

Pengaruh Ekstrak Daun Salam terhadap Gambaran Histopatologi Sel Hepar Tikus Galur *Sprague Dawley* yang Diinduksi DMBA (Dimetilbenz[A]Antrasen)

The Effect of Giving *Eugenia Polyantha* Extract to Liver Histopathology on *Rattus Norvegicus* Strain *Sprague Dawley* Induced with DMBA (*Dimetilbenz[A]Antrasen*)

¹Iwan Sahrial Hamid, ²Reina Puspita R, ¹Ratna Damayanti, ¹Husni Anwar

¹ Fakultas Kedokteran Hewan Unair

² PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya-60115.

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email : kelana_dawley68@yahoo.com

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the changes of liver histopathologi after 20 mg/kg BW DMBA (*Dimetilbenz[a]antrasen*) induced and *Eugenia polyantha* extract on *Sprague dawley* rats liver cell. The reasearch has been done on February, 20th 2011- December, 28th 2011 at Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University. 20 female rats (*Rattus norvegicus* strain *Sprague dawley*) aged 40 days with BW 60-70 g were used. The rats Devided into five groups; rats in the first group was only given with DMBA and corn oil; second group was given with CMC-Na and corn oil; The third group was given with *Eugenia polyantha* extract 250 mg/kg Bw dose and DMBA; The fourth and fifth group were given the same treatment as the third group, only using higher dose of *Eugenia polyantha* was 500 and 750 mg/kg BW. The data were compared using *Kruskal -Wallis* and *Mann-Withney* test. Statistical comparisons were performed using SPSS 18.0 for windows. This research showed that *Eugenia polyantha* extract with DMBA induction could inhibit necrosis of cells at dose 500 mg/kg BW but *Eugenia polyantha* all of dose could not inhibit portal inflammation.

Keywords : DMBA induction , liver histopathology, *Eugenia polyantha* extract

Pendahuluan

Seiring dengan kemajuan teknologi, dapat menimbulkan dampak terhadap lingkungan. Hasil limbah teknologi dan industri yang tidak ditangani dengan benar dapat menyebabkan terjadinya kontaminasi lingkungan, baik lingkungan air, udara dan tanah. Bahkan, dalam menjalani kehidupan saat ini, masyarakat tidak bisa lepas dari bahaya bahan-bahan biologi, polutan dan zat-zat kimia berbahaya (Zhang and Larry, 2006).

Kontaminan lingkungan dan zat-zat berbahaya tersebut dapat menjadi inisiator yang menimbulkan keganasan dan secara tidak langsung akan menyebabkan terjadinya tumor atau kanker. Salah satu senyawa karsinogen yaitu dari golongan PAH (*Polycyclic Aromatic Hidrocarbon*). Senyawa tersebut dapat terjadi akibat proses pengasapan makanan, zat kimia nitrosamin, zat fisik karena radiasi nuklir, atau zat biologi di alam seperti

racun pada tembakau. PAH (*Polycyclic Aromatic Hidrocarbon*) akan merusak keutuhan sel dan intinya sehingga bersifat mutagenik yaitu sel-sel normal setelah dicemari zat tersebut menjadi sel kanker yang berkembang biak tak terkendali (Andayani dkk, 2008).

DMBA (*Dimetilbenz[a]antrasen*) merupakan salah satu senyawa toksik dari golongan senyawa PAH (*Polycyclic Aromatic Hidrocarbon*) yang sangat spesifik untuk pembuatan model kanker payudara pada beberapa hewan uji jika diberikan secara peroral atau intragastrik. DMBA (*Dimetilbenz[a]antrasen*) diabsorbsi di dalam intestinal dan masuk ke dalam sirkulasi darah, kemudian menuju vena porta, dan mengalami metabolisme di hepar menjadi metabolit *epoksida dehidrodiol* yang sangat reaktif. Metabolit ini mampu berinteraksi dengan target makromolekul di dalam tubuh (DNA) dan dapat menyebabkan

kerusakan DNA sehingga terjadi proses karsinogenesis (Silverman, 2000).

Pengaruh negatif paparan senyawa tersebut dapat menyebabkan kerusakan sel dan jaringan hepar. Hepar merupakan organ tubuh yang rentan terhadap pengaruh bahan toksin. Selain itu, organ ini sangat penting untuk mempertahankan hidup dan berperan dalam setiap fungsi metabolik tubuh (Price and Wilson, 2006).

Paparan senyawa dari golongan PAH (*Polycyclic Aromatic Hidrocarbon*) dalam waktu yang lama akan menyebabkan gangguan proses metabolisme tubuh dan apabila hepar sudah tidak mampu lagi melindungi tubuh dari zat karsinogen tersebut maka sel hepatosit akan menunjukkan kelainan fungsi yang diikuti dengan perubahan morfologis tertentu bahkan dapat menyebabkan kerusakan sel bersifat *irreversible* (cedera letal) yang berlanjut pada kematian sel (Pratt, 2011).

Maka dari itu, sel hepar perlu mendapat kompensasi dari senyawa antioksidan yang dapat mengurangi bahaya dari paparan senyawa karsinogen tersebut. Apabila sel telah terkompensasi dan paparan karsinogen dapat dikurangi maka sel akan kembali menjadi normal.

Penggunaan daun salam (*Eugenia polyantha*) tampaknya menjadi alternatif untuk diketahui aktivitasnya sebagai antioksidan yang dapat melawan senyawa karsinogen serta sebagai hepatoprotektor. Daun salam mudah di dapat di Indonesia dan memiliki kandungan kimia yang sangat bermanfaat bagi tubuh. Ekstrak daun salam mengandung senyawa flavonoid yang mampu menghambat karsinogenesis. Senyawa flavonoid tersebut dapat menghambat proliferasi melalui inhibisi proses oksidatif penyebab inisiasi kanker (Ren *et al.*, 2003).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Jati (2008) menyebutkan bahwa daun salam (*Eugenia polyantha*) memiliki aktivitas dalam menangkap radikal bebas. Utami dkk. (2005) juga melaporkan bahwa daun salam (*Eugenia polyantha*) memiliki aktivitas antioksidan secara *in vitro*.

Berdasarkan latar belakang tersebut maka perlu dibuktikan khasiat ekstrak daun *Eugenia polyantha* sebagai antioksidan yang dapat menekan kerusakan sel hepar dan untuk melihat apakah setelah pemberian daun salam, organ hepar masih mampu untuk mendetoksi senyawa DMBA

(*Dimetilbenz[a]antrasen*) ataukah hepar sudah tidak mampu lagi menetralkan senyawa DMBA (*Dimetilbenz[a]antrasen*) tersebut.

Materi dan Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai Februari 2011- Desember 2011 di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* betina umur 40 hari dengan berat antara 60-70 g. Ekstrak etanol daun salam dibagi dalam tiga macam dosis yaitu 250, 500 dan 750 mg/kg berat badan. Sebagai bahan karsinogen digunakan DMBA (*Dimetilbenz[a]antrasen*) (Sigma Chem Co).

Peralatan yang digunakan antara lain *rotary evaporator*, timbangan elektrik, pH meter dan *vortex*, *oral microspuit injektor*, mortir dan stamper, seperangkat alat bedah, pot salep, *backer glass*, tube steril, labu takar, pipet tetes, timbangan gram elektrik, steril *disposable siringe*, kandang hewan coba, *object glass*, pipet, *tissue processor automatic*, *water bath*, *hot plate*, *microtome* dan blade serta mikroskop.

Metode Penelitian

Dalam penelitian ini terdapat lima perlakuan. Perlakuan tersebut adalah :

- I. Kelompok Kontrol Positif DMBA : Hanya diberi DMBA 20 mg/kg BB dalam corn oil secara peroral.
- II. Kelompok Kontrol Negatif: Diberi CMC- Na 0,5 % dan corn oil. Tanpa diberi ekstrak dan DMBA.
- III. Kelompok Perlakuan Dosis Ekstrak 250 mg/kg BB: Diberi ekstrak etanol *Eugenia polyantha* dosis 250 mg/kg BB peroral dan DMBA 20 mg/kg BB
- IV. Kelompok Perlakuan Dosis Ekstrak 500 mg/kg BB: Diberi ekstrak *Eugenia polyantha* dosis 500 mg/kg BB peroral dan DMBA 20 mg/kg BB
- V. Kelompok Perlakuan Dosis Ekstrak 750 mg/kg BB: Diberi ekstrak *Eugenia polyantha* dosis 750 mg/kg BB peroral dan DMBA 20 mg/kg BB

Pembuatan Larutan Karsinogen DMBA dalam Minyak Jagung

DMBA ditimbang secara analitik, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah dengan minyak jagung dengan volume tertentu. Selanjutnya diaduk dengan alat vortex sampai terlarut dan homogen.

Rumus umum yang digunakan adalah :

Volume pemberian DMBA = berat badan tikus / 1000 x 20 / kadar DMBA

Sebanyak 60,0 mg DMBA ditimbang dan dilarutkan dalam 30,0 ml minyak jagung, hingga diperoleh larutan DMBA dengan kadar 2 mg/ml. Tikus dengan berat badan 60 g diberi DMBA dengan volume pemberian 0,6 ml. Volume pemberian DMBA menjadi Berat Badan / 100

Pembuatan Larutan uji

Ekstrak etanolik *Eugenia polyantha* yang akan diberikan pada hewan coba disuspensikan dalam aquades dengan *suspending agent* CMC-Na 0,5 % di dalam mortir. Pembuatan CMC-Na 0,5 % dengan cara menaburkan CMC-Na 0,1 g dalam aquades hangat 20 ml dan diaduk sampai larut.

Rumus umum yang digunakan adalah :

Volume pemberian = berat badan tikus / 1000 x dosis / kadar ekstrak

Sebanyak 1 g ekstrak etanolik *Eugenia polyantha* disuspensikan dalam CMC-Na 0,5 % 20 ml, sehingga diperoleh kadar ekstrak 50 mg/ml.

Cara Menghitung Nilai Skor pada Hepar

1. Inflamasi pada Portal

Diamati adanya sel radang pada lima portal,

perbesaran 400 kali

0 : Apabila tidak terdapat infiltrasi sel radang pada portalis

1 : Satu dari lima portal terdapat infiltrasi sel radang

2 : Dua sampai tiga portal terdapat infiltrasi sel radang

3 : Empat sampai lima portal terdapat infiltrasi sel radang

2. Nekrosis

Diamati adanya perubahan degeneratif nekrosis berupa piknosis, karioreksis dan kariolisis pada lima lapangan pandang pada setiap preparat dan dihitung rata-ratanya, perbesaran 400 kali (Kleiner, 2005).

0 : Tidak ditemukan nekrosis dalam satu lobus hati

1 : Terjadi nekrosis ringan (< 1/3 area lobus hati)

2 : Terjadi nekrosis sedang (antara 1/3 sampai 2/3 lobus hati)

3 : Terjadi nekrosis berat (> 2/3 lobus hati)

Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan Lima perlakuan dan Empat ulangan (Kusriningrum, 2008). Data dianalisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney* dengan taraf signifikan sebesar 5% untuk mengetahui perlakuan mana yang terbaik.

Hasil dan Pembahasan

Pengamatan Nekrosis pada Lobus Hepar

Tabel 1. Efek ekstrak etanolik *Eugenia polyantha* terhadap tingkat nekrosis pada tiap perlakuan

Kelompok	Skor Nekrosis (Mean±SD)
<u>Kontrol positif</u>	
DMBA 20 mg/kg BB + Corn oil	2,250 ^c ± 0,1000
<u>Kontrol negatif</u>	
CMCNa 0,5 % + Corn Oil	1,350 ^a ± 0,1000
<u>Perlakuan I</u>	
DMBA 20 mg/ kg BB+ ekstrak <i>Eugenia polyantha</i> 250 mg/kg BB	2,150 ^c ± 0,1915
<u>Perlakuan II</u>	
DMBA 20 mg/kg BB + ekstrak <i>Eugenia polyantha</i> 500 mg/kg BB	1,700 ^b ± 0,1155
<u>Perlakuan III</u>	
DMBA 20 mg/kg BB + ekstrak <i>Eugenia polyantha</i> 750 mg/kg BB	2,050 ^c ± 0,1000

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar tiap perlakuan (p<0,05)

Tabel 2. Efek ekstrak etanolik *Eugenia polyantha* terhadap infiltrasi sel radang pada portal

Kelompok	Sel Radang pada Portal (Mean $\pm$ SD)
<u>Kontrol positif</u> DMBA 20 mg/kg BB + Corn oil	3,00 ^b $\pm$ 0,000
<u>Kontrol negatif</u> CMCNa 0,5 % + Corn Oil	2,00 ^a $\pm$ 0,000
<u>Perlakuan I</u> DMBA 20 mg/ kg BB+ ekstrak <i>Eugenia polyantha</i> 250 mg/kg BB	2,50 ^{ab} $\pm$ 0,577
<u>Perlakuan II</u> DMBA 20 mg/kg BB + ekstrak <i>Eugenia polyantha</i> 500 mg/kg BB	2,25 ^{ab} $\pm$ 0,500
<u>Perlakuan III</u> DMBA 20 mg/kg BB + ekstrak <i>Eugenia polyantha</i> 750 mg/kg BB	2,50 ^{ab} $\pm$ 0,577

Keterangan : Superskrip yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata antar tiap perlakuan ($p>0,05$)

Berdasarkan Tabel 1. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa skor nekrosis tertinggi terdapat pada kelompok kontrol positif yaitu sebesar $2,250^{\circ} \pm 0,1000$ dan tidak berbeda nyata ($p>0,05$) dengan kelompok perlakuan I dan III yaitu sebesar $2,150^{\circ} \pm 0,1915$ dan $2,050^{\circ} \pm 0,1000$. Sedangkan skor nekrosis terendah terjadi pada kelompok kontrol negatif yaitu sebesar $2,250^{\circ} \pm 0,1000$. Kelompok perlakuan II menunjukkan nekrosis sebesar $1,700^b \pm 0,1155$. Kelompok perlakuan II ini berbeda nyata ($p<0,05$) dengan kelompok perlakuan I, kelompok perlakuan III dan kelompok kontrol positif. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Eugenia polyantha* dosis 500 mg/kg BB mampu menurunkan nekrosis tetapi masih dalam kategori ringan (Kleiner, 2005). Pemerian ekstrak etanol *Eugenia polyantha* dosis 500 mg/kg BB tidak mampu menurunkan nekrosis sebanding dengan keadaan normal pada kelompok kontrol negatif.

Pada hasil penelitian didapatkan bahwa dosis ekstrak paling tinggi, yaitu dosis 750 mg/kg BB tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap penurunan tingkat nekrosis ($p>0,05$). Hal ini disebabkan karena semakin tinggi dosis akan menginduksi enzim GST (*Glutathione S-transferase*) dalam jumlah yang sangat tinggi (Kolaez *et al.*, 2007). Enzim GST yang dihasilkan terlalu tinggi maka akan menyebabkan ekstrak

tersebut dikonjugasi sendiri oleh GST (*Glutathione S-transferase*) dalam jangka waktu yang cukup pendek, GST menjadi berkemampuan untuk melakukan *feed back mechanism* atau mengalami homeostasis kadar enzim, sehingga mekanisme ekstrak dalam tubuh tidak berlangsung lama (Kolaez *et al.*, 2007). Hal tersebut dapat mengakibatkan aktifitas karsinogen dalam tubuh belum sepenuhnya dihambat oleh ekstrak etanolik *Eugenia polyantha*.

Pengamatan Inflamasi Pada Portal

Berdasarkan Tabel 2. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa kontrol negatif berbeda nyata dengan kontrol positif. Perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III tidak berbeda nyata ($p>0,05$) baik dengan kelompok kontrol positif maupun negatif. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Eugenia polyantha* ketiga dosis tidak memiliki perbedaan yang nyata terhadap penurunan sel radang pada portal hepar.

Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol daun salam (*Eugenia polyantha*) dosis 500 mg/kg BB mampu menurunkan nekrosis tetapi masih dalam kategori ringan. Selain itu pemberian ekstrak etanol daun salam (*Eugenia polyantha*) 250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB dan 750

mg/kg BB tidak berbeda nyata dalam menurunkan sel radang pada portal tetapi ketiga dosis ekstrak *Eugenia polyantha* tersebut masih mampu menurunkan jumlah sel radang di bandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Daftar Pustaka

- Andayani, R. Lisawati dan Maimunah. 2008. Penentuan Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolat Total dan Likopen pada Buah Tomat (*Solanum lycopersicum*). Fakultas Farmasi. Universitas Andalas. Padang.
- Jati, S.H. 2008. Efek Antioksidan Ekstrak Etanol 70 % Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) pada Hati Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Diinduksi Karbon Tetraklorida. [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Kleiner D.E. 2005. Design and vasodilatation of histologic scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313-21
- Kolaez, G.S., J Klusek, and A. Kolataj. 2007. The Effect of Exogenous GSH, GSSG and GST-E on Glutathion concentration and Activity of Selected Glutathione Enzymes in Liver, Kidney and Muscle of Mice. *Journal of Animal Science*. 2: 111-117
- Pratt, M.M. 2011. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Exposure and DNA adduct Semi-quantitation in Archived Human Tissues. *Journal environmental*. 2680: 2675-2691.
- Price, S.A. and L.M.Wilson. 2006. Patofisiologi Konsep Klinis Proses-proses Penyakit. Edisi 6. Vol 2. Penerbit Buku Kedokteran. E.G.C. Jakarta. Hal 867-868
- Ren, W., Z.Qiao, H.Wang, L.Zhu dan L. Zhang. 2003. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research Review*. 23(4): 519-534.
- Silverman, B.D. 2000. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Carcinogenesis: Structure-Activity Relationship. CRC Press, Inc. Florida. 156-166.
- Utami, W.I. 2008. Efek fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum* wight.) terhadap Penurunan Kadar Asam Urat pada Mencit putih (*Mus musculus*) Jantan Galur Balb-C yang Diinduksi dengan Kalium Oksonat [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Zhang, J. And K. Larry. 2006. Regulation with anticipated learning about environmental damages. *Journal of Environmental Economics and management*. 267: 259-279.