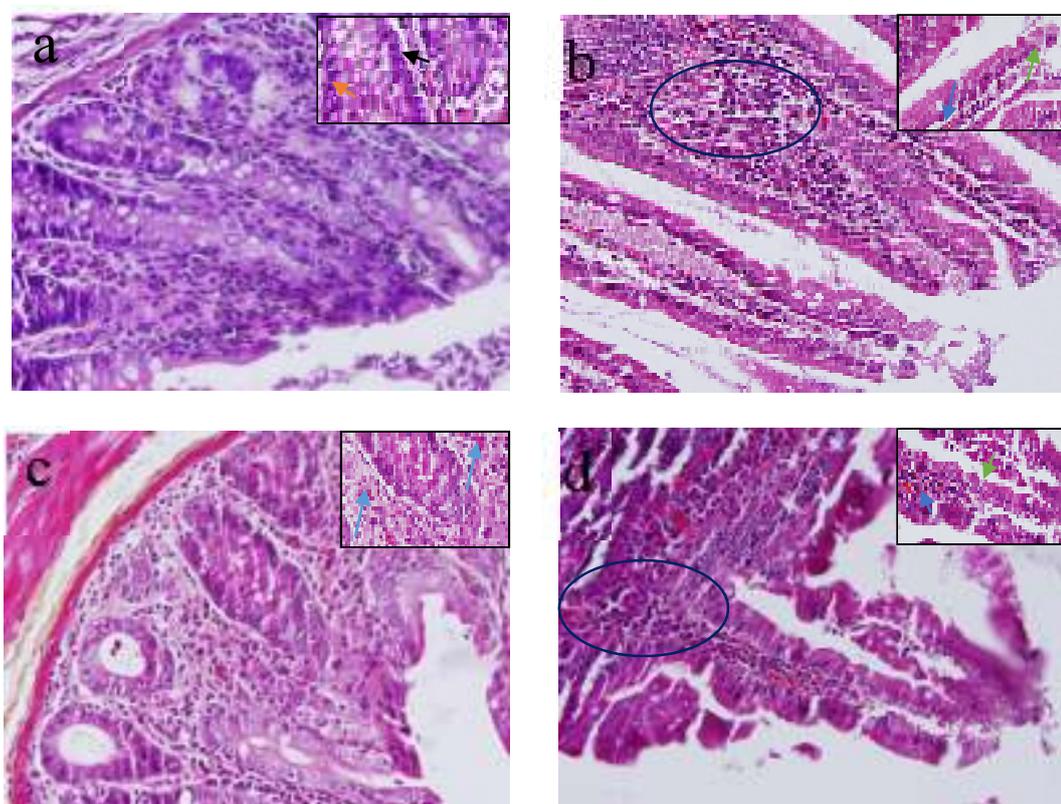


## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1.1 Pengaruh Paparan Rhodamin B dan Sakarin Terhadap Gambaran Histopatologi Duodenum pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*)

Hasil histopatologi duodenum tikus jantan putih (*Rattus norvegicus*) menunjukkan adanya perubahan pada setiap kelompok perlakuan kontrol negatif, yang diinduksi dengan rhodamin B (P1) dosis 22,5 mg/KgBB, sakarin (P2) dosis 157,77 mg/KgBB, rhodamin B dengan sakarin (P3) (Gambar 5.1).



**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. (↑) hemoragik, (↗) kerusakan pada vili, epitel normal (↗), inflamasi (○) dan vili sehat (↑).

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

<b>Perlakuan</b>	<b>Hemoragi per reksis</b>	<b>Kerusakan vili</b>	<b>Inflamasi akut</b>
<b>Kontrol negatif (K-)</b>	-	-	-
<b>Rhodamin B dosis 22,5 mg/KgBB (P1)</b>	✓	✓	✓
<b>Sakarín 157,77 mg/KgBB (P-2)</b>	✓	-	-
<b>Kombinasi rhodamin B 22,5 mg/KgBB dengan sakarin 157,77 mg/KgBB (P-3)</b>	✓	✓	✓

Keterangan:

- : tidak ada perubahan
- ✓ : ada perubahan

Hasil pemeriksaan secara mikroskopis terhadap gambaran histopatologi duodenum pada kontrol negatif (K-) didapatkan hasil yaitu keadaan duodenum normal dan tidak ditemukan adanya kerusakan. Hal ini ditunjukkan dengan keadaan epitel pada duodenum berbentuk simpel kolumner, vili tidak mengalami kerusakan, terlihat adanya kelenjar brunner dengan jelas. Menurut Genesser (1994), epitel duodenum berbentuk kolumner selapis yang terdiri dari sel endokrin, sel peaneth, sel goblet, dan sel absortif. Morfologi vili pada karnivora yaitu langsing dan panjang, sedangkan pada sapi vili pendek dan lebar. Panjang vili pada mencit dewasa lebih panjang daripada mencit neonatus (Shackelford dan Elwell, 1999).

Menurut Samuelson (2007), pada bagian bawah vili terdapat kripta dan kelenjar lieberkuhn yang terdiri atas sel punca dan sel goblet. Sel kripta epitel usus bermitosis setiap 10-14 jam pada mencit dewasa dan waktu transit sel dari kripta ke ujung vili membutuhkan waktu selama 48 jam (Shackelford dan Elwell, 1999).

Pada kelompok perlakuan 1 (**P1**) yang diinduksi dengan rhodamin B dosis 22,5 mg/KgBB pada organ duodenum tikus putih (*Rattus norvegicus*) terlihat adanya perubahan gambaran histopatologi duodenum yaitu adanya hemoragik dan kerusakan vili duodenum. Kusmayandi dan Sukandar (2008), 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. Menurut Merck Index (2006), rhodamin B adalah zat pewarna yang bersifat karsinogenik. Berdasarkan uji toksisitas rhodamin B secara injeksi subkutan yaitu timbul sarcoma lokal dan secara IV didapatkan  $\text{LD}_{50}$  89,5 mg/Kg terjadi perubahan berupa pembesaran organ.

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 memperngaruhi lemak tak jenuh pada dinding sel epitel melalui proses stres oksidatif dan akan mengganggu permeabilitas dinding sel sehingga terjadi kerusakan sel serta dapat menurunkan kinerja dari antioksidan sehingga menyebabkan terjadinya infiltrasi sel-sel radang. Pada tubuh yang menderita

inflamasi akan melepaskan sitokin proinflamasi seperti TGF- $\beta$  tujuannya agar menjaga homeostasis. Menurut BPOM RI (2004), sakarin dapat menimbulkan berbagai gangguan bagi kesehatan, di antaranya adalah iritasi pada saluran pencernaan, diare dan asma. Menurut Dermacario *and* Macario (2000), pemberian sakarin dalam jangka panjang secara terus-menerus akan menyebabkan terjadinya peningkatan sel-sel radang seperti leukosit.

Hasil pengamatan gambaran histopatologi duodenum pada kelompok perlakuan 3 (**P3**) yang 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.

Menurut Schiller dan Sellin (2006), vili berpengaruh terhadap proses penyerapan makanan. Ketika vili duodenum mengalami kerusakan, maka vili tidak dapat menyerap makanan dengan baik dan menyebabkan asupan nutrisi akan berkurang sehingga dapat menurunkan kesehatan. 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.

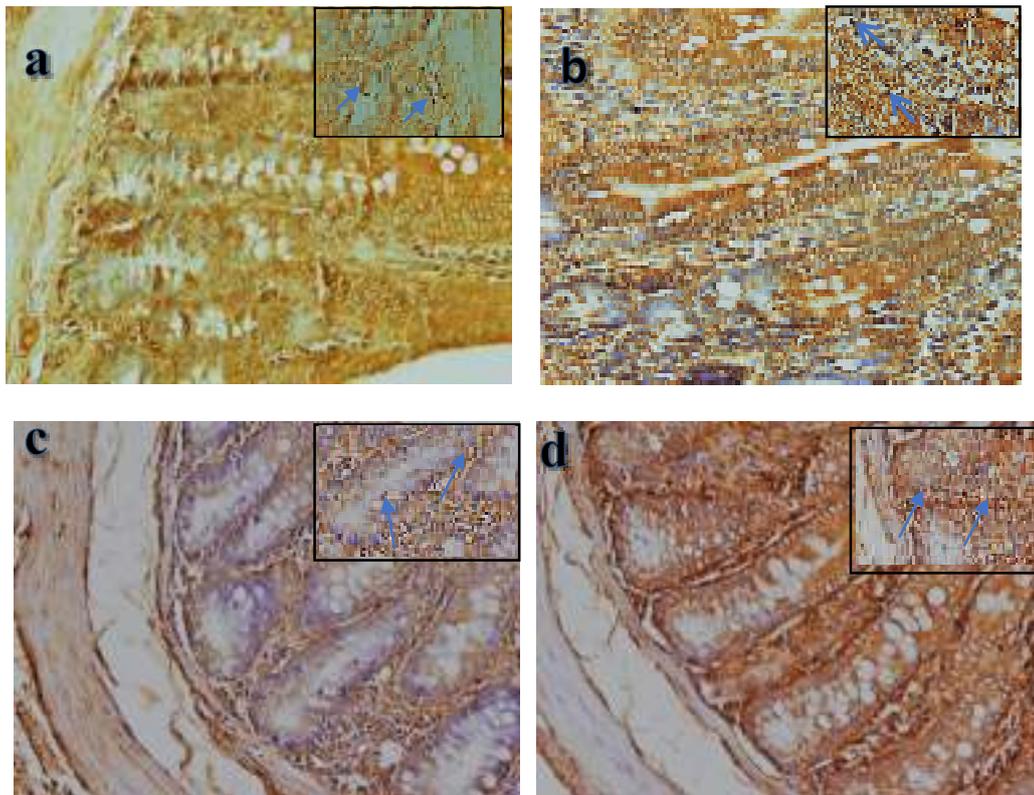
Menurut Cho *et al.*, (2007), radikal bebas dapat merusak sel dan memulai suatu reaksi rantai yang dapat menyebabkan oksidasi protein, sehingga dapat merusak aktivitas dari enzim yang bertanggung jawab untuk menjaga integritas membran. Radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan oksidatif asam nukleat yang dapat menyebabkan terjadinya mutasi, kanker, dan kerusakan sel. Menurut Smith and Jones (1961), pemberian zat toksik dapat menyebabkan kerobekan pada dinding vaskuler sehingga darah akan keluar dari vaskuler dan terjadi hemoragik per reksis yang ditandai dengan warna kemerah-merahan.

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. Menurut Brantom (2005), rhodamin B bersifat genotoksik dan karsinogenik. Sakarin yang secara berlebihan dapat menyebabkan diare, asma, iritasi saluran cerna, dan iritasi kulit (BPOM RI, 2004). Rhodamin B masuk ke dalam tubuh melalui cara inhalasi, tertelan dan lewat mata serta kulit. Efek negatif yang bisa ditimbulkan dari mengkonsumsi rhodamin B adalah dapat menyebabkan iritasi pada kulit, saluran pencernaan, saluran pernafasan, dan *gall bladder* (Alsuhehndra, 2013).

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**).

## **1.2 Pengaruh Paparan Rhodamin B dan Sakarin Terhadap Ekspresi TGF- $\beta$ pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*)**

Ekspresi TGF- $\beta$  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- $\beta$  pada preparat histologi hasil imunohistokimia (**Gambar 5.2**).



**Gambar 5.2** Gambaran Organ Duodenum Menggunakan Pewarnaan Imunohistokimia. Untuk melihat rata-rata area ekspresi TGF- $\beta$  ( $\uparrow$ ) 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.

TGF- $\beta$  merupakan sitokin proinflamatori yang meregulasi kerusakan sel. Kelompok tikus kontrol (**K-**) menunjukkan hanya sedikit ekspresi TGF- $\beta$ . Kelompok tikus perlakuan (**P1**) rhodamin B dengan dosis 22,5 mg/KgBB menunjukkan ekspresi TGF- $\beta$  yang lebih besar jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan (**P2**) sakarin dengan dosis 157,77 mg/KgBB. Kelompok perlakuan (**P3**) kombinasi rhodamin B dengan dosis 22,5 mg/KgBB dengan sakarin dosis 157,77 mg/KgBB memiliki peningkatan ekspresi TGF- $\beta$  yang paling besar jika dibandingkan dengan kelompok rhodamin B dosis 22,5 mg/KgBB dan sakarin dosis 157,77 mg/KgBB.

Warna kecoklatan diakibatkan oleh adanya proses pewarnaan imunohistokimia. Antigen yang terdapat pada jaringan duodenum akan berikatan dengan antibodi primer (TGF- $\beta$  poliklonal) dan antibodi sekunder (Anti TGF- $\beta$  universal) yang berlabel biotin diikuti dengan adanya penambahan SA-HRP dan kromagen berupa DAB. DAB berfungsi sebagai pemberi warna coklat akibat adanya ikatan antara antibodi-antigen yang ada di dalam inti sel (Key, 2006). Hasil analisa rata-rata persentase area ekspresi TGF- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$ ) pada Organ Duodenum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*).

Kelompok Perlakuan	Rata-rata persentase area ekspresi TGF- $\beta$ ±SD
Kontrol Negatif	24,5±0,35% <sup>a</sup>
Perlakuan 1 Pemberian rhodamin B 22,5mg/KgBB	37,3±0,45% <sup>b</sup>
Perlakuan 2 Pemberian sakarin 157,77 mg/KgBB	30,9±0,51% <sup>c</sup>
Perlakuan 3 pemberian kombinasi rhodamin B dosis 22,5 mg/KgBB dengan sakarin dosis 157,77 mg/KgBB	51,6±1,73% <sup>d</sup>

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

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa pemberian dosis kombinasi rhodamin B dengan sakarin pada kelompok (P3) dapat meningkatkan rata-rata persentase area ekspresi TGF- $\beta$  yang signifikan ( $p < 0,01$ ). Hasil uji BNP

menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ ) terhadap ekspresi TGF- $\beta$  antara kelompok kontrol negative (**K-**) dengan kelompok (**P3**) pemberian kombinasi rhodamin B dosis 22,5mg/KgBB dengan sakarin dosis 157,77 mg/KgBB (**Tabel 5.1**). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian kombinasi rhodamin B dosis 22,5mg/KgBB dengan sakarin dosis 157,77 mg/KgBB adalah perlakuan yang memiliki efek lebih toksik.

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

Pada kelompok perlakuan sakarin dosis 157,77 mg/KgBB (**P2**) memiliki rata-rata persentase area ekspresi TGF- $\beta$  sebesar  $30,9 \pm 0,51$  %. Pada kelompok perlakuan kombinasi rhodamin B dosis 22,5 mg/KgBB dengan sakarin dosis 157,77

mg/KgBB memiliki rata-rata persentase area ekspresi TGF- $\beta$  paling besar yaitu  $51,6 \pm 1,73$  %. Peningkatan rata-rata persentase area ekspresi TGF- $\beta$  yang tinggi pada organ duodenum setelah diinduksi oleh rhodamin B dan sakarin disebabkan oleh adanya radikal bebas yang tinggi dan radikal bebas tersebut dapat menyebabkan terjadinya inflamasi secara terus-menerus sehingga terjadinya kerusakan sel. Menurut penelitian Levi (1987), rhodamin B memiliki sifat toksik yang berasal dari struktur kimia. Rhodamin B dengan Poliaromatik Hidrokarbon (PAH) dapat mengaktivasi enzim sitokrom P-450 sebagai permetabolisme dan dapat berikatan dengan lipid, DNA, dan protein. Rhodamin B dapat menimbulkan terjadinya stres oksidatif karena paparan radikal bebas dari rhodamin B. Menurut penelitian Barcellos (2005) melaporkan bahwa, TGF- $\beta$  merupakan sitokin proinflamasi dan sitokin antiinflamasi. TGF- $\beta$  dapat menurunkan produksi radikal bebas, menghambat sitokin Th-1, dapat meningkatkan produksi, aktivasi TGF- $\beta$  yang dipicu oleh adanya nitrit oksida, dan radikal bebas. TGF- $\beta$  mampu menurunkan produksi *Nitric Oxide* (NO) dengan cara meng-inaktivasi iNOS.

Menurut Asni *et al.*, (2009), sakarin yang terakumulasi di dalam hati akan menyebabkan terjadinya peningkatan radikal bebas. Menurut Amin dan Almuzafar (2015), sebagian besar dari sakarin akan masuk ke dalam tubuh dan disekresikan lewat urin dalam bentuk utuh dan sebagian mengalami metabolisme di hati. Sakarin dengan dosis 500 mg/KgBB dapat menimbulkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan peroksidasi lipid yang akan menyebabkan peningkatan TGF- $\beta$ .

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- $\beta$  yang sangat tinggi yaitu  $51,6 \pm 1,73$  %. Peningkatan rata-rata persentase area ekspresi TGF- $\beta$  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 terjadi pada saat infeksi, keracunan zat toksik maupun kerusakan sel. Inflamasi akan menyebabkan terjadinya reaksi yang kompleks dari sistem imun tubuh pada jaringan vaskuler yang akan menyebabkan akumulasi dan aktivasi leukosit dan dapat menyebabkan kerusakan pada organ. Inflamasi akan menyebabkan aktivasi makrofag yang dapat melepaskan sitokin proinflamasi diantaranya TNF- $\alpha$  dan TGF- $\beta$  sehingga kadar TGF- $\beta$  di dalam tubuh akan mengalami peningkatan akibat respon inflamasi (Abbas dkk., 2010).

Menurut penelitian Barcellos (2005) melaporkan, TGF- $\beta$  merupakan sitokin proinflamasi ataupun sitokin antiinflamasi. TGF- $\beta$  dapat menurunkan produksi radikal bebas, menghambat sitokin Th-1. Produksi dan aktivasi TGF- $\beta$  dipicu oleh adanya nitrit oksida dan radikal bebas. TGF- $\beta$  mampu menurunkan produksi *Nitric Oxide* (NO) dengan cara meng-inaktivasi iNOS. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian kombinasi rhodamin B dan sakarin akan menimbulkan efek toksik yang lebih besar dibandingkan dengan pemberian rhodamin B atau sakarin saja. Menurut Baratawidjaja dan Iris (2009), peningkatan

ekspresi TGF- $\beta$  yang tinggi diakibatkan karena rhodamin B dan Sakarin dapat menghasilkan ROS yang bersifat merusak membran mukosa sel duodenum sehingga terjadinya inflamasi. Inflamasi akan merangsang makrofag untuk melepaskan ikatan Nf- $\kappa$ B sebagai faktor transkripsi sehingga makrofag dapat mengekspresikan beberapa sitokin proinflamasi seperti TGF- $\beta$ . Menurut Seay dkk., (2005) melaporkan, peningkatan ekspresi TGF- $\beta$  yang berlebihan pada hewan percobaan diduga berfungsi untuk memperbaiki struktur sel dan struktur matrik yang rusak. TGF- $\beta$  selanjutnya juga akan mengaktifkan mekanisme apoptosis dari jaringan yang bersangkutan agar dapat pertumbuhan sel dapat terkontrol dengan baik.

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- $\beta$  yang paling tinggi jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 (**P1**) rhodamin B dosis 22, 5 mg/KgBB dan perlakuan 2 (**P2**) sakarin dosis 157,77 mg/KgBB. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian dosis kombinasi rhodamin B dengan sakarin akan menimbulkan efek toksik yang lebih besar jika dibandingkan dengan pemberian rhodamin B atau sakarin saja.