

Kerusakan Hati Akibat Keracunan Alkohol Berulang pada Tikus Wistar

(LIVER DAMAGE DUE TO ALCOHOL INTOXICATION REPEAT IN WISTAR RATS)

Ni Made Suaniti¹, Anak Agung Gede Sudewa Djelantik²,
Ketut Suastika³, Nyoman Mantik Astawa⁴

¹Lab Kimia Analitik dan Forensik
Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran Badung, Bali. Telp. (0361) 701954

²Lab Patologi Klinik, ³Lab Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Unud

⁴Lab Virologi, Fakultas Kedokteran Hewan Unud Denpasar Bali

email: suanitir@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk melihat kerusakan hati akibat keracunan alkohol pada tikus Wistar. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *True randomized experimental post test only control group design*. Tikus Wistar yang digunakan sebanyak 15 ekor masing-masing perlakuan terdiri atas lima ekor dan dibagi dalam tiga kelompok perlakuan. Perlakuan I sebagai kontrol (diberikan akuades). Perlakuan II diberikan alkohol 5% dan perlakuan III diberikan alkohol 20%. Tikus perlakuan diberikan alkohol setiap hari selama enam minggu (kronis). Marka biokimia yang dilacak adalah kadar aldehid dehidrogenase (ALDH) dalam serum serta perubahan histologis jaringan hati. ALDH merupakan marka biokimia dari etanol yang sensitif dan spesifik setelah pemberian alkohol kronis. Darah tikus diambil 6 dan 24 jam setelah pemberian alkohol peroral berulang secara kronis, kadar ALDH serum diuji dengan Elisa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar ALDH dalam darah tikus Wistar perlakuan meningkat secara signifikan jika dibandingkan dengan tikus kontrol. Kadar ALDH meningkat sebesar 83,11% setelah pemberian alkohol 5% dan 112,05% setelah pemberian alkohol 20% pada darah yang diambil setelah 6 jam pemberian alkohol selama 6 minggu. Pada darah yang diambil setelah 24 jam, kadar ALDH meningkat sebesar 95,11% setelah pemberian alkohol 5% dan 86,79% setelah pemberian alkohol 20%. Pemberian alkohol 20% peroral secara kronis juga mengakibatkan perubahan struktur mikroskopis (nekrosis) jaringan hati pada tikus Wistar. Kerusakan jaringan hati terjadi akibat pemakaian alkohol secara berulang yang disertai dengan peningkatan kadar ALDH dalam serum tikus Wistar.

Kata kunci: kerusakan hati, aldehid dehidrogenase, alkohol, tikus Wistar

ABSTRACT

The aims of this study was to determine the liver damage from alcohol intoxication in Wistar rats. The design used in this study was a randomized true experimental post test only control group design. The study used 15 rats divided into 3 treatment groups each of which consists of 5 rats. The first group was given distill water. The second group was given 5% alcohol, and the third group was given 20% alcohol. Rats were treated with alcohol daily for six weeks. Biochemical markers were detected the levels of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in serum and histological changes in liver tissue. ALDH is a biochemical marker of a sensitive and specific ethanol after chronic alcohol administration. Blood sample was collected at 6 and 24 hours after the last peroral administration of repeated alcohol treatment, and serum levels of ALDH was tested by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that the levels of ALDH in the blood of alcohol treated Wistar rats significantly higher as compared to those of control rats. ALDH levels increased by 83.11% after administration of 5% alcohol and 112.05% after administration of 20% taken after 6 hours of alcohol for 6 weeks. On samples taken after 24 hours, ALDH levels by 95.11% after administration of 5% alcohol and 86.79% after administration of 20% alcohol. Oral treatment with 20% alcohol chronically was led to changes in the microscopic structure (necrosis) of liver tissue in Wistar rats. Liver tissue damage occurred due to repeated use of alcohol is accompanied by increasing serum levels of ALDH in Wistar rats.

Keywords: Liver damage, aldehyde dehydrogenase, alcohol, Wistar rats

PENDAHULUAN

Konsumsi alkohol peroral secara berulang dapat mengakibatkan penyakit alkoholik pada manusia. Bila seseorang minum alkohol terus menerus, enzim pencernaan yang mengoksidasi alkohol akan menjadi jenuh berakibat meningkatkan kadar alkohol darah (KAD) dengan cepat. Nilai KAD yang tinggi dapat menimbulkan berbagai efek toksik pada manusia. Penentuan KAD mempunyai nilai yang penting dalam menentukan apakah seseorang itu alkoholik atau bukan. Penentuan tingkat konsumsi alkohol dengan mengukur KAD mempunyai keterbatasan waktu karena alkohol yang dikonsumsi akan menghilang dengan cepat dari peredaran darah. Untuk itu perlu dicari marka biokimia dari alkohol selain etanol yang dapat dideteksi dalam waktu lebih lama dalam tubuh.

Di Swis dan Inggris seseorang dilarang mengendarai mobil di jalan raya bila mempunyai KAD 80 mg/100ml atau lebih dan kadar alkohol urin (KAU) 107 mg/100ml (Sutter, 2002; Shepherd, 2003). Di Indonesia, tingkat konsumsi alkohol terus meningkat dari tahun ke tahun, namun belum ditetapkan batas KAD dan KAU yang diperbolehkan bagi seseorang untuk mengendarai mobil di jalan raya (Sebayang, 2007).

Etanol dapat dioksidasi menjadi asetaldehid dan dioksidasi lagi menjadi asam asetat oleh aldehid dehidrogenase (ALDH). Baik etanol maupun asetaldehid dapat bereaksi dengan biomolekul dalam tubuh membentuk berbagai senyawa yang stabil. Akumulasi asetaldehid dapat menyebabkan berbagai penyakit hati (Koivisto, 2007; Das, *et al.*, 2008).

Di Indonesia penentuan tingkat konsumsi alkohol pada seseorang umumnya dilakukan dengan pemeriksaan etanol dalam darah. Selain itu, jika konsumsi alkohol menimbulkan kerusakan hati maka marka untuk penentuan tingkat konsumsi alkohol adalah terjadi peningkatan kadar *Serum Glutamic-Piruvic Transaminase* (SGPT) dan *Serum Glutamic-Oxaloacetic Transaminase* (SGOT) di dalam darah. Namun, kadar SGPT merupakan marka kerusakan hati yang akut, sedangkan SGOT merupakan marka kerusakan hati yang kronis. Tingkat kerusakan hati biasanya dapat dilihat dari adanya peningkatan rasio SGPT/SGOT lebih dari dua kali angka normal (Wallach, 2004; POA, 2006). Karena itu, nilai SGPT dan SGOT juga merupakan marka

biokimia bagi kerusakan hati karena alkohol. Namun, pemeriksaan ALDH tampaknya mempunyai tingkat spesifisitas yang tinggi dan lebih stabil sehingga perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian alkohol peroral secara berulang pada tikus Wistar untuk mengetahui peningkatan kadar ALDH sebagai marka biokimia berupa enzim yang mengoksidasi etanol dalam hati tikus Wistar.

Tujuan khusus penelitian ini adalah untuk mengetahui peningkatan kadar aldehid dehidrogenase dalam darah tikus Wistar setelah pemberian alkohol peroral selama enam minggu, dan untuk mengetahui pengaruh alkohol peroral secara berulang terhadap perubahan struktur mikroskopis jaringan hati pada tikus Wistar.

METODE PENELITIAN

Sampel dan Hewan Coba

Dalam penelitian ini dipakai sampel darah tikus Wistar jantan sebanyak 15 ekor, umur 8-9 minggu, bobot awal 200 g untuk analisis aldehid dehidrogenase (ALDH) dalam serum dan hati tikus untuk melihat kerusakan histopatologi. Ketiga kelompok tikus (kontrol, perlakuan alkohol 5%v/v, dan alkohol 20%v/v) diadaptasikan di kandang Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana selama satu bulan. Selanjutnya kelompok perlakuan diberikan alkohol peroral secara kronis (enam minggu) serta kelompok kontrol diberikan akuades.

Analisis Aldehid Dehidrogenase

Antigen diletakkan pada permukaan agar dan konsentrasi antigen sebagai kurva standar yang digunakan untuk menghitung konsentrasi antigen yang tak diketahui. Cawan atau permukaan lainnya kemudian dilapisi sampel serum antigen yang tak diketahui, dilemahkan sama seperti antigen standar. Karena tak Bergeraknya antigen pada langkah ini menyebabkan penyerapan non-spesifik, jadi konsentrasi protein total harus mirip dengan antigen standar. Cairan konsentrasi *non-interacting* seperti *bovine serum albumine* (BSA) atau kasein, ditambahkan pada semua cawan. Langkah ini dikenal dengan penghalangan, karena serum protein memblokir penyerapan non-spesifik protein lainnya pada cawan. Cawan kemudian dicuci, lalu antibodi yang spesifik terhadap antigen diletakkan pada semua cawan.

Antibodi ini hanya akan terikat pada antigen yang tidak bergerak pada permukaan, bukan pada serum protein lainnya atau protein yang terblokir. Cawan dicuci untuk menghilangkan antibodi yang tak terikat. Setelah pencucian, hanya antibodi-antigen kompleks yang tetap melekat pada cawan. Antibodi kedua, yang akan terikat pada antibodi deteksi, ditambahkan pada cawan. Antibodi kedua ini berkonjugasi pada enzim yang memiliki zat tertentu. Langkah ini dapat dilewati jika antibodi deteksi berkonjugasi pada enzim. Cawan dicuci dari sisa antibodi dan enzim yang tidak terikat dapat dihilangkan. Zat yang telah diubah oleh enzim diletakkan untuk membuat tanda kromogenik. Hasilnya ditampilkan dengan Elisa reader.

Penyiapan Sediaan Histopatologi

Sampel hati tikus Wistar diambil dengan alat-alat bedah standar yang sudah dibersihkan dan disterilkan. Setelah hewan mati, hati tikus Wistar diambil dan kemudian dicuci dengan larutan buffer dan dimasukkan ke dalam larutan pengawet 10 kali volume hati. Selanjutnya dilakukan proses pengawetan atau fiksasi dengan larutan 10% formalin yang terdiri dari 100 mL formaldehid 40% dan 900 mL aquadestilata. Setelah satu jam difiksasi, sampel dipindahkan ke dalam campuran alkohol dan kloroform dengan perbandingan sama, kemudian dicuci dengan air kran. Untuk mencegah terjadinya pengerutan atau *collapse* maka airnya dikeluarkan dengan merendam dalam larutan alkohol 70% secara bertingkat. Proses selanjutnya adalah *clearing* dengan xylol, infiltrasi dengan paraffin cair, *embedding* dikerjakan dekat pembakar bunsen sampai mengeras dan disimpan dalam lemari es selama 6 jam, pemotongan jaringan (*sectioning*) dengan alat *microtome* dengan ketebalan 1-10 mikron, dan pewarnaan (*staining*) dengan haematoxylin dan eosin masing-masing untuk pewarnaan inti sel (warna biru) dan sitoplasma (merah). Tahap terakhir adalah sediaan ditaruh di atas gelas objek lalu di-dehidrasi dengan alkohol bertingkat dan xylol serta *dimounting* dengan entellan untuk penampakan tetap transparan.

Analisis Data

Data yang terkumpul dianalisis menggunakan perangkat lunak *SPSS for Window Version 13.0*. Data ALDH dianalisis dengan sidik ragam (Anova). Jika perlakuan memberikan pengaruh yang nyata maka pengujian dilanjutkan *Post Hoc* dengan beda

nyata terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Data histopatologi berupa gambar disajikan secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Aldehid Dehidrogenase dalam Darah Tikus Wistar

Kadar ALDH dalam darah tikus Wistar dapat ditentukan setelah pemberian alkohol peroral secara berulang secara kronis. Rataan kadar ALDH pada tikus kontrol (yang tidak diberikan alkohol) pada darah yang diambil setelah 6 jam perlakuan adalah 3,9801±0,4498 U/L dan pada darah yang diambil setelah 24 jam perlakuan adalah 3,9581±0,4661 U/L. Pada tikus Wistar yang diberi alkohol kronis kadar ALDH yang diperiksa 6 jam setelah pemberian terakhir alkohol 5% adalah 7,2878±0,1465 U/L dan alkohol 20% adalah 8,4399±0,5844 U/L sedangkan setelah pemberian 24 jam dengan alkohol 5% adalah 7,7228±0,6406 U/L dan alkohol 20% adalah 7,3933 ±0,2739 U/L. Uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan bahwa semua data berdistribusi normal (P>0,05). Selanjutnya uji homogenitas data menunjukkan bahwa data kadar ALDH dalam darah tikus Wistar adalah homogen (p>0,05). Dengan demikian, semua data dapat dianalisis dengan uji parametrik menggunakan sidik ragam/ Anova satu arah.

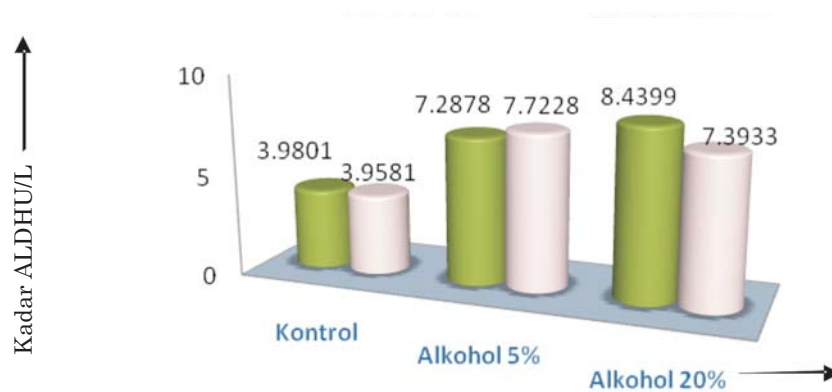
Perbedaan kadar ALDH dalam darah tikus Wistar yang diambil 6 dan 24 jam setelah pemberian alkohol 5% maupun 20% secara kronis berbeda (Tabel 1)

Pada pemberian alkohol kronis, saat dilakukan pemeriksaan 6 jam setelah pemberian alkohol terakhir, kadar ALDH darah tikus yang diberikan alkohol 5% (7,2878 U/L) dan 20% (8,4399 U/L) meningkat secara bermakna jika

Tabel 1. Kadar aldehid dehidrogenase dalam darah tikus Wistar setelah pemberian alkohol berulang secara kronis

Perlakuan	6 Jam	24 Jam
Kontrol	3,9801	3,9581
Alkohol 5%	7,2878*	7,7228*
Alkohol 20%	8,4399*	7,3933*

Keterangan:* berbeda bermakna secara statistik antara tikus kontrol dan perlakuan (5 dan 20%) dalam darah yang diambil 6 dan 24 jam



Gambar 1. Grafik kadar aldehid dehidrogenase pada tikus Wistar kontrol, alkohol 5%, dan 20% berulang secara kronis ■ ALDH_6 Jam □ ALDH_24 Jam



Gambar 2. Gambaran histologi jaringan hati tikus Wistar yang tidak diberikan alkohol (kontrol), tampak sel hati yang masih normal (↗)(I) dan gambaran histologi jaringan hati tikus Wistar setelah pemberian alkohol 20% secara kronis, tampak adanya kerusakan sel hati (↗)(II).

dibandingkan dengan kadar ALDH pada tikus kontrol (3,9801 U/L) (Gambar 1). Demikian pula pemberian alkohol kronis pada pemeriksaan 24 jam, kadar ALDH darah tikus yang diberikan alkohol 5% (7,7228 U/L) dan 20% (7,3933 U/L) meningkat secara bermakna jika dibandingkan dengan tikus kontrol (3,9581 U/L).

Terjadi peningkatan kadar ALDH sebesar 83,11% pada pemberian alkohol 5% dan 112,05% pada pemberian alkohol 20%. Hasil pada pemberian alkohol kronis setelah pemeriksaan 24 jam juga ditemukan perbedaan yang bermakna antara kadar ALDH darah tikus kontrol dan yang diberikan alkohol 5% dengan beda rata-rata sebesar 3,7647 atau terjadi peningkatan kadar ALDH sebesar 95,11%. Perbedaan yang bermakna juga ditemukan pada kadar ALDH antara tikus kontrol dan yang diberikan alkohol 20% dengan beda rata-rata 3,4352 atau terjadi peningkatan 86,79%. Hal tersebut berarti bahwa minum etanol terus menerus merangsang pembentukan enzim *inducer* sehingga etanol dioksidasi secara maksimal menjadi asam asetat sebagai prekursor asam lemak.

Pemberian alkohol peroral secara berulang pada tikus Wistar dapat meningkatkan kadar ALDH. Hal tersebut dapat digunakan sebagai marka biokimia pada pemberian alkohol secara kronis. Marchitti *et al.*, (2008) melaporkan bahwa aldehid merupakan molekul reaktif yang dapat dioksidasi menjadi asetat oleh enzim ALDH. Pada orang yang mengonsumsi alkohol terjadi peningkatan kadar asetaldehid yang bersifat toksik terhadap berbagai organ/jaringan tubuh. Untuk mencegah keracunan tubuh oleh asetaldehid, tubuh memproduksi enzim ALDH yang dapat mengubahnya menjadi asetat (Hoek *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2007). Makin banyak alkohol yang dikonsumsi, makin banyak pula diperlukan enzim ALDH untuk mengubah asetaldehid menjadi asetat. Pemberian alkohol secara kronis menyebabkan seseorang terbiasa minum (toleransi terhadap alkohol). Hal tersebut erat kaitannya dengan meningkatnya kadar ALDH dalam tubuh. Peran ALDH dalam mengubah asetaldehid menjadi asetat juga dibuktikan dalam fungsinya menghidrolisis ester, antioksidan, bioaktivasi

racun, dan absorpsi sinar ultraviolet (Marchitti *et al.*, 2008).

ALDH berperan penting dalam toleransi dan ketergantungan seseorang terhadap alkohol. Di dalam otak, enzim katalase yang fungsinya sama dengan ADH, dapat mengubah etanol menjadi asetaldehid yang mengganggu kerja beberapa mediator sistem saraf pusat. Nakamura *et al.* (2004) juga melaporkan bahwa akumulasi asetaldehid menyebabkan pelepasan sel Kupffer, TNF- α , dan inflamasi hati akut pada tikus.

Konsumsi alkohol secara kronis sebanyak 90 g alkohol per hari selama 5 tahun atau lebih pada manusia dapat menyebabkan perubahan patologi dan penyakit pada beberapa sistem organ tubuh seperti hati, jantung, dan pankreas. Perubahan patologi yang teramati adalah fibrosis dan kardiopati akibat keracunan alkohol dapat disembuhkan dengan pemberian suplemen seng/*zink* dalam diet (Jones, 2005). Mineral seng menghambat apoptosis sel dan kerusakan hati dengan cara menghalangi pembentukan fatty acid etilester/FAEE (Ciesielska *et al.*, 2007). Konsumsi alkohol dapat meningkatkan risiko kanker pada sistem pencernaan terutama pada individu yang menderita kekurangan ALDH (Seitz *et al.*, 2001).

Perubahan Struktur Mikroskopis Jaringan Hati pada Tikus Wistar

Pemeriksaan histologi jaringan hati tikus Wistar kontrol (tidak diberikan alkohol) menunjukkan bahwa tidak ditemukan adanya perubahan sel-sel hati. Jaringan hati yang normal ditandai dengan adanya sel parenkim dan sel lainnya yang tampak normal pada pemeriksaan mikroskopis (Gambar 1.I). Jaringan hati juga tampak normal pada tikus Wistar yang diberikan alkohol 5% secara kronis. Namun, pada pemberian alkohol 20% secara kronis terdapat kerusakan jaringan hati yang meluas yang ditandai dengan pembengkakan sel hati dengan sitoplasma yang keruh. Keseluruhan sel hati tampak tersusun rapat satu sama lain dengan nukleus tetap di tengah (Gambar 1.II).

Hasil pemeriksaan histologi jaringan hati tikus kontrol menunjukkan bahwa tidak kelihatan terjadi kerusakan (Gambar 1.I.) Demikian juga hati tikus setelah pemberian alkohol akut dan kronis 5% tidak ditemukan adanya perubahan pada sel parenkim tetapi

warnanya agak keruh. Setelah pemberian alkohol 20% secara kronis, secara mikroskopis sel hati terlihat membengkak atau tampak membesar dengan sitoplasma keruh. Keseluruhan sel hati terlihat rapat satu sama lain dengan nukleus tetap di tengah (Gambar 2.II).

Tanda-tanda kerusakan struktur mikroskopis jaringan hati tersebut mengindikasikan bahwa mengkonsumsi alkohol 5% secara kronis belum mengakibatkan kerusakan jaringan hati. Namun, pemberian alkohol 20% secara kronis tampak berdampak buruk terhadap jaringan hati. Seitz *et al.*, 2001 melaporkan bahwa konsumsi alkohol kronis juga mengakibatkan peningkatan risiko kanker pada sistem pencernaan, hati, dan pernafasan.

Pemberian alkohol 5% secara kronis belum mempengaruhi struktur jaringan hati. Kerusakan hati mulai tampak pada pemberian alkohol 20% secara kronis. Kerusakan hati berkaitan dengan akumulasi asetaldehid yang berlebihan pada jaringan hati tikus yang diberikan alkohol dosis tinggi dalam waktu yang lama. Asetaldehid merupakan senyawa beracun sebagai hasil dari metabolisme etanol (Pronko, 2002; Das *et al.*, 2008) yang dioksidasi menjadi asetat (yang tidak beracun) oleh enzim ALDH (Yoon *et al.*, 2005; Lu dan Morimoto, 2009). Akumulasi asetaldehid dalam jaringan seperti hati telah dibuktikan dapat menimbulkan kerusakan sel, terutama dengan cara meningkatkan stres oksidatif atau nitrosatif, mengganggu fungsi mitokondria, meningkatkan produksi sitokin proinflamasi, mengaktifasi signal kematian sel dan menurunkan kadar antioksidan tubuh (Moon *et al.*, 2007). Gangguan seperti itulah yang tampaknya menyebabkan kerusakan sel yang meluas di dalam jaringan hati (Gambar 1.II).

SIMPULAN

Kerusakan hati teramati secara histopatologi disertai dengan peningkatan kadar aldehid dehidrogenase setelah keracunan alkohol peroral secara berulang. Alkohol peroral secara kronis mengakibatkan perubahan negatif struktur mikroskopis jaringan hati. Marka biokimia ALDH dapat dipakai sebagai uji diagnostik setelah 24 jam pemberian alkohol peroral.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat terlaksana atas pendanaan dari BPPS dan Hibah Doktor 2010. Ucapan terimakasih kepada berbagai pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ciesielska AS, Plewka K, Daniluk J, Szerszen MK. 2007. Zink inhibits HepG2 cell Apoptosis induced by Acetaldehyde and Fatty Acid Ethyl Esters. *Journal of pre-Clinical and Clinical Research* 1:127-134.
- Das SK, Dhanya L, Vasudevan DM. 2008. Biomarkers of Alcoholism: an updated review. *The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. Informa healthcare 68: 81-92.
- Hoek JB, Pastorino JG. 2004. Cellular Signaling Mechanisms in Alcohol-Induced Liver Damage. 24: 257-272.
- Jones WK. 2005. A Murine Model of Alcoholic Cardiomyopathy: A Role for Zinc and Metallothionein in Fibrosis. *J. of American Phatology*. 167:301-304.
- Koivisto H. 2007. Biomarkers for Assessing Ethanol Consumption and the Development of Alcoholic Liver Disease: Immune Responses against Ethanol Metabolites, Cytokine Profiles and Markers of Fibrogenesis. *Dissertation* Faculty of Medicine University of Tampere.
- Lu Y, Morimoto K. 2009. Is Habitual Alcohol Drinking with reduced Electrophoretic DNA Migration in Peripheral Blood Leukocytes from ALDH2-deficient male Japanese. *Mutagenesis* 24: 303-308.
- Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V. 2008. Non-P450 Aldehyde Oxidizing Enzymes: The Aldehyde Dehydrogenase Superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4: 697-720.
- Moon K, Abdelmegeed MA, Song B. 2007. Inactivation of Cytosolic Aldehyde Dehydrogenase via Nitrosylation in Ethanol-Exposed Rat Liver. *FEBS Lett* 21:3967-3972.
- Nakamura Y, Yokohama H, Higuchi S, Hara S, Kato S, Ishi H. 2004. Acetaldehyde Accumulation Suppresses Kupffer Cell release of TNF- α and modifies acute hepatic inflammation in rats. *J Gastroenterology*. 39: 140-147.
- POA (Pathology of Alcohol). 2006. Pathology of Alcohol: The legs go before the Liver. *The Biomedical Sciences*. January 2006. 48-49.
- Pronko P, Bardina L, Satanovskaya V, Kuzmich A, Zimatkin S. 2002. Effect of Chronic Alcohol Consumption on the Ethanol and Acetaldehyde Metabolizing Systems in the Rat Gastrointestinal Tract. *Alcohol and Alcoholism* 37:229-235.
- Sebayang S. 2007. Kecelakaan pembunuhan terbesar. www.unila.ac.id/berita/berita-depan/ Friday, 27 April 2007.
- Seitz HK, Matsuzaki S, Yokohama A, Hormann N, Vakevainen S, Dong WX. 2001. Alcohol and Cancer. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 25:137s-143s.
- Shepherd R. 2003. *Simpson's Forensic Medicine*. 12th Ed. London: Arnold. <http://www.ArnoldPublisher.Com>.
- Sutter K. 2002. Determination of ethanol in Blood: Analytical Aspects, Quality Control, and Theoretical Calculation for Forensic Applications. *Abstract Ingentaconnect, Chimia International J for Chemistry* 56: 59-62.
- Wallach J. 2004. *Interpretation of Diagnostic tests*. 8th Ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Yamamoto H, Tanegashima A, Hosoe H, Fukunaga T. 2000. Fatal Acute Alcohol Intoxication in an ALDH2 Heterozigote: A case Report. *Forensic Sciences International* 112: 201-207.
- Yoon M, Madden MC, Barton HA. 2006. Developmental Expression of Aldehyde Dehydrogenase in Rat: a Comparison of Liver and Lung Development. *Toxicological Sciences* 89: 386-398.