

Pemberian Dietilnitrosamin dan Karbontetraklorida Pada Gambaran Histologi Ginjal Tikus (*Rattus Norvegicus*)

*Giving of Diethylnitrosamine and Carbon Tetrachloride on Histological Appearance of Rat Kidney (*Rattus Norvegicus*)*

Almas Dwi Khairana¹, Ricadonna Raissa², Wibi Riawan³, Suharti⁴,
Hendra Susanto⁵, Aulanni'am Aulanni'am^{6*}

^{1,4} Prodi Kimia, Fakultas Matematika dan IPA, Universitas Negeri Malang, Malang, Indonesia

² Prodi Kimia, Fakultas Matematika dan IPA, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

³ Prodi Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

⁵ Prodi Biologi, Fakultas Matematika dan IPA, Universitas Negeri Malang, Malang, Indonesia

⁶ Prodi Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

Abstract

Diethylnitrosamine (DEN) is a metabolic product of various foods and beverages in which there are preservatives in the form of nitrate and nitrite. Nitrosamines are found in various products such as alcoholic beverages, processed meats, cigarettes, and cosmetic products. DEN is toxic and carcinogenic to organs such as the liver, lungs, kidneys, skin, stomach, and blood. In addition to giving DEN compounds, there are also CCl₄ compounds as tumor promoter agents known as genotoxic substances that can increase the risk of genetic errors and stimulate cells to become malignant neoplasms. Administration of DEN and CCl₄ induction can damage various organs of the body, one of which is the kidney. In a healthy body, angiogenesis plays a role in wound healing and the formation of new tissue. However, angiogenesis also contributes to carcinogenesis or the uncontrolled growth of cancer cells, and is malignant when the body is contaminated with toxic substances. Therefore, to determine the effect of the administration of DEN and CCl₄ observations were made using the immunohistochemical method, to see differences in the histology of the kidneys of experimental animals, the positive control group, and the negative control group based on the VEGF angiogenesis factor. From these results, there are significant differences. In the negative group, there was no necrosis and high-value VEGF expression, but in the positive group, there was necrosis and a decrease in the value of VEGF expression compared to the negative control group.

Keywords: diethylnitrosamine, kidney, glomerulus

Article history:

Submitted 21 Februari 2022

Accepted 21 April 2022

Published 30 April 2022

PUBLISHED BY:

Sarana Ilmu Indonesia (salnesia)

Address:

Jl. Dr. Ratulangi No. 75A, Baju Bodoa, Maros Baru,
Kab. Maros, Provinsi Sulawesi Selatan, Indonesia

Email:

info@salnesia.id, jika@salnesia.id

Phone:

+62 85255155883



Abstrak

Dietilnitrosamin (DEN) merupakan produk metabolisme berbagai makanan dan minuman yang di dalamnya terdapat bahan pengawet berupa nitrat maupun nitrit. Nitrosamine banyak ditemukan di berbagai produk seperti minuman beralkohol, daging olahan, rokok, produk kosmetik. DEN bersifat toksik dan karsinogenik pada organ-organ seperti hati, paru-paru, ginjal, kulit, perut, dan darah. Selain pemberian senyawa DEN, terdapat juga senyawa CCl₄ sebagai agen promotor tumor yang dikenal sebagai zat genotoksik yang dapat meningkatkan resiko eror genetik dan menstimulasi sel menjadi neoplasma ganas. Pemberian induksi DEN dan CCl₄ dapat merusak berbagai organ tubuh salah satunya ginjal. Pada tubuh sehat angiogenesis berperan dalam penyembuhan luka dan pembentukan jaringan baru. Namun angiogenesis juga berkontribusi terjadinya karsinogenesis atau pertumbuhan sel kanker yang tidak terkendali dan bersifat ganas saat tubuh terkontaminasi zat toksik. Maka dari itu untuk mengetahui pengaruh dari adanya pemberian DEN dan CCl₄ dilakukan pengamatan dengan menggunakan metode imunohistokimia, untuk melihat perbedaan gambaran histologi pada ginjal hewan coba, kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif berdasarkan faktor angiogenesis VEGF. Dari hasil tersebut, terdapat perbedaan nyata pada kelompok negatif tidak tampak adanya nekrosis dan ekspresi VEGF bernilai tinggi, namun pada kelompok positif tampak adanya nekrosis serta menurunnya nilai ekspresi VEGF dibandingkan kelompok kontrol negatif.

Kata Kunci: dietilnitrosamin, ginjal, glomerulus

*Penulis Korespondensi:

Aullani'am, email: aullani@ub.ac.id



This is an open access article under the CC-BY license

PENDAHULUAN

Dietilnitrosamin (DEN) merupakan produk metabolisme berbagai makanan dan minuman yang teerandung bahan pengawet berupa nitrat maupun nitrit(Purnamasari, Patwi and Susilningsih, 2018). Berdasarkan The International Agency for Research on Cancer (IARC) DEN merupakan senyawa nitrosamin yang paling bersifat karsinogenik bagi manusia (Al-Kaseem *et al.*, 2014). Rata-rata manusia mengkonsumsi 0.1µg nitrosamine melalui makanan setiap harinya. Pada dosis akut nitrosamine dapat menyebabkan nekrosis, dan pendarahan hepar, sedangkan pada paparan kronis dapat menyebabkan kanker hepar dan ginjal (Robles, 2014). DEN bersifat toksik dan karsinogenik pada organ-organ seperti hati, paru-paru, ginjal, kulit, perut, dan darah (Yulai *et al.*, 2021).

DEN dapat terbentuk melalui mekanisme reaksi di dalam tubuh, kondisi lambung yang bersifat asam membuat nitrit maupun nitrat yang berada di dalam nitrosamine bereaksi dengan amina sehingga terbentuk nitrosamine yang salah satunya berupa DEN. DEN memerlukan suatu bioaktivasi, yang berguna dalam mekanismenya yaitu biotransformasi enzimatik dengan senyawa ion karbonium. Tahapan awal dimulai dengan proses hidroksilasi oleh karbon alfa, kemudian kelompok hidroksialkil akan dieliminasi sebagai aldehid, sehingga akan terbentuk nitrosamine primer yang bersifat tidak stabil. Nitrosamin reaktif primer akan mengalami tautomerisasi dengan molekul selular, dan jika terjadi alkilasi pada tingkat DNA maka akan menyebabkan mutasi gen dan kanker (Frizani and Miranti, 2018). Berdasarkan hasil studi ditunjukkan bahwa

DEN berperan dalam patogenesis kerusakan ginjal. DEN yang masuk ke dalam tubuh akan membentuk spesies oksigen reaktif yang berakhir pada stress oksidatif dan jejas sel (Purnamasari *et al.*, 2018).

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 (Panjaitan *et al.*, 2010).

DEN menghasilkan produk mutagenik berupa O⁶- etil dioksiguanosin, O⁴ etil deoksi timidin, dan O⁶ – etil deoksi timidin pada hati yang mengakibatkan timbulnya stress oksidatif dan mengarah pada penyakit kanker. Metabolisme DEN yang diberikan pada tubuh menimbulkan *reactive oxygen species* (ROS), DEN di metabolisme oleh CYP450 dan menghasilkan ROS yang termasuk kedalam golongan radikal bebas. Jumlah ROS seperti O₂, H₂O₂, dan NO yang berlebihan pada tubuh menyebabkan peroksidasi lipid, oksidasi protein, kerusakan DNA dan mutagenesis. Meningkatkan radikal bebas dapat memicu terjadinya berbagai macam penyakit seperti mutagenesis, aterosklerosis, artritis, dan karsinogenesis (Singh *et al.*, 2021).

Senyawa CCl₄ apabila diinduksi pada hewan coba dapat mengakibatkan terjadinya fibroblast (Soichiro *et al.*, 2016). Pemberian CCl₄ sebagai agen promotor tumor dikenal sebagai zat genotoksik yang dapat meningkatkan resiko eror genetik dan menstimulasi sel menjadi neoplasma ganas (Santos *et al.*, 2017). CCl₄ banyak ditemukan pada cat, tinta, toner, bahan kosmetik. CCl₄ bereaksi dengan tubuh melalui jalur peroral, inhalasi, dan dermis (Tang *et al.*, 2016). Pemberian induksi CCl₄ dengan dosis 0,3 mL menyebabkan kerusakan pada organ ginjal. Terjadinya proses katalis pada retikulum endoplasma mengakibatkan pembentukan molekul reaktif seperti triklorometil radikal (CCl₃*) oleh sitokrom P450 (Rohamniah, 2021). Asam lemak penyusun membran sel, terutama *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) sangat rentan terhadap radikal bebas. Jumlah PUFA pada fosfolipid membran retikulum endoplasma akan berkurang sebanding dengan meningkatnya jumlah CCl₄ yang diinduksikan (Wicaksono, 2019).

Ginjal rentan mengalami kerusakan akibat paparan zat berbahaya, akumulasi pemberian DEN dan CCl₄ memicu terjadinya degenerasi sel tubulus pada ginjal dan menyebabkan nefrotoksik. Nefrotoksik dipicu akibat pemberian kedua senyawa tersebut sehingga terjadi proses stress oksidatif yang menyebabkan kerusakan pada lipid seluler, protein, DNA (Suzek *et al.*, 2016). Secara fisiologis tubuh memiliki beberapa mekanisme dalam melindungi diri dari kerusakan akibat pembentukan spesies oksigen reaktif.

Angiogenesis atau neovaskularisasi adalah proses biologis yang menunjukkan proses perkembangan pembuluh darah baru dari yang sudah ada sebelumnya. Sel yang berperan pada proses angiogenesis adalah sel endotel, yang merupakan sel yang berfungsi melapisi pembuluh darah dan berhubungan langsung dengan darah. Melalui angiogenesis terjadi pembentukan kapiler baru yang membuat perluasan pembuluh darah baru pada jaringan baru dan jaringan avaskular. Angiogenesis berperan sebagai respon terhadap pembentukan gradien oksigen dalam jaringan. Sel yang berada luar batas difusi oksigen pada kadar (100-200µm) menjadi hipoksia dan memungkinkan dimulainya proses sekresi faktor perkembangan pro angiogenik dan sitokin untuk menghasilkan pembuluh darah baru pada proses angiogenesis (Falcon *et al.*, 2016). Tujuan dalam penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dari adanya pemberian DEN dan CCl₄ dilakukan pengamatan dengan menggunakan metode imunohistokimia,

untuk melihat perbedaan gambaran histologi pada ginjal hewan coba, kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif berdasarkan faktor angiogenesis VEGF.

METODE

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar yang berumur 2 minggu dengan berat badan 9 – 20 g. Tikus dibagi menjadi 2 kelompok yang diperoleh dari rumus Federer (Wahyuningrum and Probosari, 2012). Prosedur penelitian ini terbagi menjadi beberapa kelompok diantaranya; kelompok P1 (kelompok kontrol negatif), diberikan minyak zaitun pada minggu ke 8–14 minggu; 0,15 ml/ekor sebanyak 4x/minggu. Pada minggu ke 15 tikus diberikan larutan CMC 2 ml p.o. 1 kali sehari selama 30 hari dan kelompok P2 (kelompok kontrol positif), kelompok tikus ini diinduksi dengan DEN 50 mg/kgBB single injection i.p pada tikus umur 2 minggu dilanjutkan dengan pemberian CCl₄ 0,15 ml/ekor sebanyak 4x/minggu pada tikus umur 8 minggu sampai berumur 14 minggu.

Proses deparafinisasi diawali dengan memasukkan slide kedalam xylol I, xylol II, xylol III masing-masing 10 menit. Dilakukan proses rehidrasi dengan memasukkan gelas objek kedalam alkohol absolut I, alkohol absolut II, alkohol absolut III, EtOH 80%, dan EtOH 70% masing-masing 10 menit. Pencucian slide digunakan larutan PBS dengan 3x pencucian selama 3 menit. Pemberian antibodi primer berupa VEGF sebanyak 50 µL selama 40 menit. Pencucian slide digunakan larutan PBS dengan 3x pencucian selama 3 menit. Pemberian antibodi sekunder sebanyak 50 µL selama 1 jam. Pencucian slide digunakan larutan PBS dengan 3x pencucian selama 3 menit. Selanjutnya slide digenangi dengan akuades selama 2 menit dan diberi DAB sebanyak 50 µL selama 10 menit. Pencucian slide digunakan larutan PBS dengan 3x pencucian selama 3 menit, kemudian digenangi dengan akuades selama 5 menit. Pemberian mayer 1 tetes dan ditambahkan air pristine selama 5 menit. Selanjutnya diangin-anginkan selama 1 hari, kemudian proses mounting dengan pemberian entelan dan jaringan ditutup dengan cover glass. Kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000X, ekspresi VEGF ditunjukkan dengan warna coklat pada jaringan ginjal.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada awalnya paparan DEN tidak bersifat karsinogen. Namun saat DEN diinduksikan terjadi proses bioaktivasi mekanisme antara biotransformasi enzimatis dengan ion karbonium (Robles, 2014). Proses awal terjadi dengan hidroksilasi dari sebuah karbon alfa, kemudian akan terjadi proses eliminasi sebagai aldehid pada kelompok hidroksialkil dan pada akhirnya akan terbentuk nitrosamine primer yang bersifat tidak stabil. Molekul primer tersebut akan mengalami tautomerisasi dengan sebagian besar molekul-molekul selular yang apabila terjadi proses alkilasi pada tingkat DNA akan mengakibatkan mutasi gen-gen kanker.

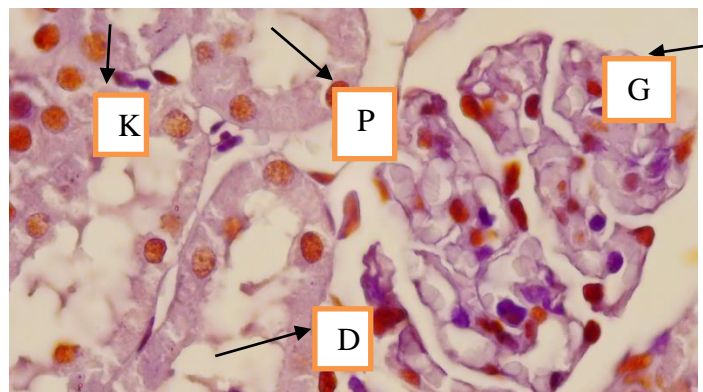
CCl₄ (Carbon Tetrachloride) merupakan xenobiotik, senyawa kimia yang masuk kedalam tubuh menuju saluran pencernaan melalui oral sampai ke hati. Hati CCl₄ akan mengalami biotransformasi dan dikatalisis oleh enzim sitokrom P450 menjadi metabolit reaktif berupa CCl₃ (Triklorometil) (Istikhomah and Lisdiana, 2015).

Angiogenesis merupakan suatu proses biologi yang berperan dalam pembentukan pembuluh darah baru, perbaikan kerusakan jaringan, dan sebagai suplai oksigen ke pembuluh darah pada kondisi tubuh sehat. Namun pada tubuh yang terkontaminasi zat

berbahaya atau zat toksik maka akan timbul jumlah senyawa radikal bebas yang tidak terkendali, dengan diikuti meningkatnya jumlah stress oksidatif. Jika hal tersebut terjadi maka jaringan dapat mengalami inflamasi, nekrosis, dan tidak terkendalinya aktifitas angiogenesis (Hatcher *et al.*, 2018).

VEGF adalah aktivator angiogenesis yang paling kuat dan diperkirakan mempromosikan ekspresi ephrin- B2 oleh sel-sel endotel. DII4/Notch yang diinduksi oleh VEGF ialah jalur lain yang sangat diperlukan pada neovaskularisasi dan secara selektif mempromosikan ekspresi Ephrin-B2. Hal ini memberi kesan bahwa terdapat kaskade antara VEGF-DII4/Notch- EphrinB2 pada angiogenesis (Angmalisang, 2020).

Berdasarkan hasil pengamatan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 1000X, tampak terdapat perbedaan yang nyata antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif pada bagian glomerulus ginjal.



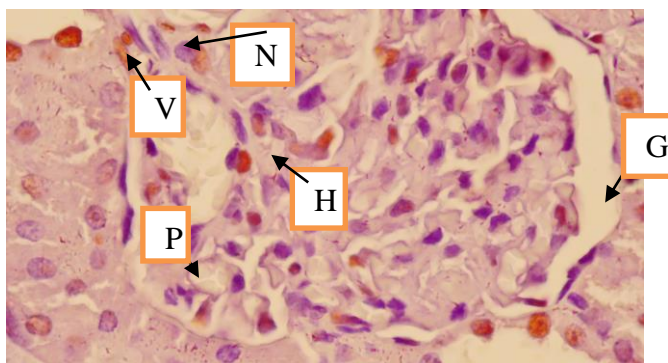
Keterangan: Histologis kelompok kontrol negatif
pembesaran 1000x

(K) = Kortex, (P) = Tubulus Proximal,

(G) = Glomerulus, (D) = Tubulus Distal

Pada kelompok kontrol negatif tidak begitu nampak perubahan morfologi pada gambar tersebut, tidak ditemukan adanya nekrosis (kematian sel) pada bagian tubulus dan glomerulus. Tidak nampak juga terjadinya piknosis, yang merupakan terjadinya pengkerutan pada inti sel dan perubahan warna inti sel yang cenderung lebih gelap. Selain itu tidak nampak terjadinya vaskuolisasi atau degenerasi lemak yang merupakan keadaan terjadinya gangguan dalam proses metabolisme lemak, sehingga hal tersebut dapat menyebabkan penumpukan trigliserida pada sitoplasma.

Berdasarkan faktor angiogenesis (VEGF) yang tampak dengan adanya ekspresi warna coklat pada gambar, menunjukkan persebaran ekspresi yang merata di seluruh bagian glomerulus. Ekspresi tersebut membuktikan bahwa proses angiogenesis atau neovaskularisasi berjalan dengan seimbang. Hal tersebut terjadi karena tidak adanya induksi zat yang bersifat toksik sehingga tidak terjadi adanya peningkatan radikal bebas yang bisa berdampak pada peningkatan stress oksidatif. Berbeda dengan kelompok kontrol negatif pada kelompok kontrol positif terdapat perbedaan yang nyata pada histologi sebagai berikut:



Keterangan: Histologis kelompok kontrol positif pembesaran 1000X

(P) = Tubulus Proximal, (G) = Glomerulus,
(V) = Vakuolisasi, (H) = Hemoragi, (N) = Nekrosis

Pemberian dietilnitrosamin dan karbontetraklorida memiliki dampak yang begitu besar bagi perubahan morfologi ginjal tikus (*Rattus norvegicus*). Dengan adanya pemberian zat yang bersifat toksik tersebut maka akan mengakibatkan peningkatan jumlah radikal bebas di dalam tubuh yang kususnya akan mengakibatkan kerusakan pada jaringan ginjal. Hal tersebut juga akan mempengaruhi suplai oksigen pada jaringan yang disebut dengan hipoksia. Sel yang telah terkontaminasi zat toksik akan mengalami peningkatan stress oksidatif dan tidak *responsive*. Salah satu gangguan pada ginjal yang terjadi adalah *acute tubular necrosis* (ATN) dan *glomerulonephritis* (Arief and Widodo, 2018).

ATN terjadi karena pada sel tubular kurang mendapatkan oksigen, namun bisa juga dikatakan sel mendapat pengaruh racun sehingga mengalami gagal ginjal intrinsic akut dan cedera nefrotoksik (Fitriani *et al.*, 2019). ATN dapat diamati secara mikroskopik dan makroskopik, secara makroskopik ditandai dengan adanya ginjal tampak membesar. Namun secara mikroskopik ditandai dengan adanya torak-torak pada pigmen hemoglobin bertebaran pada tubulus. Glomerulonephritis dapat diamati morfologinya secara mikroskopik, ditandai dengan adanya pembengkakan pada sel-sel epitel dan endotel, bervakuola dan terdapat tonjolan-tonjolan yang mengendap (Rosen and Stillman, 2008).

Secara makroskopik ditandai dengan adanya glomerulus tampak besar dan pucat, terdapat perlemakan pada tubulus dan adanya cairan berlebih pada interstitiial karena edema umum. Pada gambar histologis kelompok kontrol positif ditandai dengan adanya vakuolisasi atau penumpukkan lemak didalam korteks, terdapat hemoragi yaitu dimana darah keluar berlebih dari kapiler darah yang terlihat dengan adanya bentuk panah H pada gambar, terdapat juga kerusakan nyata berupa nekrosis atau kerusakan jaringan yang diawali dengan piknosis terlebih dahulu.

Mekanisme rhadomiolisis yang mengakibatkan perlukaan ginjal masih belum jelas. Meski demikian, berbagai penelitian menunjukkan peranan dari (a) Vasokonstriksi dan iskemi ginjal, (b) pembentukan cast mioglobin pada tubulus distal, dan (c) Efek sitotoksik langsung mioglobin terhadap sel epitel tubulus proksimal melalui jejas oksidatif Hipovolemia (Hasanatuludhhiyah *et al.*, 2016).

Berdasarkan faktor angiogenesis VEGF terlihat jelas jumlah warna coklat yang dihasilkan di kelompok kontrol positif (Rosen, 2002). Hal tersebut terjadi karena ginjal telah terkontaminasi oleh zat berbahaya berupa dietilnitrosamin dan karbontetraklorida sehingga tubuh memerlukan nutria dan suplai oksigen yang lebih banyak hal itu

ditunjukkan dengan adanya aktifitas angiogenesis yang menurun pada kelompok kontrol positif.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian pada hewan coba tikus (*Rattus Norvegicus*) yang diinduksi dietilnitrosamin dan karbontetraklorida menunjukkan adanya kerusakan pada histopatologi ginjal yang diberikan dietilnitrosamin dan karbontetraklorida. Tampak jelas dengan ditandai adanya vaskuolisasi, nekrosis, hemoragi, dan penurunan aktifitas angiogenesis VEGF pada kelompok kontrol positif. Banyak faktor yang mempengaruhi penurunan proses angiogenesis tersebut seperti peningkatan radikal bebas yang menyebabkan stress oksidatif, adanya hipoksia, reaksi toksisitas penggabungan senyawa DEN dan CCl₄ yang sangat toksik sebagai agen promotor tumor. Semakin lama perlakuan yang diberikan pada tikus maka akan semakin parah kerusakan yang ditimbulkan. Perlu adanya peningkatan dosis atau pembuatan perbedaan kelompok kontrol dengan dosis bertingkat, agar dapat diketahui pada dosis manakah akan terjadi perubahan yang parah. Perlu juga adanya senyawa antioksidan yang dapat menurunkan kadar radikal bebas atau senyawa antioksidan yang dapat melakukan proses regenerasi sel.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Kaseem M, Al-Assaf Z K, F. 2014. Determination of Seven Volatile N-Nitrosamines in Fast Food. *Pharmacol Pharm.*
- Angmalisang EC. 2020. Peran Sinyal Ephrin-B2/EPH-B4 pada Angiogenesis Postnatal. *Jurnal Biomedik: JBM*, 12(2): 77. <https://doi.org/10.35790/jbm.12.2.2020.29161>.
- Arief H, Widodo MA. 2018. Peranan Stres Oksidatif pada Proses Penyembuhan Luka. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Wijaya Kusuma*, 5(2): 22. <https://doi.org/10.30742/jikw.v5i2.338>.
- Falcon BL, Chintharlapalli S, Uhlik MT, Pytowsk B. 2016. Antagonist antibodies to vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) as anti-angiogenic agents. *Pharmacology & Therapeutics* 164: 204–225.
- Fitriani U, Dewi T friska, Wijayanti E. 2019. Analisis fungsi hati dan fungsi ginjal pada tikus setelah pemberian ramuan cabe Jawa, daun sendok dan seledri. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*, 5(2): 263–266. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m050220>.
- Frizani NA, Miranti IP. 2018. Pengaruh Daun Sukun (*Artocarpus Altilis*) terhadap Gambaran Fibrosis Hepar Tikus Wistar Yang Diinduksi Dietilnitrosamin. *Diponegoro Medical Journal (Jurnal Kedokteran Diponegoro)*, 7(2): 1072-1080.
- Hatcher JM, Wu G, Zeng C, Zhu J, Meng F, Patel S, Wang W, Ficarro SB, Leggett AL, Powell CE, Marto JA, Zhang K, Ngo JCK, Fu X-D, Zhang T, Gray S, N. 2018. SRPKIN-1: A Covalent SRPK1/2 Inhibitor that Potently Converts VEGF from Pro-angiogenic to Anti-angiogenic Isoform. *Cell Chemical Biology*. *Cell Chemical Biology*, 25(4):460-470.e6.
- Istikhomah, Lisdiana. 2015. Efek Hepatoprotektor Ekstrak Buah Pedada (*Sonneratia caseolaris*) Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Unnes Journal of Life Science*, 4(1): 1–8.
- Hasanatuludhhiyah, Basori A, Suhartati. 2016. Gangguan Ginjal Akut Akibat Rhabdomyolisis. *Majalah Biomorfologi*, 28: 1–23.

- Panjaitan RGP, Handharyani E, Chairul C, Masriani M, Zakiah Z, Manalu W. 2010. The Effects of Carbon Tetrachloride Administration on Liver and Renal Function. *Makara Journal of Health Research*, 11(1): 11–16. <https://doi.org/10.7454/msk.v11i1.217>.
- Purnamasari P, Purnawati RD, Susilaningsih N. 2018. Pengaruh Ekstrak Daun Sukun dan Madu terhadap Gambaran Mikroskopik Ginjal Tikus Wistar Yang Diinduksi Dietilnitrosamin. *Diponegoro Medical Journal (Jurnal Kedokteran Diponegoro)*, 7(2) 1391-1405.
- Robles H. 2014. *Encyclopedia of Toxicology, Nitrosamine*. Academic Press.
- Rohamniah AU. 2021. Efek Renoprotektif Ekstrak Ganoderma Applanatum Terhadap Kadar Asam Hialuronat dan Laminin Fibrosis Ginjal Mencit (*Mus musculus L.*) yang Terinduksi Karbontetraklorida. Universitas Airlangga: Surabaya.
- Rosen LS. 2002. Clinical Experience with Angiogenesis Signaling Inhibitors: Focus on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Blockers. *Supplemen*, 9(2): 36-44.
- Rosen S, Stillman IE. 2008. Acute tubular necrosis is a syndrome of physiologic and pathologic dissociation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(5): 871–875. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007080913>.
- Santos NP, Colaço AA, Oliveira PA. 2017. Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research. <https://doi.org/10.1177/1010428317695923>.
- Singh D, Chaudhary D, Kumar V, Verma A. 2021. Amelioration of diethylnitrosamine (DEN) induced renal oxidative stress and inflammation by *Carissa carandas* embedded silver nanoparticles in rodents. *Toxicology Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.03.014>.
- Soichiro Sasaki A, Tomohisa B, Tatsunori N, Yoshihiro H, Shin-ichi H, Noriko Gotoh NM. 2016. Essential roles of the interaction between cancer cell-derived chemokine, CCL4, and intra-bone CCR5-expressing fibroblasts in breast cancer bone metastasis. *Cancer Letters*, 378(1): 23-32.
- Suzek H, Celik I, Dogan A YS. 2016. Protective effect and antioxidant role of sweetgum (*Liquidambar orientalis*) oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Pharmaceutical Biology*, 54(3): 451-7.
- Tang D, Hu S, Dai F, Yi R, Gordin ML CS. 2016. Self-Templated Synthesis of Mesoporous Carbon from Carbon Tetrachloride Precursor for Supercapacitor Electrodes. *ACS Omega*, 4(15): 16360–16371.
- Wahyuningrum MR, Probosari. 2012. Pengaruh Pemberian Buah Pepaya (*Carica Papaya L.*) Terhadap Kadar Trigliserida Pada Tikus Sprague Dawley Dengan Hiperkolesterolemia. *Journal of Nutrition College*, 1(1): 192-198. <https://doi.org/10.14710/jnc.v1i1.693>.
- Wicaksono S. 2019. Pengaruh Pemberian Spirulina Peroral Yang Diberi CCl4 terhadap Kadar Ureum dan Kreatinin Darah Tikus Putih. *Jurnal Kesehatan*, 12(2): 86-91. <https://doi.org/10.24252/kesehatan.v12i2.9829>.
- Yulai Y, Fengfeng Z, Zhenhuan L, LingFeng Z, Yu X, Arunachalam C, Tahani A, Alamahdi BL. 2021. Phyllanthin prevents diethylnitrosamine (DEN) induced liver carcinogenesis in rats and induces apoptotic cell death in HepG2 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 135: 111335. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111335>.