

EFEK EKSTRAK METANOL DAUN JERUJU, LAMUN, DAN TAURIN TERHADAP DARAH, SERTA HISTOPATOLOGI HEPAR MENCIT JANTAN YANG DIINDUKSI BENZO(α)PIREN

EFFECT OF JERUJU LEAVES AND LAMUN METHANOLIC EXTRACT ALSO TAURINE ON BLOOD AND LIVER HISTOPHATOLOGY OF MALE MICE INDUCED BY BENZO(α)PIREN

Endang Linirin Widiastuti¹, Iffa Afiqa Khairani¹, Yonathan Cristianto¹, Endang Nurcahyani¹, Nuning Nurcahyani¹, dan Heri Satria¹

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung
Jalan Prof. Dr. Soemantri Brodjonegoro No. 1 Bandar Lampung, Lampung 35145

*email: elwidi@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkaji pemberian peroral 17,5mg/35gBB ekstrak metanol daun jeruju (*Achantus ilicifolius*), 8,7mg/35gBB ekstrak metanol lamun (*Enhalus acoroides*), dan 15,6mg/35gBB taurin terhadap rerata leukosit total, limfosit, dan profil protein plasma darah serta kondisi histopatologi hepar mencit jantan (*Mus musculus*) yang dapat berubah akibat penginduksian subkutan karsinogenik benzo(α)piren 0,3mg/35gBB. Hasil penelitian menunjukkan pada kelompok yang hanya diinduksi benzo(α)piren tanpa pemberian bahan uji dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya, terdapat perbedaan yang signifikan ($p \leq 0,05$) pada rerata jumlah leukosit total mencit yaitu $25,13 \pm 4,39 \times 10^3 \text{ sel/mm}^3$, dengan persentase sel limfosit tertinggi sebesar $75,40 \pm 2,32\%$ dan skor kerusakan histopatologi hepar tertinggi sebesar $21,25 \pm 3,68$. Kelompok yang diberikan bahan uji ekstrak metanol daun jeruju, ekstrak metanol lamun dan taurin menunjukkan rerata jumlah leukosit total, rerata persentase limfosit dan skor kerusakan hepar yang mendekati kelompok normal. Hasil analisis SDS-PAGE terhadap profil protein plasma darah mencit menunjukkan perbedaan profil antar masing-masing individu. Hal ini menunjukkan bahwa setiap mencit memiliki respon fisiologi yang berbeda terhadap paparan benzo(α)piren, meskipun berada dalam kelompok perlakuan yang sama. Jenis-jenis kerusakan histopatologi hepar mencit yang ditemukan diantaranya degenerasi, nekrosis, infiltrasi sel radang, kongesti, dan infiltrasi jaringan ikat. Pemberian ketiga bahan uji terlihat menurunkan tingkat kerusakan histopatologi hepar mencit yang diinduksi benzo(α)piren.

Kata kunci: daun jeruju; lamun; taurin; darah; dan histopatologi hepar.

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the oral administration of 17.5mg/35gBW of methanolic extract of jeruju leaves (*Achantus ilicifolius*), 8.7mg/35gBW of methanolic extract of seagrass (*Enhalus acoroides*), and 15.6mg/35gBW of taurine to the mean of total leukocytes, lymphocytes, blood plasma protein

profile and liver histopathology of male mice (*Mus musculus*) due to subcutaneous induction of benzo(α)pyrene 0.3mg/35gBW. The results showed the group that was only induced by benzo(α)piren without administration of the extract has significant difference ($p \leq 0.05$) in the mean of total leukocyte $25.13 \pm 4.39 \times 10^3 \text{ sel/mm}^3$, with the highest percentage of lymphocyte cells $75.40 \pm 2.32\%$ and the highest score of liver histopathological damage 21.25 ± 3.68 . The group which was given by methanolic extract of jeruju leaves, seagrass and taurine showed a mean total leukocyte, percentage of lymphocytes and score of liver histopathological damage approached to the normal group. The results of SDS-PAGE mice's blood plasma protein profile showed different profiles among individuals. This shows that each mouse has a different physiological response of benzo(α)pyrene induction, even in the same group. The damage of liver histopathological such as degeneration, necrosis, inflammatory cell infiltration, congestion, and infiltration of connective tissue. All of extract reduced the damage of mice's liver histopathology induced by benzo(α)pyrene.

Keywords: jeruju leaves; seagrass; taurine; blood; and liver histopathology.

PENDAHULUAN

Pola hidup yang tidak sehat misalnya terpapar zat karsinogenik secara berulang kali dan aditif pada dosis tertentu, maupun paparan dosis tunggal zat karsinogen akan memicu proses terjadinya kanker (karsinogenesis) [1]. Salah satu karsinogenik yang kerap dijumpai di dalam kehidupan sehari-hari yaitu benzo(α)piren. Benzo(α)piren merupakan prokarsinogen kuat golongan PAH (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*) sebagai hasil pirolisis lemak pada daging yang dipanggang menggunakan arang dan makanan yang diasap, ditemukan pula pada asap rokok dan asap kendaraan [2]. Senyawa karsinogenik benzo(α)piren menyebabkan reaksi peroksidasi lipid pada mitokondria menciit, dimana dapat mengakibatkan kerusakan serius pada membran sel, penghambatan beberapa enzim dan fungsi seluler. Reaksi peroksidasi lipid yang terjadi pada mitokondria akan merusak struktur dan menurunkan produksi energi, sehingga mengakibatkan kematian sel [3,4]. Secara umum, karsinogenesis terjadi dalam tiga tahapan yaitu inisiasi, promosi dan progresi. Pada tahap inisiasi dan promosi sebagai proses awal karsinogenesis, senyawa karsinogenik yang masuk ke dalam tubuh akan membentuk lesi pada DNA dalam waktu beberapa menit setelah paparan karsinogenik. Selanjutnya, akan

mengakibatkan kerusakan jaringan kronis, perubahan sistem imun tubuh, perubahan susunan komposisi protein tubuh dan perubahan gambaran histologis dan biokomawi sel tubuh [5,6].

Secara teori, karsinogenesis dapat dihentikan melalui proses perbaikan sel akibat paparan zat toksik dan radikal bebas dengan berbagai zat yang mengandung antioksidan sebagai agen pencegah terjadinya kanker (kemopreventif). Penelitian mengenai bahan alami yang memiliki potensi sebagai antikanker terus dikembangkan. Salah satu potensi sumber daya alam yang dapat dieksplorasi yaitu daerah pesisir dan laut Indonesia. Golongan mangrove, jeruju (*Achantus ilicifolius* L.) dan lamun (*Enhalus acoroides* (L. f.) Royle) diketahui mengandung metabolit sekunder yang dapat berperan sebagai antioksidan dan berpotensi sebagai antikanker. Sifat antikanker juga dimiliki oleh taurin (*2-aminoethanesulfonic acid*), yaitu asam organik turunan dari asam amino sistein yang mengandung sulfur (sulfhidril) [7,8,9].

Penelitian ini dilakukan untuk melihat potensi ketiga senyawa tersebut yang diharapkan dapat dijadikan agen kemopreventif untuk mencegah terjadinya kanker khususnya pada dua fase awal karsinogenesis (inisiasi dan promosi) sebelum timbulnya jaringan kanker yang dapat bermetastasis (fase progresi), dengan melihat parameter darah dan perubahan histopatologi organ hepar mencit yang diinduksi karsinogenik benzo(α)piren.

METODE PENELITIAN

Persiapan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus – Oktober 2018 di Laboratorium Biologi Molekuler, MIPA Terpadu, FMIPA Universitas Lampung. Analisis profil protein plasma darah mencit dengan metode SDS-PAGE dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Balai Besar Penelitian Veteriner (BBLITVET) Bogor, sementara pembuatan preparat histopatologi organ hepar dilakukan di Laboratorium Patologi, Balai Veteriner Lampung.

Bahan yang digunakan antara lain, mencit jantan (*Mus musculus*) berumur ± 3 bulan dengan berat badan $\pm 30-35$ g (diperoleh dari Balai Veteriner Lampung) beserta pakan dan air minum, ekstrak metanol daun jeruju dan

lamun (metanol yang digunakan EMSURE[®] MERCK, Jerman), taurin (Now[®], US), zat karsinogenik benzo(a)piren (Sigma-Aldrich[®], Jerman), bahan-bahan SDS-PAGE (Invitrogen[™], Jerman, dan Bio-Rad, Jerman) dan bahan pembuatan preparat mikroteknik.

Alat yang digunakan antara lain, set alat pemeliharaan mencit, alat-alat gelas, alat maserasi dan ekstraksi bahan uji, *Neubauer Hemacytometer*, alat pengujian SDS-PAGE (Invitrogen[™], Jerman, dan Bio-Rad, Jerman), dan alat-alat mikroteknik.

Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL), menggunakan lima kelompok perlakuan yang berisi lima ekor mencit sebagai ulangan. K1 yaitu kelompok yang hanya diberi pakan standar hingga akhir penelitian (kontrol negatif); K2 yaitu kelompok yang diinduksi subkutan benzo(α)piren 0,3mg/35gBB (dilarutkan dalam 0,2 ml minyak jagung) selama 10 hari, selanjutnya tanpa pemberian bahan uji hingga akhir penelitian (kontrol positif); K3 yaitu kelompok yang diinduksi benzo(α)piren selama 10 hari, dilanjutkan dengan pemberian peroral ekstrak metanol daun jeruju dosis 17,5mg/35gBB selama 15 hari (hingga akhir penelitian); K4 yaitu kelompok yang diinduksi benzo(α)piren selama 10 hari, dilanjutkan dengan pemberian peroral ekstrak metanol lamun dosis 8,7mg/35gBB selama 15 hari; dan K5 yaitu kelompok yang diinduksi benzo(α)piren selama 10 hari, dilanjutkan dengan pemberian taurin dosis 15,6mg/35gBB selama 15 hari.

Perhitungan Jumlah Leukosit Mencit dan Diferensial Leukosit (jenis Limfosit)

Jumlah leukosit dihitung dengan cara mengambil 0,5 µl darah, kemudian dilarutkan pada larutan Turk dengan volume 10,5 µl (Pengenceran 20x). Setelah itu, suspensi darah diteteskan sebanyak 10 µl pada haemositometer yang telah ditutup dengan kaca penutup. Leukosit dihitung pada 4 kotak besar bagian tepi, dengan jumlah total sel dihitung dengan rumus :

$$\text{Jumlah sel per mm}^3 = \frac{N}{V} \times p$$

Keterangan : N (jumlah eritrosit ataupun leukosit pada seluruh kotak hitung); V (Volume kotak hitung yaitu 0,4 mm³); dan p (pengenceran).

Diferensial leukosit jenis limfosit dihitung dengan cara membuat preparat apusan darah terlebih dahulu yang fiksasi menggunakan metanol selama lima menit, kemudian dilakukan pewarnaan giemsa selama 30 menit dan diamati pada mikroskop perbesaran 400x dan 1000x (menggunakan minyak imersi). Selanjutnya dihitung sebanyak 100 sel dan dihitung persentase jenis limfositnya.

Pengukuran Kadar Protein Plasma Darah menggunakan microplate reader dan Pembuatan Profil Protein Plasma Darah menggunakan SDS-PAGE

Prosedur pengukuran kadar protein dan pengamatan profil protein plasma darah mencit mengacu pada prosedur di Laboratorium Parasitologi Balai Besar Penelitian Veteriner (BBLITVET) Bogor. Darah mencit disentrifugasi 13.000 rpm, 4°C selama 10 menit, kemudian diambil plasmanya (supernatan). Plasma dipipet 1 µl, diencerkan dengan NaCl fisiologis 50 µl. Selanjutnya, 10 µl plasma yang telah diencerkan dicampurkan dengan larutan *Bradford* 190 µl. Seluruh larutan standar (*Quick Start Bovine Serum Albumin Standard* Bio-Rad dengan konsentrasi bertingkat yaitu 0; 0,5; 0,75; 1; dan 1,25 dicampur dengan larutan *Bradford*) serta sampel plasma diisikan secara duplo pada *microplate* dengan volume 80 µl. Kadar protein dibaca menggunakan *microplate reader* 595 nm. Estimasi kadar protein ditentukan dengan mengisi nilai absorbansi seluruh sampel menggunakan software BioMed Proquant[®]- Estimation of Protein Concentration (*copyright* - Didik T. Subekti 2018), hingga diperoleh kadar protein masing-masing sampel. Hasil estimasi protein ini selanjutnya digunakan untuk menentukan volume sampel pada sumuran SDS-PAGE.

Sampel plasma darah yang telah diencerkan pada prosedur di atas, dipipet dengan volume menyesuaikan hasil estimasi protein (volume masing-masing sampel mewakili volume 10 µg protein). Masing-masing sampel ditambahkan *loading buffer* (BIO-RAD Laemmli Buffer Sample dan β-Mercaptoethanol 19:1) dengan perbandingan 1:1, dan dipipet ke dalam sumuran gel yang telah siap digunakan. *Marker protein* yang digunakan yaitu

Thermo Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder dengan berat molekul 10 KDa sampai dengan 260 KDa. Selanjutnya, gel dirunning dengan buffer elektroforesis pada arus 100 Volt dan dihentikan saat warna biru (*loading buffer*) telah menyentuh dasar gel. Gel diwarnai menggunakan *commasie blue* pada Ultra Rocker dengan kecepatan goyangan 40 rpm selama 30 menit. Selanjutnya, dilakukan *destainer* untuk melunturkan pewarna *commasie blue* yang melekat pada gel secara bertahap hingga pita-pita protein terlihat dengan jelas. Pita protein yang telah terlihat, diamati dan dihitung nilai Rf dengan membuat perbandingan antara jarak total migrasi protein dan jarak pita protein dari sumuran. Berat molekul pita protein dihitung menggunakan BioMed MW Converter®- Molecular Weight Conversion Tool (*copyright* - Didik T. Subekti 2018).

Pembuatan Preparat Histopatologi Hepar Mencit dan Skoring Kerusakan Hepar

Prosedur pembuatan preparat histopatologi terdiri dari beberapa tahapan yaitu tahap fiksasi, tahap dehidrasi, tahap *embedding*, tahap *cutting*, tahap *staining* (dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin*) dan tahap *mounting*. Skoring kerusakan hepar mengacu dan memodifikasi prosedur di Laboratorium Parasitologi Balai Besar Penelitian Veteriner (BBLITVET) Bogor. Skoring hepar merupakan akumulasi dari skor dua bagian, yaitu skoring sel hepatosit dan skoring bagian pembuluh hepar pada seluruh lapang pandang preparat.

Kriteria kerusakan didasarkan pada keterjadian jenis kerusakan. Skor pada sel hepatosit yaitu, normal (0); degenerasi (1); nekrosis (2); dan infiltrasi sel radang (3) dengan faktor pengali berupa luas wilayah kerusakan dimana kerusakan fokal (1); kerusakan regional (2); dan kerusakan difus (3). Sementara skor kerusakan bagian pembuluh hepar yaitu, normal (0); dilatasi (1); kongesti (2); infiltrasi sel radang (3); dan infiltrasi jaringan ikat (4) dengan faktor pengali berupa jumlah pembuluh yang terdeteksi mengalami kerusakan.

Analisis Data

Data rerata jumlah leukosit, persentase limfosit, dan skoring kerusakan hepar dinyatakan sebagai rata-rata \pm SEM. Data rerata jumlah leukosit, dan persentase limfosit dianalisis dengan metode *Analysis of Variance* dan uji lanjut Beda Nyata Terkecil dengan tingkat kepercayaan 95%, sementara skoring kerusakan hepar dianalisis dengan metode *Kruskal-Wallis* dan uji lanjut *Wilcoxon-Mann-Whitney* dengan tingkat kepercayaan 95%,

HASIL DAN DISKUSI

Tabel 1 menunjukkan rerata jumlah sel leukosit dan persentase limfosit mencit, dimana terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p \leq 0,05$). Berdasarkan hasil uji lanjut, K2 memiliki jumlah leukosit tertinggi yaitu $25,13 \pm 4,39$ ribu sel/mm³, dan berbeda nyata terhadap kelompok K1, K3, K4, dan K5. Sejalan dengan hal ini, pada Tabel 1 juga terlihat bahwa K2 memiliki persentase jumlah limfosit tertinggi yaitu $75,40 \pm 2,32\%$, dibandingkan kelompok lainnya.

Berdasarkan hasil SDS-PAGE profil protein plasma darah mencit yang tertera pada Gambar 1, secara umum terlihat adanya 17 pita protein dengan berat molekul masing-masing 206 kDa, 155 kDa, 128 kDa, 101 kDa, 84 kDa, 66 kDa, 54 kDa, 50 kDa, 45 kDa, 42 kDa, 37 kDa, 34 kDa, 31 kDa, 30 kDa, 26 kDa, 15 kDa, dan 13 kDa. Dari ke-17 pita tersebut, hanya terlihat 5 pita protein yang konsisten muncul dengan ketebalan yang relatif sama pada seluruh kelompok perlakuan (pita 206 kDa, 155 kDa, 84 kDa, 66 kDa, dan 26 kDa). Pita protein dengan molekul berkisar 66 kDa terlihat paling tebal dan konsisten muncul pada setiap profil (Gambar 1). Pita protein ini diduga albumin yang merupakan protein dengan jumlah terbanyak pada plasma darah (sekitar 55-60%) dengan berat molekul berkisar 60–69 kDa [10,11], sementara untuk menduga jenis protein pada pita-pita yang lain, masih harus dilakukan pengujian lanjut.

Terdapat 12 pita protein yang menunjukkan perbedaan ekspresi dan ketebalan antar masing-masing individu mencit dalam setiap kelompok perlakuan. Ketebalan pita protein hasil SDS-PAGE menggambarkan tinggi

rendahnya konsentrasi protein yang terdapat di dalam sampel uji [12]. Perbedaan kemunculan dan ketebalan pita protein plasma darah antar masing-masing mencit diduga sebagai gambaran beragam respon fisiologi yang dihasilkan oleh masing-masing individu terhadap penginduksian benzo(α)piren, meskipun berada dalam satu kelompok perlakuan yang sama. Perbedaan respon yang ditunjukkan mencit terhadap zat yang digunakan sebagai penginduksi, diduga karena adanya perbedaan bentuk adaptasi yang dipengaruhi faktor genetik dan respon fisiologis setiap individu terhadap masuknya bahan induksi ke dalam tubuh [13].

Selanjutnya, pada Tabel 2 tertera hasil skoring kerusakan hepar, dimana terdapat perbedaan yang nyata pada skor kerusakan hepar K2 (dengan nilai tertinggi) yaitu $21,25 \pm 3,68$, dibandingkan dengan K1 dan K4. Skor kerusakan histopatologi hepar ini memvisualisasikan kerusakan yang terjadi pada seluruh lapang pandang preparat histopatologi hepar mencit. Jenis-jenis kerusakan hepar yang ditemukan dalam penelitian ini (Gambar 2 dan Gambar 3) dibagi kedalam dua katagori yaitu kerusakan di sekitar sel hepatosit dan kerusakan di sekitar pembuluh (*portal area*). Kerusakan yang terlihat diantaranya degenerasi dan nekrosis pada hepatosit, infiltrasi sel radang disekitar hepatosit, kongesti (bendung darah), dilatasi (pelebaran) pembuluh dan infiltrasi jaringan ikat disekitar *portal area*.

Dalam penelitian ini penginduksian benzo(α)piren terlihat peningkatan rerata jumlah total leukosit dan persentase limfosit mencit (Tabel 1) sejalan dengan penelitian sebelumnya [14,15,16,17], serta mengakibatkan terjadinya kerusakan pada histopatologi hepar mencit (Tabel 2, Gambar 2 dan Gambar 3) yang juga sejalan dengan penelitian sebelumnya (Agata, Hervidea). Namun, penginduksian benzo(α)piren belum dapat menunjukkan pengaruh terhadap profil protein plasma darah mencit (Gambar 1).

Peningkatan jumlah leukosit total dapat menggambarkan adanya bentuk respon humoral dan seluler tubuh dalam mengatasi zat asing (zat asing dalam penelitian ini yaitu karsinogenik benzo(α)piren) [18]. Penginduksian karsinogenik dapat meningkatkan jumlah limfosit pada tikus karena karsinogenik dapat mempengaruhi limfosit untuk memproduksi sel T lebih banyak, dimana sel

Limfosit T sitotoksik merupakan salah satu efektor paling penting dari mekanisme imunitas anti tumor [19,20].

Benzo(a)piren menunjukkan efek toksisitas terhadap organ hepar mencit, dimana hepar merupakan organ yang rentan terhadap berbagai gangguan metabolik seperti zat toksik, dengan beragam respon yang terbatas terhadap cedera [21].

Hepar mencit kelompok normal terlihat pada Gambar 2(K1) dan Gambar 3(K1), struktur hepatosit normal yaitu terdapat vena sentralis di bagian tengah, sinusoid, dan sel-sel hepatosit tersusun *radiete* (menyebar) menuju ke arah perifer. Selanjutnya, *portal area* hepar normal tersusun atas jaringan ikat, terdiri dari pembuluh vena porta hepatica, arteri hepatica, saluran empedu, dan pembuluh getah bening [22].

Pada Gambar 2(K2) terlihat bahwa susunan hepatosit sudah mulai berubah dengan batas antar sel yang sulit dibedakan. Sel-sel hepatosit khususnya pada bagian perifer hepar terlihat cukup banyak yang mengalami degenerasi dan nekrosis. Degenerasi yang bersifat subletal dan *reversible* merupakan bentuk awal kerusakan sel hepatosit akibat gangguan toksik sehingga menimbulkan pembengkakan atau edematosa yang dapat berdampak pada penyempitan lumen sinusoid [23,24]. Sedangkan kematian sel hepar, dalam hal ini nekrosis yang bersifat letal dan *irreversible* terjadi akibat adanya gangguan yang signifikan terhadap organ hepar sehingga menyebabkan destruksi hepatosit [21].

Degenerasi terjadi akibat adanya gangguan metabolisme berupa peningkatan permeabilitas pada membran sel, sehingga dapat menyebabkan akumulasi air (disebut degenerasi hidropik) maupun akumulasi lemak (disebut degenerasi melemap) yang membentuk vakuola-vakuola intrasitoplasmik pada hepatosit [25]. Kedua jenis degenerasi ini dapat dibedakan dengan jelas melalui pewarnaan histologi Oil Red O (ORO) yang dapat mewarnai vakuola intrasitoplasmik yang berisi lemak, sementara vakuola yang berisi air akan tetap bening/putih tidak berwarna. Namun, dalam penelitian ini tidak dilakukan pewarnaan ORO melainkan menggunakan pewarnaan H&E, sehingga belum dapat mengidentifikasi jenis degenerasi yang terjadi.

Paparan zat toksik yang bersifat radikal bebas dapat menginisiasi terbentuknya reaksi peroksidasi lipid yang mengakibatkan kerusakan serius pada membran sel, penghambatan beberapa enzim dan fungsi seluler. Senyawa karsinogenik benzo(α)piren menyebabkan reaksi peroksidasi lipid pada mitokondria mencit yang dapat berakibat pada rusaknya struktur dan penurunan produksi energi, sehingga mengakibatkan kematian sel [26,3,4].

Pada akhir fase inisiasi dalam proses karsinogenesis belum terlihat perubahan histologis yang berarti dan perubahan biokimiawi, hanya terlihat nekrosis sel dengan meningkatnya proliferasi sel [6]. Berbeda dengan apoptosis, sel yang mengalami nekrosis akan melepaskan berbagai mediator yang akan memulai proses inflamasi dan menarik datangnya sel-sel radang berupa maka makrofag yang melakukan fagositosis pada sel-sel yang mati [21,23]. Hal ini sesuai dengan hasil histopatologi yang menunjukkan adanya sel-sel radang pada kelompok mencit yang diinduksi benzo(α)piren, Gambar 2(K2)*,(K3),(K4), dan(K5).

Selanjutnya, Gambar 2(K2)* menunjukkan adanya kongesti (bendung darah) pada histopatologi K2. Kongesti terjadi akibat dilatasi kapiler pada lokasi jejas yang melebar dan membendung aliran darah. Dalam hal ini, penginduksian benzo(α)piren dapat menyebabkan kongesti atau bendung darah yang terlihat pada histopatologi hepar mencit [27,28].

Pada Gambar 3(K2),(K3), dan (K5) terlihat adanya infiltrasi jaringan ikat yang ditunjuk oleh huruf g, pada sepanjang *portal area* hepar disela-sela pembuluh. *Portal area* pada hepar tersusun atas stuktur pembuluh dikelilingi oleh jaringan ikat fibrosa dalam jumlah sedikit yang seolah menjadi plat pembatas. Terjadinya cedera berulang, peradangan atau inflamasi dan paparan zat toksik pada hepar dapat membentuk jaringan ikat baru yang berawal di sekitar *portal area* (melampaui jaringan ikat yang telah ada sebelumnya), daerah vena sentralis dan sinusoid [29]. Dalam penelitian ini, munculnya jaringan ikat yang disertai dengan dilatasi pembuluh kemungkinan sebagai suatu bentuk respon fisiologis hepar yang terpapar zat toksik. Secara fisiologis munculnya jaringan ikat ini merupakan bagian dari suatu proses kerusakan dan proses penyembuhan pada sel hepatosit. Apabila paparan dihentikan, hepar

dapat melakukan perbaikan dan regenerasi sehingga jaringan ikat tersebut dapat menghilang dan organ dapat kembali pada keadaan normal. Dalam mempercepat proses perbaikan sel yang mengalami kerusakan akibat paparan radikal bebas dan zat toksik, tubuh membutuhkan perlawanan dalam bentuk antioksidan. Antioksidan alami yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak metanol daun jeruju, ekstrak metanol lamun dan taurin.

Pemberian ekstrak metanol daun jeruju (K3), ekstrak metanol lamun (K4) dan taurin (K5) pada mencit menunjukkan adanya penurunan jumlah leukosit dan penurunan persentase limfosit dibandingkan K2 (Tabel 1), serta penurunan skor kerusakan hepar (Tabel 2) yang tervisualisasi dalam preparat histopatologi (Gambar 2 dan Gambar 3). Hasil ini didukung oleh beberapa penelitian bahwa tumbuhan *A. ilicifolius* L. mengandung senyawa metabolit saponin, tanin, cardiac glikosida, terpenoid, flavanoids, anthraquionon dan alkaloid [30]. Senyawa metabolit pada tumbuhan memiliki potensi sebagai antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas dan mencegah kerusakan seluler.

Jeruju (*A. ilicifolius*) menunjukkan efek kemopreventif yang dapat secara signifikan menekan jumlah leukosit yang meningkat diakibatkan karsinoma hepatoseluler, dan mampu menekan jumlah total leukosit dan limfosit mencit yang mengalami kanker paru akibat penginduksian benzo(a)piren [31,32]. Ekstrak *A. ilicifolius* telah dibuktikan memiliki efek antioksidan dan hepatoprotektif yang dapat memperbaiki kerusakan hepar, memperbaiki lesi pada jaringan hati pada tikus yang ditransplantasikan sel karsinoma EAC dan memulihkan histopatologi hepar pada mencit yang diinduksi karsinoma hepatoseluler [33,34,35].

Selanjutnya, ekstrak lamun jenis *E. acoroides* diketahui mengandung senyawa bioaktif dari jenis flavonoid, alkaloid, dan steroid, yang berpotensi sebagai antioksidan. Kandungan total fenol dalam ekstrak metanol *E. acoroides* memiliki aktivitas tinggi dalam membersihkan radikal bebas, yang diyakini dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh dengan menunjukkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Kadar total antioksidan yang telah terdeteksi pada lamun setara dengan 1 gram asam askorbat, dimana tanaman ini dapat

digunakan untuk mencegah berbagai penyakit degeneratif akibat stres oksidatif [36,37,38,39].

Kelompok mencit yang diberikan bahan uji taurin (K5) menunjukkan rerata jumlah leukosit yang paling mendekati kelompok normal (K1), dibandingkan K3 dan K4 (Tabel 1). Selajannya dengan hasil penelitian ini, bahwa pemberian peroral taurin tunggal maupun kombinasi ekstrak makroalga yang diujikan pada mencit jantan yang diinduksi benzo(α)piren, terlihat mampu mengembalikan jumlah leukosit mencit mendekati jumlah pada kelompok normal [14,15,16]. Disamping itu, hasil histopatologi K5 (Gambar 2 dan Gambar 3) sejalan dengan beberapa penelitian serupa bahwa senyawa taurin tunggal maupun kombinasi taurin dengan ekstrak makroalga (*Sargassum* sp. dan *Gracillaria* sp.) berpengaruh protektif dan terapeutik dalam memperbaiki struktur kerusakan histopatologi hepar mencit yang diinduksi zat karsinogenik benzo(α)piren [28,16]. Taurin memiliki kemampuan dalam restorasi sel hati yang mengalami kerusakan dan menurunkan stress oksidatif. Taurin telah dianggap sebagai agen hepatoprotektif yang dapat mengurangi terjadinya peroksidasi lipid, steatosis pada hati, dan efek pengobatan dan perlindungan terhadap nekrosis hati [40].

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak metanol daun jeruju, ekstrak metanol lamun dan taurin terlihat mampu menurunkan peningkatan rerata jumlah total leukosit dan persentase limfosit mencit, serta menurunkan tingkat kerusakan pada histopatologi hepar mencit yang diinduksi benzo(α)piren. Namun, pemberian keseluruhan bahan uji belum dapat menunjukkan pengaruh terhadap profil protein plasma darah mencit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Kemenristekdikti telah mendanai penelitian ini melalui skema Tim Pascasarjana tahun anggaran 2017-2018, dimana penelitian ini merupakan bagian dari penelitian dengan judul "Uji Efektivitas Senyawa Organik Taurine sebagai Senyawa Antikanker, Antidiabet, dan Antioksidan pada Mencit (*Mus musculus* L.) yang Diinduksi dengan Benzo(α)piren dan

Aloksan secara *In Vivo* serta Eksplorasi sumber Taurine pada Biota Laut".
Terimakasih kepada drh. Didik T. Subekti, M.Sc (Lab. Parasitologi BBLITVET Bogor) dan drh. Sulinawati (Lab. Parasitologi BVET Lampung) atas bantuan dan bimbingannya.

REFERENSI

- [1] Archer MC. Chemical carcinogenesis. In: Tannock JF, Hill RP, editors. The basic science of oncology. 2nd ed. New York: Mc Graw-Hill, Inc.;1992. p. 102-119.
- [2] Terzi G, Çelik TH, Nisbet C. Determination of benzo[a]pyrene in Turkish döner kebab samples cooked with charcoal or gas fire. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 2008;47:187–193.
- [3] Thirunavukkarasu C, Princevijeyasingh J, Selvendiran K, Sakthisekaran D. Chemopreventive efficacy of selenium against DEN-induced hepatoma in albino rats. *Cell Biochem and Funct*. 2001;19:265–271.
- [4] Selvendiran K, Senthilnathan P, Magesh V, Sakthisekaran D. Modulatory effect of Piperine on mitochondrial antioxidant system in Benzo(a)pyrene-induced experimental lung carcinogenesis. *Phytomedicine*. 2004;11(1):85-94.
- [5] Benchimol S. Viruses and cancer. In: Tannock JF, Hill RP, editors. The basic science of oncology. 2nd ed. New York: Mc Graw-Hill, Inc.; 1992. p. 88-101.
- [6] Ryser HJP. Chemical carcinogenesis. In: Kruse LC, Reese JL, Hart LK, editors. *Cancer pathophysiology, etiology and management*. 4th ed. St. Louis: The C.V. Mosby Co.; 1975. p. 47-55.
- [7] Shuo Tu, Zhang X, Luo D, Liu Z, Yang X, Wan H, Yu L, Li H, Wan F. Effect Of Taurine On The Proliferation And Apoptosis Of Human Hepatocellular Carcinoma Hepg2 Cells. *Exp Ther Med*. 2015;10(1):193–200.
- [8] Amudha P, Vanitha V, Bharathi NP, Jayalakshmi M, Mohanasundaram S. Phytochemical Analysis and Invitro Antioxidant Screening of Sea Grass-Enhalus Acoroides. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 2017;8(2):251–58.
- [9] Vijayaraj R, Kumaran NS, Swarnakala. Evaluation of Anti-Tumour Potential of *Acanthus ilicifolius* (Linn.) in HepG2 Cell Line Induced Hepatocellular Carcinoma in Mice. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2017;9(6):892-897.

- [10] Colak R, Yigit N, Colak E. SDS-PAGE Patterns of Blood Serum Proteins in some Species of the Genus *Meriones* (Mammalia: Rodentia). *Turk J Zool.* 2002;26:177-181.
- [11] Kreyling WG, Fertsch-Gapp S, Schäffler M, Johnston BD, Haber N, Pfeiffer C, Schleh JDC, Hirn S, Semmler-Behnke M, Epple M, Parak WJ. In vitro and in vivo interactions of selected nanoparticles with rodent serum proteins and their consequences in biokinetics. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2014;5:1699–1711
- [12] Gunanti M, Ulia F, Sri D. Karakterisasi protein *Larnea cyprinacea* dengan metode elektroforesis SDSPAGE. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan.* 2010;2(1):61-66.
- [13] Hadiyanti S, Harmayetty, Widyawati IY. Kadar Glukosa Darah Mencit (*Mus musculus*) Diabetes Mellitus Paska Pemberian Model Latihan Isometrik. *Critical, Medical & Surgical Nursing Journal.* 2012;1(1):12.
- [14] Marlinda H, Widiastuti EL, Susanto GN. Pengaruh Pemberian Senyawa Taurin dan Ekstrak Daun Dewa *Gynura segetum* (Lour) Merr terhadap Eritrosit dan Leukosit Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Benzo [α] Piren. *Jurnal Natur Indonesia.* 2016;17(1):13-21. [11]
- [15] Maysa A, Widiastuti EL, Busman H. Uji Senyawa Taurin Sebagai Antikanker Terhadap Jumlah Sel-Sel Leukosit Dan Sel-Sel Eritrosit Mencit (*Mus Musculus L.*) yang Diinduksi Benzo (A) Pyren Secara In Vivo. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan.* 2016;16(2):68-75.
- [16] Hervidea R, Widiastuti EL, Nurcahyani E, Sutyarso S, Susanto GN. Efek Ekstrak Metanol Makroalga Cokelat (*Sargassum sp.*), Merah (*Gracillaria sp.*) dan Taurin Terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Mencit Jantan (*Mus musculus*) yang Diinduksi Benzo(α)Piren. *Jurnal Biologi Indonesia.* 2018;14(1): 123-131
- [17] Saputri DNE, Dyah AP, Abdulgani N. Jumlah Total Dan Diferensial Leukosit Mencit (*Mus musculus*) Pada Evaluasi In Vivo Antikanker Ekstrak Spons Laut *Aaptos Suberitoides* [Undergraduate Thesis]. Surabaya: Biology ITS; 2010.
- [18] Erlinger TP. WBC Count and the Risk of Cancer Mortality in a National Sample of U.S. Adults: Results from the Second National Health and Nutrition Examination Survey Mortality Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 2004;13:1052.
- [19] Akrom, EMI. Gambaran Jumlah Dan Hitung Jenis Leukosit Serta Waktu Jendal Darah Pada Tikus Betina Yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenz(A)Antrasen (DMBA) Setelah Pemberian Ekstrak Etanol Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa L.*). *Repository Universitas Ahmad Dahlan.* 2009;2(2):69-78.

- [20] Betts JG, Desaix P, Johnson E, Johnson JE, Korol O, Kruse D, Poe B, Wise JA, Womble M, Young KA. Anatomy & Physiology Openstax College. Houston-Texas: Rice University; 2013.
- [21] Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Buku Ajar Patologi Robbins Edisi 7 Volume 2. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2007.
- [22] Eroschenko VP. diFIORE'S Atlas Of Histology With Functional Correlations. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
- [23] Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins & Cotran Pathologic Basis Of Disease. Spain: Elsevier Health Sciences; 2009.
- [24] Cheville NF. Introduction to Veterinary Pathology, 2nd Edition. Iowa State University Press: AMES; 2006.
- [25] Danciu M, Mihailovici MS, Dima A, Cucu C. Atlas of Pathology 3rd Edition. Grigore T. Romania: Popa University of Medicine and Pharmacy IASI; 2009.
- [26] Sohal R, Dubey A. Mitochondria oxidative damage, hydrogen peroxide release and aging. *Free Rad and Biol Medi.* 1994;16:621–626.
- [27] Francisco JS, Waldo L, Garcia J, Isadora L, Karin S. Histopathological and immunohistochemical characterisation of hepatic granulomas in *Leishmania donovani* infected BALB/c mice: a time-course study. *Parasites Vector J.* 2018;11(73):1–9.
- [28] Agata A, Widiastuti EL, Susanto GN. Respon Histopatologis Hepar Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Benzo (α) Piren terhadap Pemberian Taurin dan Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*). *Jurnal Natur Indonesia.* 2016;16(2):54-63.
- [29] Cardona D. Fundamental Liver Pathology Part 1 & Part 2. Duke University School Of Medicine; 2011.
- [30] Poornaa CA, Maney SK, Santhoshkumar TR, Soniya EV. Phytochemical analysis and in vitro screening for biological activities of *Acanthus ilicifolius*. *Journal of Pharmacy Research.* 2011;4(7):1977-1981.
- [31] Pranca AVC, Elias J. Diagnosis, Ageing and treatment of Hepatocellular carcinoma. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2004;37:1689-1705.
- [32] Singh CR, Kathiresan K. Anticancer efficacy of root tissue and root-callus of *Acanthus ilicifolius* L., on benzo(a)pyrene induced pulmonary carcinoma in *Mus musculus*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2013;2(6):5271-5283.

- [33] Babu BH, Sylesh BS, Padikkala J. 2001. Antioxidant and hepatoprotective effect of *Acanthus ilicifolius*. *Fitoterapia*. 2001;72:272-277.
- [34] Chakraborty T, Bhuniya D, Chatterjee M, Rahaman M, Singha D, Chatterjee BN, Datta S, Rana A, Samanta K, Srivastawa S, Maitra SK, Chatterjee M. *Acanthus ilicifolius* plant extract prevents DNA alterations in a transplantable Ehrlich ascites carcinoma-bearing murine model. *World J Gastroenterol*. 2007;13(48): 6538-6548.
- [35] Vijayaraj R, Kumaran NS, Swarnakala. Evaluation of Anti-Tumour Potential of *Acanthus ilicifolius* (Linn.) in HepG2 Cell Line Induced Hepatocellular Carcinoma in Mice. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2017;9(6):892-897.
- [36] Dewi, CSU, Soedharma D, Kawaroe M. Komponen Fitokimia dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Lamun *Enhalus Acoroides* dan *Thalassia Hemprichii* Dari Pulau Pramuka, DKI Jakarta. *Jurnal Teknologi Perikanan dan Kelautan*. 2012;3(1):23–28.
- [37] Santoso J, Anwariyah S, Rumiantin RO, Putri AP, Ukhty N, Yoshie-Stark Y. Phenol Content, Antioxidant Activity and Fibers Profile of Four Tropical Seagrasses from Indonesia. *Journal of Coastal Development*. 2012;15(2):1410–5217.
- [38] Nindatu M, Noya F, Seimahaira T, Kaya E, Wakano D, Leasa M. Potential of Lamun (*Enhalus acoroides*) Seeds from West Seram Coastal Area as Natural Antioxidant. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2016;7(2):66-71.
- [39] Kannan, R. R. R., R. Arumugam, dan P. Anantharaman. 2010. In Vitro Antioxidant Activities of Ethanol Extract from *Enhalus acoroides* (L.F.) Royle.” *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3(11): 898–901.
- [40] Balkan J, Kanbagli O, Aykac-Toker G, Uysal M. Taurine treatment reduces hepatic lipids and oxidative stress in chronically ethanol treated rats. *Biol Pharm Bull*. 2002;25:1231-1233.

TABEL

Tabel 1. Rerata jumlah sel leukosit dan persentase limfosit mencit

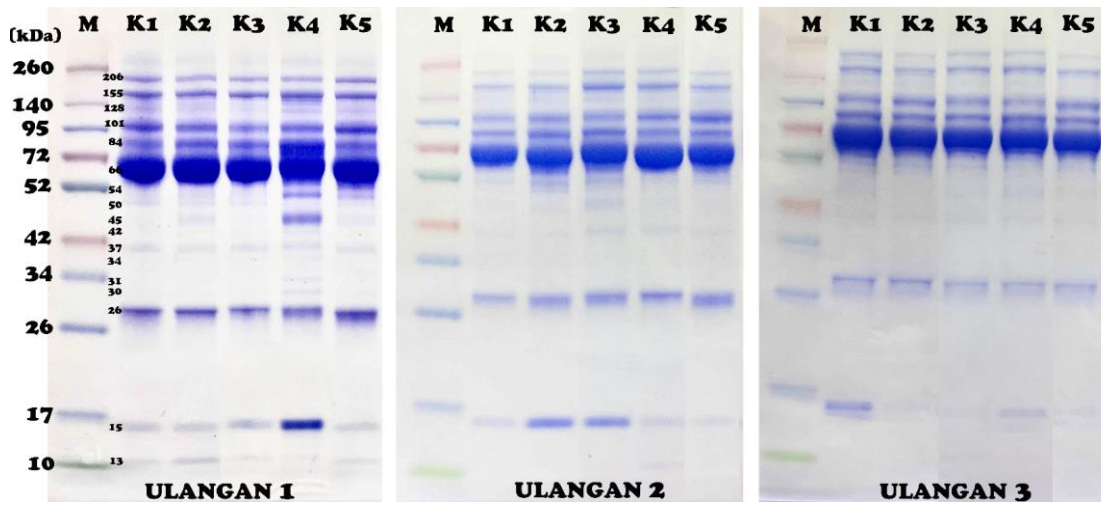
Perlakuan	Rerata Jumlah Leukosit (sel/mm ³)	Rerata Persentase Limfosit (%)
K1	7,37 ± 0,85 ^b	56,40 ± 4,27 ^{ab}
K2	25,13 ± 4,39 ^a	75,40 ± 2,32 ^a
K3	10,76 ± 0,76 ^b	45,80 ± 8,97 ^b
K4	10,54 ± 0,73 ^b	56,60 ± 4,26 ^{ab}
K5	8,33 ± 1,11 ^b	43,8 ± 12,94 ^b

Tabel 2. Rerata skor kerusakan hepar

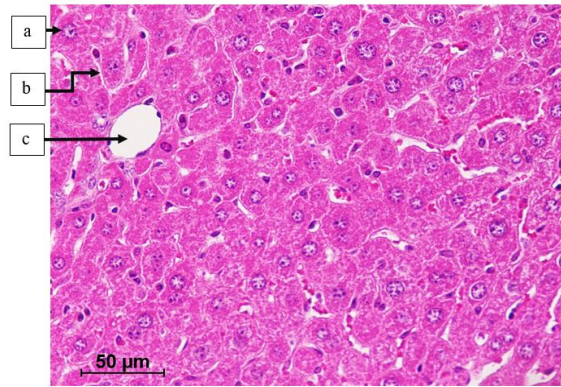
Perlakuan	Rerata Skor Kerusakan Hepar
K1	7,20 ± 0,20 ^a
K2	21,25 ± 3,68 ^c
K3	11,00 ± 1,64 ^{bc}
K4	10,60 ± 1,60 ^b
K5	12,75 ± 2,25 ^{abc}

Keterangan : *superscript* yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata pada hasil uji lanjut, dengan taraf kepercayaan 95%

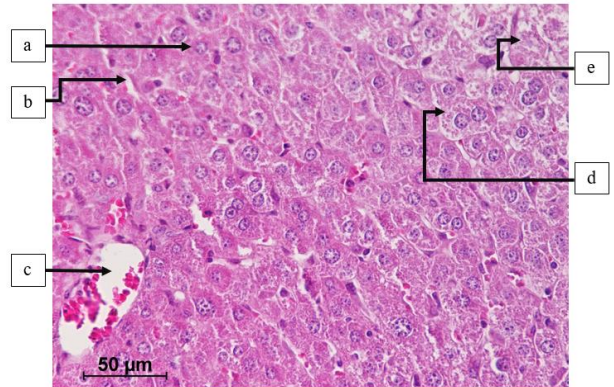
GAMBAR



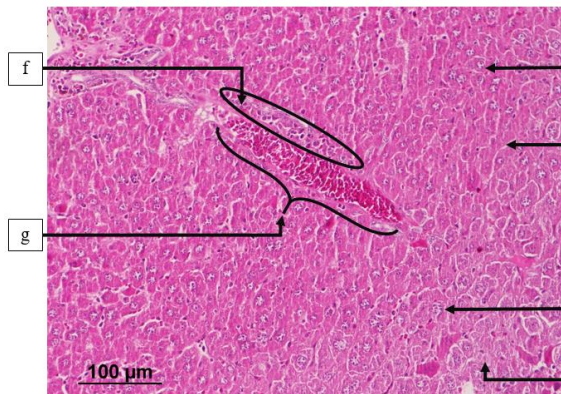
Gambar 1. Profil protein plasma darah mencit setiap kelompok perlakuan yang diwakili oleh 3 individu mencit berbeda pada setiap kelompok



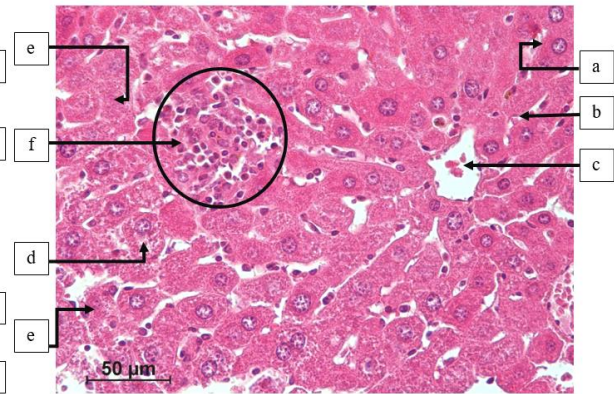
(K1) – 400X



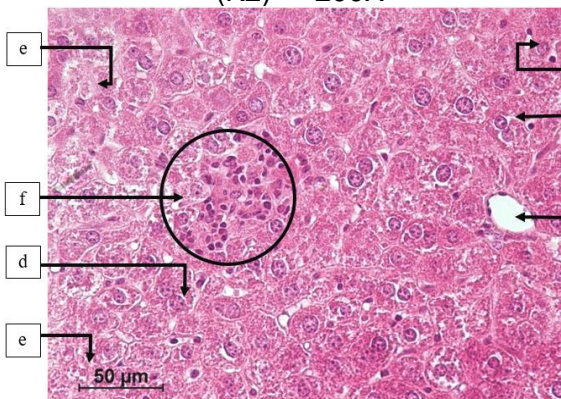
(K2) – 400X



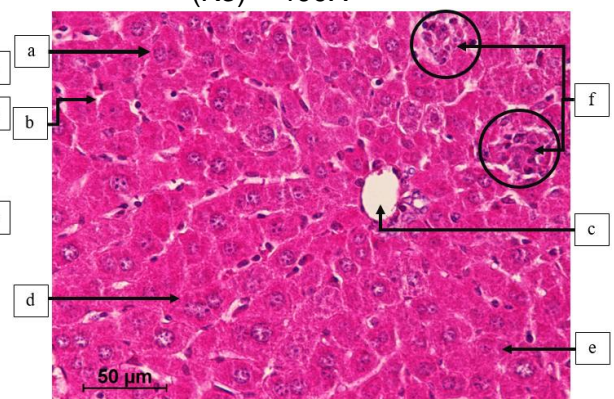
(K2)* – 200X



(K3) – 400X

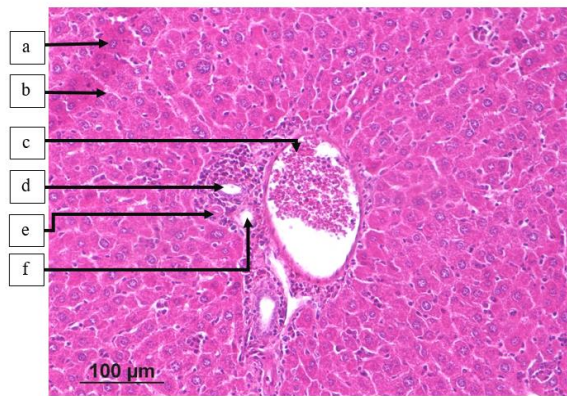


(K4) – 400X

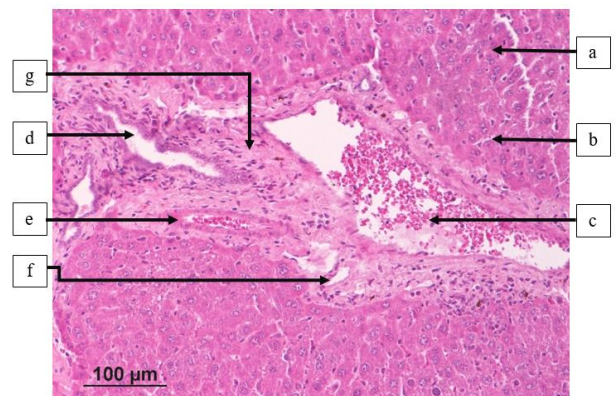


(K5) – 400X

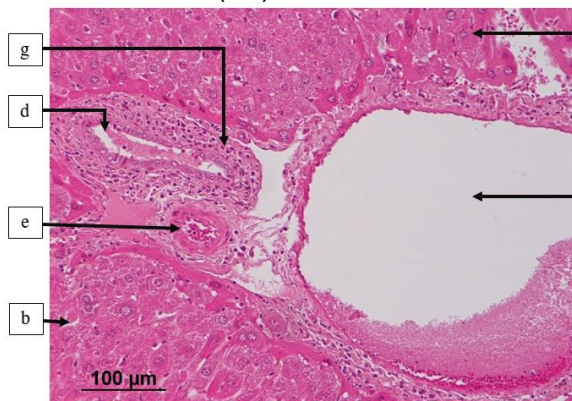
Gambar 2. Histopatologi daerah sel hepatosit hepar mencit : (a) hepatosit normal, (b) sinusoid, (c) vena sentralis, (d) hepatosit degenerasi, (e) hepatosit nekrosis, (f) infiltrasi sel radang, dan (g) kongesti.



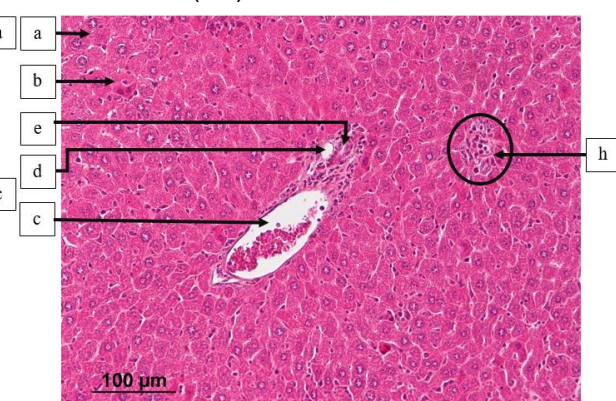
(K1) – 200X



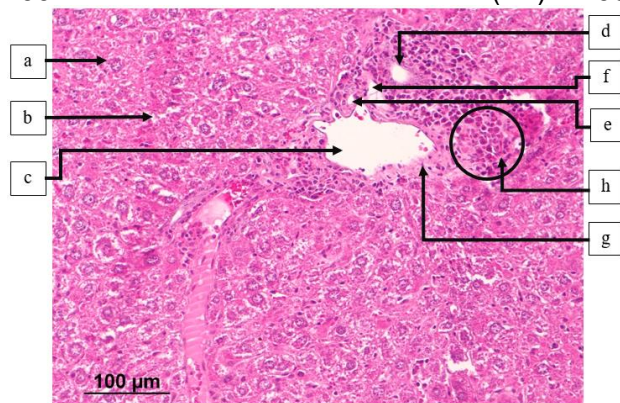
(K2) – 200X



(K3) – 200X



(K4) – 200X



(K5) – 200X

Gambar 3. Histopatologi daerah *portal area* hepar mencit : (a) hepatosit normal, (b) sinusoid, (c) vena porta hepatica, (d) saluran empedu, (e) arteri hepatica, (f) pembuluh limfatik, (g) infiltrasi jaringan ikat, dan (h) infiltrasi sel radang.