serum darah, sampel darah yang diperoleh kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10-15 menit. Kemudian serum dipisahkan ke dalam tabung ependorf. Selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap kadar enzim ALT, AST, ALP, bilirubin total, dan kreatinin dengan menggunakan kit, serta pengukuran protein total dengan menggunakan metode Biuret.

Histopatologi. Hewan dikorbankan dengan cara dislokasi *cervical*, kemudian dibedah untuk mengambil organ. Organ hati yang diambil kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis, selanjutnya difiksasi dengan menggunakan buffer formalin 10%. Jaringan yang telah difiksasi kemudian didehidrasi dengan alkohol mulai dari konsentrasi 70%, 80%, 90%, 95% masing-masing selama 24 jam dilanjutkan dengan alkohol 100% selama 1 jam yang diulang tiga kali. Setelah dehidrasi dilanjutkan dengan penjernihan dengan menggunakan xilol sebanyak tiga kali masing-masing selama satu jam, dilanjutkan dengan infiltrasi parafin. Jaringan kemudian ditanam dalam media parafin. Berikutnya dilakukan penyayatan dengan ketebalan 4-5 mikron. Hasil sayatan dilekatkan pada kaca objek, kemudian diwarnai dengan pewarnaan hematoksilin-eosin (HE) [7].

Analisis Data. Percobaan ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Secara menyeluruh perolehan data kadar ALT, AST, ALP, bilirubin total, kreatinin, dan protein total dianalisis statistik dengan menggunakan program SPSS dan dilanjutkan dengan uji Tukey jika berbeda nyata ($p<0,05$).

3. Hasil dan Pembahasan

Alanin transaminase merupakan enzim sitosol dan terlibat dalam glukoneogenesis. Peningkatan kadar ALT dalam darah terutama disebabkan oleh kerusakan sel hati dan sel otot rangka. Kerusakan hepatosit diawali dengan perubahan permeabilitas membran yang diikuti dengan kematian sel. Aspartat transaminase juga merupakan enzim yang terlibat dalam glukoneogenesis, terdapat di dalam sitosol serta mitokondria sel hati, otot rangka, otot jantung, dan eritrosit. Peningkatan AST dalam darah disebabkan oleh kerusakan hati yang parah dan disertai nekrosis, sehingga enzim dari mitokondria juga ikut keluar sel. Waktu paruh enzim ALT lebih lama dibanding AST [8].

Hasil pengukuran kadar enzim ALT dan AST dalam serum menunjukkan bahwa dosis 0,1 ml CCl_4/kg BB mengakibatkan degenerasi dan nekrosis secara multifokal. Hal ini digambarkan dengan sedikit peningkatan kadar enzim ALT dibandingkan kontrol (Tabel 1). Pemberian 1 ml CCl_4/kg BB mengakibatkan steatosis yang luas, dan digambarkan dengan peningkatan kadar enzim ALT dalam serum sampai dua kali lebih tinggi dibanding kontrol. Kadar enzim AST pada kelompok yang diberi 1 ml CCl_4/kg BB terlihat mengalami penurunan dibanding kontrol. Hal ini mungkin disebabkan karena waktu paruhnya yang pendek sehingga kadar enzim AST pada kelompok ini terlihat lebih rendah dibanding kontrol. Pemberian CCl_4 10 ml/kg BB tampaknya sangat merusak sel hati. Kerusakan yang relatif kecil pada sel hati akan meningkatkan kadar enzim ALT dan AST di dalam darah. Namun, pada tingkat kerusakan yang luas dan parah, ketersediaan enzim ALT dan AST di dalam sel hati sudah sangat rendah akibat kemampuan sel hati dalam mensintesis enzim tersebut sudah berkurang atau hilang sama sekali.

Alkalin fosfatase merupakan enzim yang berperan dalam mempercepat hidrolisis fosfat organik dengan melepaskan fosfat anorganik. Enzim ini terdapat dalam banyak jaringan, terutama di hati, tulang, mukosa usus, dan plasenta. Peningkatan ALP terjadi akibat adanya kolestasis, dan pada obstruksi intra maupun ekstrabiliar enzim ini akan meningkat 3-10 kali dari nilai normal sebelum timbul ikterus [9]. Dari percobaan yang dilakukan terlihat bahwa dengan pemberian CCl_4 0,1 ml/kg BB kadar enzim ALP di dalam darah hewan coba meningkat dibanding kontrol, namun perubahan kadar enzim ini tidak terlalu mencolok dan secara statistik juga dinyatakan tidak berbeda ($p>0,05$). Artinya, pemberian CCl_4 tidak mempengaruhi aliran empedu ekstra dan intrabiliar. Pada pemberian CCl_4 1 ml/kg BB terjadi peningkatan kadar enzim ALP hampir dua kali lipat dibanding kontrol, bahkan pada pemberian 10 ml CCl_4/kg BB kemampuan hati dalam mensintesis enzim ini sudah sangat terganggu akibat terjadinya kerusakan sel hati yang luas dan berat.

Bilirubin merupakan pigmen empedu yang berasal dari sel eritosit tua yang dihancurkan di limpa serta dari sumber-sumber lain seperti mioglobin dan sitokrom. Faktor penyebab peningkatan kadar bilirubin total adalah kebocoran bilirubin dari sel-sel hati atau sel duktuli sehingga bilirubin bisa masuk ke dalam aliran darah dan dapat memasuki semua cairan tubuh seperti cairan otak, cairan asites atau mewarnai kulit, *sclera* dan lain-lain [9]. Dengan pemberian CCl_4 0,1 ml/kg BB terjadi peningkatan kadar bilirubin total dibanding kontrol. Peningkatan ini diduga karena terjadi kebocoran dari sel-sel hati atau sel-sel duktuli.

Sebaliknya, pada pemberian CCl_4 1 ml/kg BB dan 10 ml/kg BB terjadi penurunan bilirubin total secara drastis. Kejadian ini dapat dipahami karena dengan pemberian 1 ml CCl_4/kg BB dan 10 ml CCl_4/kg BB mengakibatkan kerusakan sel-sel hati yang luas dan berat sehingga mengganggu fungsi hati dalam metabolisme bilirubin.

Tabel 1. Rataan kadar ALT, AST, ALP, bilirubin total, protein total, dan kreatinin dalam serum tikus jantan strain Sprague Dawley. Pengambilan sampel darah dilakukan 24 jam setelah pemberian perlakuan (n=3)

Parameter	Dosis CCl_4 (ml/kg BB)			
	0 (Kontrol)	0,1	1,0	10 ,0
ALT (U/L)	$134,57\pm13,48^a$	$161,70\pm7,37^a$	$308,50\pm331,25^a$	$2,67\pm1,67^b$
AST (U/L)	$330,87\pm50,01^a$	$330,67\pm42,00^a$	$260,83\pm176,88^a$	0 ± 0^b
ALP (U/L)	$651,33\pm76,17^a$	$770,00\pm103,20^a$	$1066,67\pm270,14^a$	$854,00\pm276,93^a$
Bilirubin Total (mg/dl)	$1,87\pm2,36^a$	$6,33\pm6,16^a$	$0,98\pm0,95^a$	$0,89\pm0,40^a$
Protein Total (mg/ml)	$122,25\pm4,11^a$	$100,47\pm19,11^a$	$113,52\pm8,92^a$	$116,95\pm8,41^a$
Kreatinin (mg/dl)	$36,79\pm11,46^a$	$52,12\pm8,45^a$	$83,47\pm73,89^a$	$1,82\pm0,821^a$

Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan beda nyata pada uji Tukey dengan taraf 5%

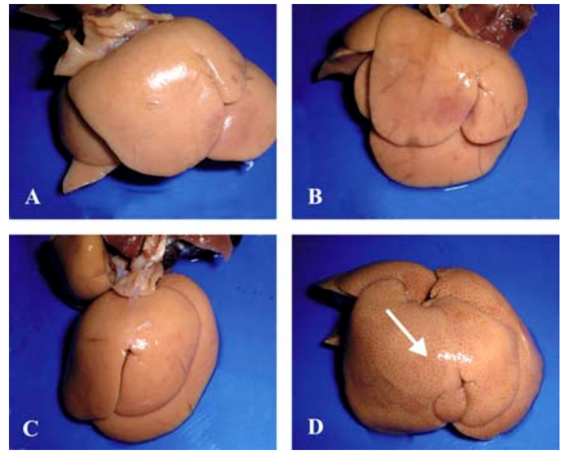
Kadar protein total secara keseluruhan menurun dibanding kontrol, walaupun secara statistik dinyatakan tidak berbeda ($p>0,05$). Terkait dengan fungsi hati dalam mensintesis protein, jika sel-sel hati mengalami kerusakan maka kemampuan hati dalam mensintesis protein juga akan turun [10].

Karbon tetraklorida merupakan penyebab kerusakan hati yang ditandai dengan peradangan akut pada sel-sel hati, yakni terjadinya nekrosis serta steatosis pada bagian sentral lobus [3,11]. Gambaran patologi anatomi menunjukkan bahwa dengan pemberian 10 ml/kg BB CCl_4 terlihat adanya nekrosis *milier* pada permukaan hati (Gambar 1).

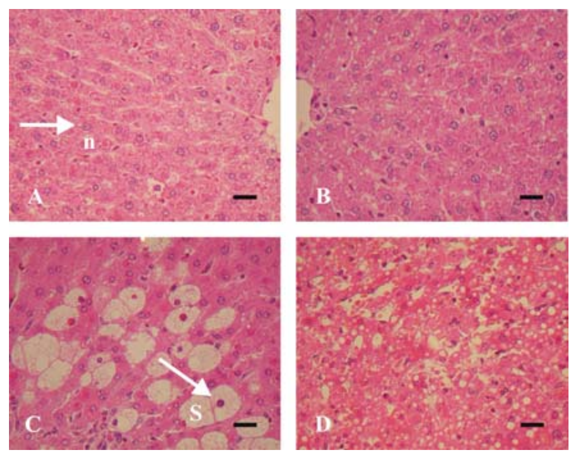
Dari hasil percobaan ini telihat bahwa kelompok yang mendapatkan CCl_4 1 dan 10 ml/kg BB mengalami steatosis (Gambar 2). Steatosis merupakan gambaran patologi yang ditandai dengan akumulasi lemak di dalam sel hati yang disebabkan oleh gangguan pada metabolisme lipid di hati. Ada beragam faktor penyebab terjadinya steatosis, secara garis besar dibedakan atas faktor primer, yakni obesitas, hiperlipidemia, dan resistensi insulin, serta faktor sekunder yang meliputi diet yang tidak seimbang, malabsorpsi, kehamilan, alkohol, serta obat-obatan antara lain aspirin dan tetrasiklin [12,13].

Kerusakan sel hati akan mempengaruhi kadar enzim-enzim hati, bilirubin, dan protein dalam serum. Dari penelitian-penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa pemberian CCl_4 antara lain akan meningkatkan kadar bilirubin total, enzim ALT, AST, dan ALP, sebaliknya kadar protein total dalam serum akan menurun [3,14-16]. Dengan demikian, daya proteksi suatu senyawa terhadap CCl_4 dinilai dari kemampuannya dalam menghambat peroksidasi lipid [17], menekan aktivitas enzim ALT dan AST [18], dan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan [1].

Reactive oxygen species (ROS) selain dapat merusak membran sel juga merusak komponen intrasel termasuk asam nukleat, protein, dan lipid. Asam deoksiribonukleat (DNA) mitokondria tidak tahan terhadap serangan radikal bebas sehingga membran bagian dalam mitokondria juga menjadi ikut rusak. Peroksidasi lipid selanjutnya mengubah DNA mitokondria dan mengganggu kestabilan membran sel, propagasi siklus oksidatif stres secara besar-besaran yang diikuti dengan peradangan. Peningkatan level oksidatif digambarkan dengan megamitokondria dan *steatohepatitis* nonalkoholik [12]. Menurut Mohssen [19], radikal bebas dapat menyebabkan stres oksidatif yang ditandai dengan kerusakan membran sel dan protein, termasuk enzim, akibat gangguan pada permeabilitas membran dan fungsi membran itu sendiri.

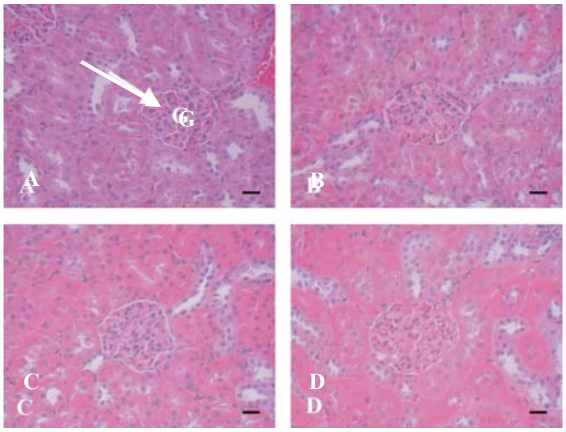


Gambar 1. Morfologi hati tikus. A) Kontrol. B) Pemberian CCl_4 0,1 ml/kg BB. C) Pemberian CCl_4 1 ml/kg BB. D) Pemberian CCl_4 10 ml/kg BB. Tanda panah menunjukkan adanya nekrosis milier pada permukaan hati



Gambar 2. Gambaran sel hati tikus. A) Tanpa perlakuan. Sel hati yang normal dengan inti sel yang berukuran normal (n). B) Pemberian CCl_4 0,1 ml/kg BB. C) Pemberian CCl_4 1 ml/kg BB. Akumulasi lemak dalam sel hati (s). D) Pemberian CCl_4 10 ml/kg BB H & E. Objektif 40x (20 µm)

Pada manusia, hampir seluruh hasil akhir metabolisme diekskresi melalui glomerulus, ekskresi metabolit-metabolit melalui tubulus kurang penting kecuali untuk kalium, ureum, dan kreatinin pada kadar yang tinggi dalam plasma. Kreatinin merupakan produk akhir dari kreatin. Kreatin terutama disintesis dalam hati dan ginjal dari asam-asam amino. Kreatin diambil dari aliran darah oleh otot kemudian difosforilasi dan memasuki metabolisme otot, dan hampir semua kreatin tubuh terdapat dalam otot. Kreatinin secara metabolik tidak



Gambar 3. Gambaran jaringan ginjal tikus. A) Kontrol. Glomerulus yang normal (G). B) Pemberian CCl_4 0,1 ml/kg BB. C) Pemberian CCl_4 1 ml/kg BB. D) Pemberian CCl_4 10 ml/kg BB H & E. Objektif 40x (20 µm)

aktif, berdifusi ke dalam plasma dan dieksresikan ke dalam urin. Pada kegagalan ginjal, kreatinin ditahan bersama unsur nitogen nonprotein (NPN) darah lainnya. Dibandingkan dengan urea plasma, kreatinin plasma lebih luas digunakan untuk mengukur fungsi ekskresi kegagalan ginjal kronik dan sebagai ukuran kuantitatif kerusakan ginjal karena kreatinin plasma hampir tidak dipengaruhi oleh diet seperti halnya urea plasma. Pada manusia umumnya jika kreatinin plasma kurang dari sekitar 900 µmol/l filtrasi glomerulus dinyatakan normal [9].

Dari percobaan ini diperoleh hasil bahwa pemberian CCl_4 0,1 ml/kg BB dan 1 ml/kg BB mengakibatkan peningkatan kadar kreatinin, masing-masing 52,12 mg/dl dan 84,47 mg/dl. Peningkatan kreatinin ini mungkin berkaitan dengan terjadinya kerusakan sel hati yang disebabkan oleh CCl_4. Penurunan kreatinin setelah pemberian 10 ml CCl_4/kg BB juga berkaitan dengan bertambah luas dan beratnya kerusakan hati sehingga kemampuan hati dalam mensintesis kreatin terganggu. Dari hasil percobaan ini, secara histopatologi tidak terlihat adanya perubahan dibanding kontrol (Gambar 3). Hal yang sama juga terjadi pada percobaan Mohssen [19], dengan pemberian thimet 20 kg/ha tidak memperlihatkan gambaran histopatologi yang berbeda pada organ ginjal, walaupun dari pengukuran kreatinin serum terlihat adanya peningkatan yang nyata dibanding serum.

4. Kesimpulan

Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan: Hasil pengukuran biokimiawi darah menunjukkan bahwa pemberian CCl_4 sebanyak 0,1 dan 1,0 ml/kg BB mengakibatkan peningkatan kadar enzim ALT, dan ALP, sebaliknya menurunkan kadar enzim AST. Bahkan dengan pemberian 10 ml CCl_4/kg kadar enzim-enzim tersebut sudah sangat turun. Pemberian CCl_4 sebanyak 0,1 ml/kg BB mengakibatkan kadar bilirubin total meningkat. Sebaliknya, pemberian 1,0 dan 10 ml CCl_4 /kg BB kadar bilirubin total menurun. Pemberian CCl_4 0,1; 1,0; dan 10 ml/kg BB mengakibatkan penurunan kadar protein total. Gambaran patologi anatomi hati menunjukkan terjadinya nekrosis milier pada kelompok yang diberi 1,0 dan 10 ml CCl_4/kg BB. Gambaran histopatologi hati menunjukkan bahwa pemberian CCl_4 0,1 ml/kg BB mengakibatkan terjadinya degenerasi dan nekrosis secara multifokal, bahkan dengan pemberian 1,0 dan 10 ml CCl_4/kg BB telah terjadi steatosis. Gambaran patologi anatomi maupun histopatologi ginjal tidak menunjukkan perubahan yang bermakna, walaupun hasil pengukuran biokimiawi darah menunjukkan bahwa dengan pemberian CCl_4 0,1 ml/kg BB terjadi peningkatan kadar kreatinin. Bahkan dengan pemberian CCl_4 sebanyak 1,0 dan 10 ml/kg BB kadar kreatinin menjadi sangat turun. Dosis CCl_4 yang dipilih untuk pengujian aktivitas hepatoprotektor di penelitian tahap berikutnya adalah 0,1 ml/kg BB.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Drh. M. Iskandar M. Sc. dan Harnowo Permadi, M. Sc. yang telah banyak membantu dalam penelitian ini. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian S3 sekaligus riset yang didanai oleh Hibah Bersaing XIV an. Ruqiah Ganda Putri Panjaitan dengan judul: Efek Perlindungan Sediaan Akar Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.) Asal Kalimantan Barat Terhadap Peradangan hati Tikus, dengan nomor kontrak 023/SP3/PP/DP2M/11/2006 untuk itu ucapan terima kasih juga ditujukan kepada BPPS sebagai sponsor beasiswa S3 dan Dikti sebagai pemberi dana dalam penelitian ini.

Daftar Acuan

1. Jeon TI, Hwang SG, Park NG, Shin SI, Choi SD, Park DK. Toxicology 187 (2003) 67-73.
2. Lin CC, Yen MH, Lo TS, Lin JM. J. Ethnopharmacol. 60 (1998) 9-17.
3. Shanmugasundaram P, Venkataraman S. J. Ethnopharmacol. 104 (2006) 124-128.
4. Delgado JN, Remers WA, editor. Textbook of Organic Medical and Pharmaceutical Chemistry. Ed ke-9, Philadelphia, J.B.Lippincott Co., 1991, pp. 2-10.
5. Campbell NA, Reece JB, Mitchell LG. Biologi. Ed ke-5 Jilid I. Lestari et al. penerjemah; Safitri A, Simarmata L, Hardani HW, editor. Terjemahan dari: Biology Fifth Edition, Erlangga, Jakarta, 2002, pp 141-155.
6. Svingen BA, Buege JA, O'Neal FO, Aust SD. J. Biol. Chem. 254 (1979) 5892-5899.

7. Kiernan JA. Histological & Histochemical Methods. Theory and Practice. Ed. ke-2, Pergamon Pr., Canada, 1990, pp 90-97.
8. Stockham SL, Scott MA. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. Ed. ke-1, Blackwell publishing Co., Iowa state Pr., 2002, pp. 433-486.
9. Baron DN. Kapita Selekta Patologi Klinik. Ed ke-4. Andrianto P dan Gunawan J; penerjemah. Terjemahan dari: A Short Textbook of Chemical Pathology, EGC, Jakarta, 1992, pp 113-231
10. Trivedi N, Rawal UM. Indian J. Pharmacol. 30 (1998) 318-322.
11. Venukumar MR, Latha MS. Indian J. Pharmacol. 34 (2002) 269-275.
12. Day L, Shikuma C, Gerschenson M. Mithochondrion 4 (2004) 95-109.
13. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Hepatology 37 (2003) 1202-1219.
14. Rao GMM, Rao CV, Pushpangadan P, Shirwaikar A. J. Ethnopharmacol. 103 (2006) 484-490.
15. Jin YS, Sa JH, Shim TH, Rhee HI, Wang MH. Biochem. and Biophys. Res. Comm. 329 (2005) 991-995.
16. Porchezhian E, Ansari SH. Phytomedicine 12 (2005) 62-64.
17. Teselkin YO, Babenkova IV, Kolhir VK, Baginskaya AI, Tjukavkina NA, Kolesnik YA, Selivanova IA, Eichholz AA. Phytother. Res. 14 (2000) 160-162.
18. Lin CC, Huang PC. Phytother. Res. 14 (2000) 489-494.
19. Mohssen M. Environ. Res. Sec. 87 (2001) 31-36.