

Pengaruh Paparan Rhodamin B Dan Sakarin Terhadap Gambaran Histopatologi Duodenum dan Ekspresi Transforming Growth Factor β (Tgf- β) pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*)

Ifan Arisnadi, Chanif Mahdi, Fajar Shodiq
Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya, Malang.
Email: ifanarisnad@gmail.com

ABSTRAK

Konsumsi rhodamin B dan sakarin secara terus menerus dapat menyebabkan kanker, inflamasi dan kerusakan pada duodenum. Kejadian inflamasi akan disertai dengan adanya peningkatan level marker inflamasi salah satunya adalah TGF- β . Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh toksisitas rhodamin B dan sakarin terhadap histopatologi duodenum dan ekspresi TGF- β pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini menggunakan 4 kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif dan kelompok perlakuan yang diberikan rhodamin B dosis 22,5 mg/kgBB (P1), Sakarin 157,77 mg/kgBB (P2) dan kombinasi rhodamin B dosis 22,5 mg/kg BB ditambah sakarin dosis 157,77 mg/kgBB (P3). Pemberian rhodamin B dan sakarin dilakukan selama 30 hari secara peroral menggunakan sonde lambung. Parameter yang diamati adalah berupa gambaran histopatologi duodenum dengan pewarnaan hematoksilin eosin (HE) dan ekspresi TGF- β dengan menggunakan pewarnaan imunohistokimia. Hasil penelitian secara kualitatif menunjukkan bahwa pemberian kombinasi rhodamin B dan sakarin memiliki efek toksik paling tinggi jika dibandingkan dengan pemberian terpisah yang ditunjukkan dengan adanya kerusakan pada vili duodenum dan hemoragik. Hasil statistika dianalisa menggunakan SPSS versi 22 yaitu uji ANOVA secara kuantitatif adalah pemberian kombinasi rhodamin B dan sakarin sangat signifikan ($p < 0,01$) dapat meningkatkan area ekspresi TGF- β sebesar $51,6 \pm 1,73\%$ jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Kesimpulan dari penelitian ini bahwa rhodamin B dan sakarin jika dikombinasikan akan memiliki efek yang lebih toksik.

Kata kunci : *rhodamin B, sakarin, inflamasi, hemoragik, TGF- β*

EFFECTS RHODAMINE B AND SACCHARINE TO HISTOPATOLOGY DUODENUM AND EKSPRESSION TRANSFORMING GROWTH FACTOR β (TGF- β) IN WHITE RAT (*RATTUS NORVEGICUS*)

ABSTRACT

Rhodamine B and saccharine consumption continuously can cause inflammation, cancer and duodenum damage. Inflammatory event accompanied by an increase of the presence level enhancement, this one is TGF- β . This research was conducted to find out of Rhodamine B toxicity and saccharine effect from duodenum histopatology and TGF- β expression in white rat (*Rattus norvegicus*). This research use 4 group treatment is negative control and group treatment to give to rhodamine B dosage 22,5 mg/kgBB (P1), Saccharine 157,77 mg/kgBB (P2) and combination of rhodamine B dosage 22,5 mg/kg BB added saccharine dosage 157,77 mg/kgBB (P3). Rhodamine B dan saccharine has gived during 30 days in peroral use gastric probe. Observed parameter is picture of duodenum histopatology use haematoxylin eosin (HE) coloured and TGF- β expression use Immunohistochemistry. Research result qualitatively is indicated that combined with give Rhodamine B and saccharine have very high toxic effect if compared with separate showed villi duodenum damaged and hemorrhage. Statistics result has analyzed use SPSS version of 22 is ANOVA test in quantitatively is giving combination of rhodamine B and saccharine highly significantly ($p < 0,01$) can enhancement of TGF- β area expression about $51,6 \pm 1,73\%$ if compared with negative control group. Conclusion of this research that rhodamine B and saccharine if combined have very toxic effects.

Keywords : *rhodamine B, saccharine, inflammation, hemorrhage, TGF- β*

PENDAHULUAN

Penggunaan bahan tambahan makanan secara tidak tepat dapat menimbulkan keracunan atau toksisitas. Contohnya pemanis buatan yaitu sakarin sedangkan pewarna larang yang sering digunakan sebagai pewarna makanan adalah rhodamin B (Judarwanto, 2004). Dampak yang ditimbulkan karena

mengonsumsi sakarin secara berlebihan adalah mual, diare, muntah, dan dapat menyebabkan kanker (Whitehouse *et al.*, 2008). Dampak mengonsumsi rhodamin B secara terus menerus dapat menyebabkan terjadinya iritasi pada mukosa saluran pencernaan yaitu duodenum (Yulianti, 2007). Rhodamin B memiliki struktur kimia Poliaromatik Hidrokarbon (PAH) yang

akan menimbulkan efek radikal bebas yang sangat reaktif. (Hansen *et al.*, 1959). Tingginya radikal bebas yang ada di dalam saluran pencernaan dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif dan akan berikatan dengan membran sel duodenum yang mengandung *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA), sehingga akan menimbulkan peroksidasi lipid (Droge, 2002). Peroksidasi lipid dapat menyebabkan masuknya berbagai macam radikal bebas ke dalam jaringan duodenum. Radikal bebas yang masuk ke dalam jaringan dapat mengaktifasi jalur sinyal *NF-k β* (*Nuclear Factor kappa β*). *NF-k β* dapat mengekspresikan sitokin yang berperan dalam proses inflamasi seperti *TGF- β* , *TNF- α* , *IL-1 β* dan *iNOS* (Hancock, 2005). Enzim *iNOS* akan menghasilkan nitrit oksida dan akan berikatan dengan anion superoksida sehingga akan menimbulkan kerusakan dan inflamasi pada jaringan duodenum. *TGF- β* merupakan immunosupresor utama yang berhubungan dengan peradangan, kanker dan autoimun (Rifaii, 2009).

MATERI DAB METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Metode penelitian ini merupakan eksperimental dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) yaitu hewan coba dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biosains, Universitas Brawijaya, Malang. Bahan-bahan yang digunakan adalah tikus putih wistar jantan, sakarin, rhodamin B, aquades steril, PBS, ethanol 70%, 80%, dan 90%, xylol 70%, 70%, 100%, paraffin, pewarna hematoksilin eosin, SA-HRP, TGF-Beta poliklonal, anti TGF-Beta universal, hidrogen peroksida, entellen, substrat DAB, alkohol absolute, dan normal saline formalin 10%.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bak pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat beda minor, gelas objek, pipet tetes, gelas ukur 100ml, pengaduk kaca, tabung reaksi, rak tabung reaksi, sonde lambung, microtube, mikropipet, pot organ, tissue cassette, alat sentrifugasi, incubator, lemari pendingin, mikroskop Olympus BX51, mesin vakum, tisu, glove, masker, timbangan digital, kertas label, waterbath, microtum.

Prosedur Kerja

Perlakuan Hewan coba

Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar yang diperoleh dari Laboratorium Biosains, Universitas Brawijaya, Malang dengan umur 8-12 minggu dan berat badan antara 150-200 gram serta telah mendapatkan sertifikat layak etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No. 795-KEP-UB.

Induksi Rhodamin B dan Sakarin

Perhitungan dosis rhodamin B dan sakarin dosis rhodamin B yang diberikan pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok P1 mengacu pada penelitian terdahulu tentang uji toksisitas rhodamin B yaitu penelitian Siswati (2000), yang menggunakan dosis 150 ppm, 300 ppm, dan 600 ppm. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa, pemberian dosis terendah, yaitu 150 ppm dapat menimbulkan kerusakan hepar yang ditunjukkan dengan perubahan bentuk dan susunan sel. Sehingga, kelompok P1 dalam penelitian ini menggunakan dosis terendah 150 ppm. Dosis tersebut dikonversikan ke dalam berat badan tikus putih (*Rattus norvegicus*) menjadi 22,5 mg/kgBB. Dosis tersebut dilarutkan dalam 1 ml akuades dan diberikan pada masing-masing tikus putih dalam kelompok P1.

Dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu pada tikus putih wistar jantan, tikus dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif (**K-**), kelompok perlakuan rhodamin B dosis 22,5 mg/KgBB (**P1**), kelompok perlakuan (**P2**) sakarin dosis 157,77 mg/KgBB dan kelompok perlakuan kombinasi rhodamin B dengan sakarin (**P3**). Induksi dilakukan dengan menggunakan sonde lambung.

Uji Konfirmasi Kandungan Rhodamin B

Larutan yang telah dibuat selanjutnya diuji menggunakan kit CMR (Colour Main Reagent) untuk mengkonfirmasi kandungan rhodamin B dalam larutan tersebut. Uji tersebut bertujuan untuk memastikan bahwa larutan yang akan diberikan pada masing-masing kelompok tikus benar mengandung rhodamin B. Uji konfirmasi ini dilakukan dengan cara memasukkan 1 ml larutan dalam tabung reaksi, ditambahkan 3-5 tetes amonia dan ditambahkan petroleum (bensin) sebanyak 3-5 ml, kemudian dikocok selama 3-5 menit, lalu dibiarkan hingga terjadi pemisahan larutan. Tuangkan larutan tersebut dalam tabung reaksi lain dan ditambahkan larutan kit uji zat warna CMR sebanyak 2-3 ml. Selanjutnya ditunggu selama 1 menit dan diamati hingga timbul warna pada bagian bawah tabung reaksi (fraksi air), kemudian warna yang timbul dibandingkan dengan warna standar sehingga diketahui kandungan rhodamin B (Mahdi, 2013).

Pembedahan Tikus Putih

Dilakukan dislokasi os cervicalis, kemudian tikus putih diposisikan rebah dorsal pada papan bedah. Pembedahan dilakukan mulai dari bagian abdomen hingga thorax. Dilakukan pengambilan organ hepar dan dimasukkan ke dalam pot organ yang telah berisi paraformaldehid (PFA) 4%.

Pengamatan Histologi dan Pewarnaan Imunohistokimia (IHK)

Pengamatan Ekspresi TGF- β Duodenum

Organ hepar dibuat preparat imunohistokimia melalui proses fiksasi, dehidrasi, clearing, embedding,

blocking, dan pembedahan organ. Preparat hepar direndam dalam xylol I, xylol II, alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 100%), dan aquades masing-masing 5 menit kemudian preparat dicuci dengan PBS selama 3x5 menit. Preparat ditetesi 3% H₂O₂ selama 20 menit. Dicuci kembali menggunakan PBS selama 3x5 menit dan diblok menggunakan Fetal Bovine Serum (FBS) 5% dalam PBS selama 30 menit pada suhu ruang. Preparat dicuci dengan PBS selama 3x5 menit. Setelah itu direaksikan dengan antibodi primer (TGF- β Poliklonal) dengan perbandingan (1:1000), dibiarkan selama 24 jam pada suhu 4°C dan dilakukan pencucian kembali pada preparat menggunakan PBS selama 3x5 menit. Preparat direaksikan kembali menggunakan antibodi sekunder berlabel biotin (Anti TGF- β universal) selama 1 jam dan dicuci kembali dengan PBS selama 3x5 menit. Selanjutnya ditetaskan SA-HRP (Strep Avidin Horse Radis Peroxidase) selama 30-60 menit. Preparat dicuci kembali menggunakan PBS selama 3x5 menit. Substrat DAB (Diaminobenzine tetrahydrochloride) ditambahkan pada preparat dan diinkubasi selama 10-20 menit lalu dicuci menggunakan PBS selama 3x5 menit. Selanjutnya dilakukan pewarnaan menggunakan hematoxylen selama 5 menit dan dicuci dengan air mengalir. Preparat dibilas dengan akuades, dilakukan pengeringan, dan dilakukan mounting dengan entellan kemudian ditutup cover glass. Preparat jaringan hepar selanjutnya diamati menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX51 dengan perbesaran 400X dan 1000X dan dilakukan dokumentasi saat pengamatan pada 5 lapang pandang. Hasil positif berupa titik-titik berwarna coklat. Selanjutnya penghitungan rata-rata persentase area ekspresi TGF- β dianalisa menggunakan immunoratio.

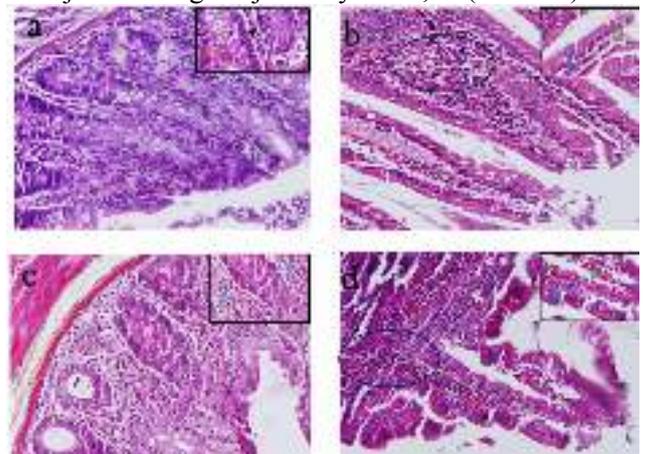
Analisa Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan analisa kualitatif deskriptif untuk mengetahui perubahan gambaran histopatologi duodenum dan kuantitatif untuk mengetahui rata-rata persentase area ekspresi TGF- β dengan menggunakan program SPSS tipe 22 untuk uji *Analysis Of Varians* (ANOVA) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan yang dilanjutkan dengan uji BNP $\alpha = 1\%$ untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekspresi TNF- α ditunjukkan dengan warna coklat pada hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) menggunakan antibodi TNF- α pada metode imunohistokimia (IHK) (Gambar 1). Warna coklat yang dihasilkan merupakan hasil reaksi antara Streptavidin-Horse Radish Peroxidase (SA-HRP) yang berikatan dengan antibodi sekunder dengan kromogen Diaminobenzidine (DAB) (Duerr, 2006). Warna kecokelatan selanjutnya dihitung persentasenya

menggunakan Immunoratio dengan melakukan rata-rata lima lapang pandang presentase ekspresi TNF- α hepar dengan perbesaran 400X. Data hasil uji Immunoratio selanjutnya dianalisa menggunakan perhitungan statistika. Analisa statistika menggunakan One Way ANOVA dengan aplikasi SPSS for Windows 22 dan dilanjutkan dengan uji Tukey $\alpha = 0,01$ (Tabel 1).



Gambar 5.1 Histopatologi Duodenum Tikus Putih Jantan Perbesaran 400x dengan Menggunakan Pewarnaan Hematoksilin-Eosin.

Keterangan: a = kelompok kontrol negatif, b= rhodamin B, c= sakarin dan d=kombinasi rhodamin B dengan sakarin. (\uparrow) hemoragik, (\uparrow) kerusakan pada vili, epitel normal (\uparrow), inflamasi (\circ) dan vili sehat (\blacktriangle).

Tabel 5.1 Perubahan Gambaran Histopatologi Duodenum pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*).

Perlakuan	Hemoragik per reksis	Kerusakan vili	Inflamasi
Kontrol negatif (K-)	-	-	-
Rhodamin B dosis 22,5 mg/KgBB (P1)	✓	✓	✓
Sakarin dosis 157,77 mg/KgBB (P2)	✓	-	-
Kombinasi Rhodamin B dosis 22,5 mg/KgBB dengan Sakarin dosis 157,77 mg/KgBB (P3)	✓	✓	✓

Keterangan:

- : tidak ada perubahan
- ✓ : ada perubahan

Hasil pemeriksaan secara mikroskopis gambaran histopatologi duodenum pada kontrol negatif (**K-**) hasilnya adalah keadaan duodenum normal dan tidak ditemukan adanya kerusakan. Hal ini ditandai dengan keadaan epitel pada duodenum berbentuk simpel kolumnar, vili tidak mengalami kerusakan, terlihat adanya kelenjar brunner dengan jelas. Menurut Genesser (1994), epitel duodenum berbentuk kolumnar selapis yang terdiri dari sel endokrin, sel peaneth, sel goblet, dan sel absortif.

Pada kelompok perlakuan 1 (**P1**) yang diinduksi dengan rhodamin B dosis 22,5 mg/KgBB pada organ duodenum terlihat adanya perubahan gambaran histopatologi duodenum yaitu hemoragik dan kerusakan vili duodenum. Menurut Kusmayandi dan Sukandar (2009), rhodamin B memiliki senyawa alkilating ($\text{CH}_3\text{-CH}_3$) dan memiliki bentuk struktur kimia Poliaromatik Hidrokarbon (PAH). PAH merupakan senyawa sangat radikal dan menjadi metabolit yang reaktif ketika diaktivasi dengan enzim sitokrom P-450 yang akan menyebabkan peroksidasi lipid dan dapat merusak membran mukosa duodenum. Menurut Depkes (1992), rhodamin B mengandung senyawa klorin (CL) yang merupakan senyawa anorganik yang sangat reaktif dan berbahaya. Senyawa ini dapat mengikat senyawa lain di dalam tubuh dan akan bersifat toksik bagi tubuh.

Pada kelompok perlakuan 2 (**P2**) yang merupakan kelompok tikus yang di induksi sakarin dosis 157,77 mg/KgBB menunjukkan adanya hemoragik pada vili duodenum. Menurut Santosa (2005), sakarin mampu membentuk radikal bebas di dalam tubuh yang akan memicu peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid akan mempengaruhi lemak tak jenuh pada dinding sel epitel melalui proses stres oksidatif dan akan mengganggu permeabilitas dinding sel sehingga terjadi kerusakan sel. Menurut Smith and Jones (1961), kerobekan pada dinding vaskuler dapat menyebabkan darah akan keluar dari vaskuler dan terjadi hemoragik per reksis yang ditandai dengan warna kemerah-merahan.

Menurut BPOM RI (2004), sakarin dapat menimbulkan gangguan bagi kesehatan yaitu iritasi pada saluran pencernaan, diare, dan asma.

Hasil pengamatan gambaran histopatologi duodenum pada kelompok perlakuan 3 (**P3**) merupakan kelompok tikus yang diinduksi menggunakan kombinasi antara rhodamin B dosis 22,5 mg/KgBB ditambah dengan sakarin dosis 157,77 mg/KgBB. Hasil pengamatan menunjukkan terjadinya peningkatan kerusakan duodenum lebih parah dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 (**P1**) dan (**P2**) yang ditandai dengan adanya kerusakan vili dan hemoragik yang parah pada duodenum. Menurut Kuroda *et al.*, (2006), kerusakan pada intestine disebabkan karena terjadinya peningkatan permeabilitas mukosa, kerusakan mikrovaskuler, deposisi fibrin dan infiltrasi netrofil

serta adanya produksi berlebih dari NO (*Nitric Oxide*) yang dihasilkan dari induksi rhodamin B dan sakarin.

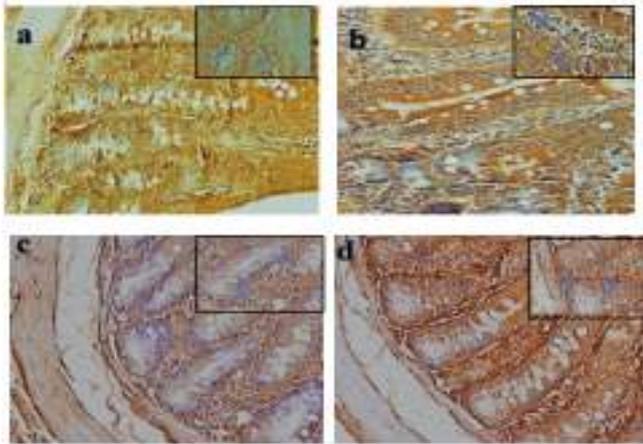
Rhodamin B termasuk ke dalam senyawa oksigen reaktif atau *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS merupakan molekul yang sangat reaktif dan tidak stabil karena molekul ini tidak berpasangan. Dampak yang ditimbulkan akibat ROS disebut dengan *stress oxidative* atau kerusakan jaringan (Makker *et al.*, 2009). Menurut Alatas (2002), pembentukan radikal bebas berasal dari mekanisme pengambilan satu elektron terluar dari sel tubuh yang sehat sehingga sel tubuh yang sehat menjadi tidak stabil. Radikal bebas yang ada di membran lipid dapat merusak ikatan lipid bilayer sehingga akan menyebabkan epitel vili duodenum tidak mampu mempertahankan keutuhan membrannya dan akhirnya terjadi kerusakan epitel vili duodenum.

Hal ini sesuai dengan pernyataan Yulianti (2007), mengkonsumsi rhodamin B secara berulang-ulang dan dalam jumlah besar dapat menyebabkan iritasi pada mukosa saluran pencernaan, kulit berwarna kemerahan.

Berdasarkan hasil pengamatan pada masing-masing perlakuan didapatkan hasil yaitu pada kelompok perlakuan kontrol negatif (**K-**) memperlihatkan bahwa struktur histologi mukosa duodenum tampak normal. Pada kelompok perlakuan 1 (**P1**) yang diinduksi dengan rhodamin B dosis 22,5 mg/KgBB tikus putih jantan memiliki tingkat kerusakan yang lebih parah jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 (**P2**) diinduksi dengan sakarin dosis 157,77 mg/KgBB. Pada kelompok perlakuan 3 (**P3**) tikus jantan yang diinduksi kombinasi rhodamin B dengan sakarin mengalami tingkat kerusakan yang sangat parah jika dibandingkan dengan kelompok induksi rhodamin B dosis 22,5 mg/KgBB (**P1**) dan kelompok induksi sakarin dosis 157,77 mg/KgBB (**P2**).

5.2 Pengaruh Paparan Rhodamin B dan Sakarin Terhadap Ekspresi TGF- β pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*)

Ekspresi TGF- β meningkat pada kelompok sakarin, rhodamin B dan kombinasi rhodamin B dengan sakarin dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini dikarenakan induksi rhodamin B dan sakarin dapat menyebabkan inflamasi yang ditandai dengan tingginya ekspresi TGF- β pada preparat histologi hasil imunohistokimia (**Gambar 5.2**).



Gambar 5.2 Gambaran Organ Duodenum Menggunakan Pewarnaan Imunohistokimia. Untuk melihat rata-rata area ekspresi TGF- β (\uparrow) yang ditandai dengan warna coklat. Perlakuan kontrol negatif (a), diinduksi dengan rhodamin B (b), diinduksi dengan sakarin (c) dan (d) diinduksi kombinasi rhodamin B dengan sakarin, menggunakan perbesaran 400X.

Ekspresi TGF- β ditunjukkan dengan warna cokelat pada hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) menggunakan antibodi TGF- β poliklonal pada metode imunohistokimia (IHK) (**Gambar 2**). Warna cokelat yang dihasilkan merupakan hasil reaksi antara *Streptavidin-Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP) yang berikatan dengan antibodi sekunder dengan kromogen *Diaminobenzidine* (DAB) (Duerr, 2006). Warna kecokelatan selanjutnya dihitung persentasenya menggunakan *Immunoratio* dengan melakukan rata-rata lima lapang pandang presentase area ekspresi TGF- β duodenum dengan perbesaran 400X. Data hasil uji *Immunoratio* selanjutnya dianalisa menggunakan perhitungan statistika. Analisa statistika menggunakan *One Way ANOVA* dengan aplikasi *SPSS for Windows 22* dan dilanjutkan dengan uji Tukey $\alpha = 0,01$ (**Tabel 1**).

Hasil analisa rata-rata area ekspresi TGF- β didapatkan dengan cara melakukan perhitungan rata-rata area dari 5 kali lapang pandang dengan menggunakan software *immunoratio*. Hasil uji statistik dalam rata-rata area ekspresi TGF- β secara kuantitatif dengan menggunakan uji *One Way Analysis Of Variant* (ANOVA) dan dilakukan uji lanjutan yaitu uji Tukey 0,01 seperti pada (**Tabel 5.1**).

Tabel 5.2 Ekspresi *Transforming Growth Factor-beta* (TGF- β) pada Organ Duodenum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*).

Kelompok Perlakuan	Rata-rata persentase area ekspresi TGF- β \pm SD
Kontrol Negatif	24,5 \pm 0,35% ^a
Perlakuan 1 Pemberian rhodamin B 22,5mg/KgBB	37,3 \pm 0,45% ^b
Perlakuan 2 Pemberian sakarin 157,77 mg/KgBB	30.9 \pm 0,51% ^c
Perlakuan 3 pemberian kombinasi rhodamin B dosis 22,5 mg/KgBB dengan sakarin dosis 157,77 mg/KgBB	51,6 \pm 1,73% ^d

Keterangan : perbedaan notasi (a,b,c) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan terhadap rata-rata persentase area ekspresi TGF- β ($p < 0,01$).

Hasil pengamatan dari **Tabel 5.1** menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan kontrol negatif (K-) memiliki nilai rata-rata persentase area ekspresi TGF- β sebesar 24,5 \pm 0,35 %. TGF- β diekspresikan dalam kondisi tubuh normal namun ekspresi TGF- β hanya sedikit dan jika jumlahnya tinggi maka ada indikasi terjadinya gangguan hemostatis di dalam tubuh sehingga tubuh akan merespon dan mengeluarkan sitokin berupa TGF- β . Menurut Seay dkk., (2008), TGF- β merupakan sitokin proinflamasi dan berpengaruh terhadap banyak tipe sel. TGF- β berfungsi di dalam migrasi, diferensiasi, proliferasi, dan apoptosis sel. Rata-rata ekspresi area TGF- β kelompok kontrol sangat sedikit jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan dosis rhodamin B 22,5 mg/KgBB (P1) memiliki peningkatan rata-rata persentase area TGF- β sebesar 37,3 \pm 0,45 %.

Pada kelompok perlakuan sakarin dosis 157,77 mg/KgBB (P2) memiliki rata-rata persentase area ekspresi TGF- β sebesar 30.9 \pm 0,51 %. Pada kelompok perlakuan (P3) kombinasi rhodamin B dosis 22,5 mg/KgBB dengan sakarin dosis 157,77 mg/KgBB memiliki rata-rata persentase area ekspresi TGF- β paling besar yaitu 51,6 \pm 1,73 %. Peningkatan rata-rata persentase area ekspresi TGF- β yang tinggi pada organ duodenum setelah diinduksi oleh rhodamin B dan sakarin disebabkan oleh adanya radikal bebas yang tinggi dan radikal bebas tersebut yang dapat menyebabkan terjadinya inflamasi secara terus-menerus sehingga terjadi kerusakan sel. Menurut penelitian Levi (1987), rhodamin B memiliki sifat

toksik yang berasal dari struktur kimia. Rhodamin B dapat menimbulkan terjadinya stres oksidatif karena paparan radikal bebas dari rhodamin B. TGF- β dapat menurunkan produksi radikal bebas, menghambat sitokin Th-1. TGF- β mampu menurunkan produksi Nitric Oxide (NO) dengan cara meng-inaktivasi iNOS.

Menurut Asni *et al.*, (2009) menyatakan bahwa, sakarin yang terakumulasi di dalam hati akan menyebabkan terjadinya peningkatan radikal bebas. Sakarin dengan dosis 500 mg/KgBB dapat menimbulkan Reactive Oxygen Species (ROS) dan peroksidasi lipid yang akan menyebabkan peningkatan TGF- β .

Perlakuan 3 (P3) yaitu kombinasi antara rhodamin B dosis 22,5 mg/KgBB dengan sakarin 157,77 mg/KgBB (P3) mengalami peningkatan rata-rata persentase area ekspresi TGF- β yang sangat tinggi yaitu 51,6 \pm 1,73 %. Peningkatan rata-rata persentase area ekspresi TGF- β yang tinggi disebabkan karena penggunaan dosis kombinasi memiliki efek toksik yang lebih tinggi jika dibandingkan penggunaan dosis secara tunggal. Akibat senyawa klorin yang ada di rhodamin B dan senyawa sikloheksamin yang ada di sakarin mampu menimbulkan stres oksidatif sehingga dapat menyebabkan inflamasi dan kerusakan pada organ duodenum. Inflamasi akan menyebabkan aktivasi makrofag yang dapat melepaskan sitokin proinflamasi diantaranya TNF- α dan TGF- β sehingga kadar TGF- β di dalam tubuh akan mengalami peningkatan akibat respon inflamasi (Abbas dkk., 2010).

Berdasarkan hasil analisa statistika pada kelompok perlakuan 3 (P3) kombinasi rhodamin B dosis 25 mg/KgBB menunjukkan terjadinya peningkatan rata-rata persentase area ekspresi TGF- β yang paling tinggi jika dibandingkan. Dengan pemberian rhodamin B atau sakarin saja.

KESIMPULAN

Kombinasi rhodamin b dengan sakarin terbukti menimbulkan efek toksik terhadap duodenum tikus putih rattus norvegicus yang ditunjukkan dengan adanya perubahan histopatologi duodenum yaitu hemoragik, inflamasi akut dan kerusakan vili serta terjadi peningkatan rata-rata persentase area ekspresi TGF- β yang sangat nyata.

SARAN

Diperlukan penelitian yang lebih lanjut tentang pemberian rhodamin B dan sakarin dengan variasi paparan yang lebih lama untuk mengetahui efek jangka panjang bagi tubuh.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada seluruh staff Laboratorium Biosains dan Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya,

Malang atas dukungan, bantuan, dan kerjasama dalam menyelesaikan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas B & Sidiq M. 2010. *Bank jaringan riset batan : batan research tissue bank*. Jakarta: Pusat Diseminasi Iptek Nuklir.
- Alatas, C, X, Z. 2002. *Efek Radiasi Pengion dan Non Pengion Pada Manusia*. Buletin Alara. 5 (203). 99-112.
- Asni E, Harahap I, Prijanti A, Wanandi S, Jusman S, dan Sadikin M (2009). *Pengaruh hipoksia berkelanjutan terhadap kadar malondialdehid, GSH tereduksi, dan aktivitas katalase ginjal tikus*. Maj Kedokt Indon, 59 (12): 595-600.
- BPOM. 2004. *Peraturan Teknis Penggunaan Bahan Tambahan Pangan Pemanis Buatan dalam Produk Pangan*. Direktorat Standarisasi Produk Pangan, Deputi Bidang Pengawasan Keamanan Pangan dan Bahan Berbahaya, p : 34-36.
- Depkes RI (Departemen Kesehatan Republik Indonesia). 1992. *Diktorat Pengawasan Obat dan Makanan, Peraturan Menteri Kesehatan RI No.722/Menkes/Per/IX/1988, Tentang Bahan Tambahan Makanan*. Edisi II, Jilid II 1992. Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Duerr, J.S. 2006. *Immunohistochemistry*. Department of Biological sciences Ohio University. USA. Fatimah, Siti., Arisandi, Desto.
- Droge, W. 2002. *Free Radicals In The Physiological Control Of Cell Function*. Physiology Review 82.: 47-95.
- Geneser, Finn. 1994. *Buku Teks Histologi: jilid 2*; alih bahasa: Dr. F. Arifin Gunawijaya MS. Binarupa Aksara: Jakarta.
- Hancock, J. F., and R. G. Parton. 2005. *Ras Plasma Membrane Signalling Platforms*. Biochem. J. 389:1-11.
- Hansen, W.H., Fitzhugh, O.G., Williams, M.W. 1959. *Subacute Oral Toxicity of Nine D&C Coal Tar Colors*, J Pharmacol Exp Ther, 122: 29A di dalam kelner , M.J.1985, rhodamine B ingestion as a cause of fluorescent red urine. West J Med, 143:523-524.
- Judarwanto, W. 2009. *Waspada! Perilaku Makan Anak Sekolah*. Klinik Khusus Kesulitan Makan pada Anak : Jakarta.
- Kuroda M, Yoshida n, Ichikawa H, Takagi T, Okuda T, Naito Y, Okanuae T, Yoshikawa T. 2006. *Lansoprazole, A Proton Pump Inhibitor, Reduces The Severity Of Indomethacin-Induced Rat Enteritis*. International Journal of Molecular Medicine 17: 89-93.
- Kusmayadi, Ayi dan Dadang Sukandar. 2008. *Cara Memilih dan Mengolah Makanan Untuk Perbaikan Gizi Masyarakat*. Deptan. Jakarta.

- Levi, P.E. 1987. *Toxic Action in Modern Toxicology*. editor : Hodgson, E and Levi, P.E. Elsevier London. Elsevier Science Publishing Co.Inc. New York.
- Mahdi, C. 2013. *Alat Pendeteksi Cepat Kandungan Formalin, Boraks, dan Rhodamin pada Makanan*. Hasil Penemuan Dosen Universitas Brawijaya yang Diproduksi Oleh Laboratorium BioChem. VOK@SINDO 1(1): 49-52.
- Makker K, Agarwal A, Sharma R. 2009. *Oxidative Stress And Male Infertility*. India J Med Res. 129: 357 – 67.
- Rifaii, M. 2009. *Reseptor Tirosin Kinase dan Transforming Growth Factor -beta*. Bahan Ajar. Fakultas MIPA. UB.
- Seay, U., Sedding, D., Krick, S., Hecker, M., Seeger, W. and Eickelberg. 2008. *Transforming Growth Factor - β - Dependent Growth Inhibition in Primary Vascular Smooth Muscle Cells Is p38-Dependent*. JPET. 315: 1005-1002.
- Smith, H. and Jones T. C. 1961. *Veterinary Pathology*. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Siswati, Pipih. 2000. *Uji Toksisitas Zat Warna Rhodamine Terhadap Jaringan Hati Mencit (Mus musculus) Galur Australia [Tesis]*. Teknik Lingkungan. Institut Teknologi Bandung.
- Whitehouse et al, 2008. *The Potential Toxicity of Artificial Sweeteners*. AAOHN J. 56.
- Yulianti, Nurheti. 2007. *Awas ! Bahaya Dibalik Lezatnya Makanan*. Edisi Pertama. Yogyakarta: CV.ANDI offset :92-93.