

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Penelitian ini telah mendapat persetujuan etik (*ethical approval*) dari Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan nomor : 03/Ka.Kom.Et/70/KE/VII/2017.

4.1.1. Hasil Pengamatan Histopatologis Hepar Tikus

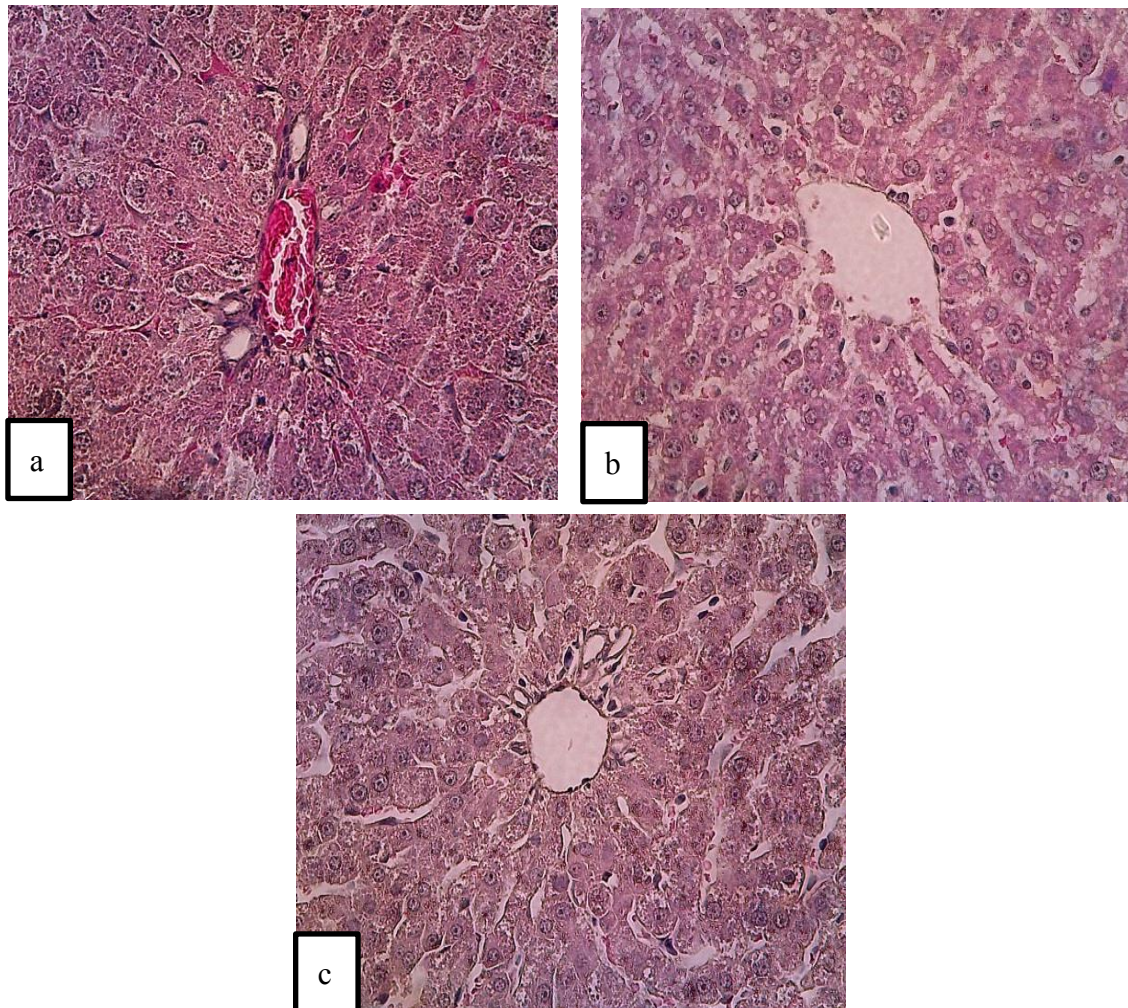
Subjek penelitian terdiri atas 18 ekor tikus yang terbagi menjadi tiga (3) kelompok dengan masing-masing kelompok berjumlah enam (6) tikus yang telah dibuat menjadi sediaan histologi dan diamati di Laboratorium Parasit FKUII menggunakan mikroskop Olympus CX-21 yang terhubung dengan kamera optilab. Pengamatan sediaan dilakukan dengan perbesaran 400x pada sepuluh lapang pandang pada lobus sinistra hepar dengan vena sentralis berada di tengah-tengah setiap lapang pandang.

Pengamatan histopatologi hepar tikus pada kelompok kontrol (K) yang hanya mendapatkan perlakuan sodium nitrit 50 mg/kgBB/hari tanpa pemberian propolis menunjukkan kerusakan berat dengan gambaran degenerasi dan nekrosis yang massif pada seluruh lapang pandang, dan sangat sedikit bahkan hampir tidak ada sel hepatosit normal yang terlihat. Degenerasi sel dapat terlihat dengan gambaran sel hepatosit yang membesar, sitoplasma nampak jernih, dengan adanya vakuolisasi pada sitoplasma, inti ditengah dan masih normokromatik. Nekrosis sel dapat dilihat dengan inti mengalami penyusutan, berbatas tidak tegas, menjadi berwarna gelap yang disebut dengan piknosis, selain itu juga tampak inti terpecah dan menimbulkan fragmen-fragmen zat kromatin yang tersebar dalam sel yang disebut karioreksis. Gambaran lain dari nekrosis yang ditemukan adalah inti sel kehilangan kemampuan untuk diwarnai sehingga tampak sel tidak memiliki inti yang disebut dengan kariolisis. Selain itu, juga tampak kongesti berat pada vena sentralis dan juga hampir di seluruh sinusoid hepar yang merupakan ciri-ciri terjadinya kerusakan hepar. Hepatosit yang mengelilingi vena sentralis juga terlihat susunannya tidak radier dan

batas antar sel tampak kurang jelas. Sel-sel radang berupa limfosit juga terlihat cukup banyak terutama di daerah sekitar vena sentralis. Limfosit terlihat berupa sel berbentuk bulat atau lonjong dengan ukuran kecil dan berwarna gelap (gambar 7a).

Pengamatan histopatologi hepar tikus pada kelompok perlakuan 1 (P1) yang mendapatkan sodium nitrit 50 mg/kgBB/hari + propolis 100 mg/kgBB/hari tampak kerusakan sedang, dengan jumlah degenerasi dan nekrosis sel tidak sebanyak pada kelompok kontrol (K), serta hepatosit masih tersusun secara radier dengan batas antar sel masih terlihat jelas. Beberapa sel pada kelompok P1 terlihat mengalami degenerasi yang terlihat dengan adanya vakuolisasi pada sitoplasma, serta ada juga yang nampak mengalami nekrosis dengan gambaran piknosis, karioreksis, maupun kariolisis, namun sebagian hepatosit pada kelompok P1 juga tampak masih normal. Hepatosit yang normal terlihat berupa sel dengan nukleus yang tampak jelas, tanpa vakuolisasi, sitoplasma jernih, serta inti normokromatik. Gambaran vena sentralis maupun sinusoid hepar masih tampak putih (normal) yang menunjukkan bahwa tidak ditemukan adanya kongesti (gambar 7b).

Pengamatan histopatologi hepar tikus pada kelompok perlakuan 2 (P2) yang mendapatkan perlakuan sodium nitrit 50 mg/kgBB/hari + propolis 200 mg/kgBB/hari juga nampak kerusakan sedang, dengan jumlah degenerasi dan nekrosis sel hepar tidak sebanyak pada kelompok kontrol (K). Gambaran histologi kelompok perlakuan 2 (P2) tidak terlalu jauh berbeda dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1 (P1). Sebagian hepatosit masih tampak normal dan tersusun secara radier mengelilingi vena sentralis dengan batas antar sel masih tampak cukup jelas. Sebagian hepatosit lain juga nampak mengalami degenerasi serta nekrosis yang ditandai dengan piknosis, karioreksis serta kariolisis. Sebaran sel radang berupa limfosit juga terlihat mengelilingi vena sentralis dan sinusoid hepar namun tidak sebanyak pada kelompok kontrol. Tidak ditemukan adanya kongesti baik pada vena sentralis maupun sinusoid hepar pada kelompok P2 (gambar 7c).



Gambar 7. a. gambaran histopatologis hepar kelompok kontrol perbesaran 40x10. b. gambaran histopatologis hepar kelompok perlakuan 1 perbesaran 40x10. C: gambaran histopatologis hepar kelompok perlakuan 2 perbesaran 40x10.

4.1.2 Hasil Penghitungan Kerusakan Sel

Penghitungan kerusakan sel pada histologi hepar pada kelompok kontrol (K), perlakuan satu (P1) serta perlakuan dua (P2) diambil masing-masing sepuluh lapang pandang per preparat. Pada setiap lapang pandang dilihat kerusakan sel (degenerasi dan nekrosis) dan kemudian dilakukan penilaian menggunakan skoring histopatologi Brunt *et al* (1999) dan dihitung rerata setiap preparat.

Tabel 5. Hasil Penghitungan Skoring Histopatologis Hepar

Kelompok	Rerata Skor Kelompok	Nilai P ANOVA
Kontrol (K)	3,5	p = 0,001
Perlakuan 1 (P1)	3,1	
Perlakuan 2 (P2)	3,0	

4.1.3. Analisis Data Penelitian

Pada penelitian ini, jumlah kelompok independen yang dibandingkan adalah tiga kelompok (kontrol, perlakuan satu, dan perlakuan dua), maka data dianalisis dengan uji *one way anova* dengan sebelumnya dilakukan uji normalitas distribusi data dengan uji *Shapiro-Wilk* ($n < 50$) serta uji homogenitas menggunakan uji *Levene*. Pada uji *Shapiro-Wilk* didapatkan hasil pada kelompok kontrol (K) $p = 0,480$ ($p > 0,05$), kelompok perlakuan satu (P1) $p = 0,152$ ($p > 0,05$), kelompok perlakuan dua (P2) $p = 0,091$ ($p > 0,05$). Karena pada seluruh kelompok didapatkan nilai $p > 0,05$, maka dapat disimpulkan bahwa distribusi data pada seluruh kelompok normal. Pada uji *Levene*, didapatkan hasil $p = 0,07$ ($p > 0,05$) maka dapat disimpulkan bahwa data tersebut memenuhi asumsi homogen (memiliki varian yang sama). Karena distribusi data normal dan homogenitas menunjukkan varian yang sama maka persyaratan uji parametrik *one way anova* telah terpenuhi.

Pada hasil uji data *one way anova* dengan nilai $\alpha = 5\%$, didapatkan hasil yang signifikan yaitu $p = 0,001$, maka dapat disimpulkan bahwa H_0 ditolak, sehingga kesimpulan yang kita dapatkan adalah terdapat perbedaan yang bermakna rata-rata kerusakan sel hepar (degenerasi dan nekrosis) setidaknya pada dua dari tiga kelompok yang diujikan. Karena pada hasil uji *one way anova* didapatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) serta uji *Levene* menunjukkan varian yang sama ($p > 0,05$), maka uji lanjut (*Post Hoc Test*) yang digunakan adalah uji *Bonferroni* untuk mengetahui perbandingan kelompok mana saja yang menunjukkan perbedaan yang bermakna. Pada uji lanjut *Bonferroni* didapatkan perbedaan yang bermakna antara

kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan satu (P1) ($p=0,004$) serta antara kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan dua (P2) ($p=0,001$). Sedangkan antara kelompok perlakuan satu (P1) dan kelompok perlakuan dua (P2) tidak didapatkan perbedaan yang signifikan ($p=1,000$, $p>0,05$).

Tabel 6. Nilai Kemaknaan Berdasarkan *Post Hoc Test*

Kelompok	Kontrol (K)	Perlakuan 1 (P1)	Perlakuan 2 (P2)
Kontrol (K)	-	0,004	$p=0,001$
Perlakuan 1 (P1)	0,004	-	$p=1,000$
Perlakuan 2 (P2)	$p=0,001$	$p=1,000$	-

4.2. Pembahasan

Pada penelitian ini ditemukan terjadinya kerusakan sel hepar pada seluruh kelompok percobaan dengan tingkat keparahan yang berbeda. Tingkat keparahan yang paling tinggi ditemukan pada kelompok kontrol (K) yang hanya mendapatkan perlakuan berupa sodium nitrit peroral sebanyak 50 mg/kgBB/hari.

Menurut Saputri (2015) pemberian sodium nitrit peroral sebanyak 50mg/kgBB/hari pada tikus (*Rattus novergicus*) dapat meningkatkan kadar methemoglobin yang dapat mengakibatkan kerusakan pada sel hepar yang dtunjukkan dengan terjadinya gambaran histopatologis berupa vakuolisasi, piknotik, serta infiltrasi leukosit pada hepatosit. Hal ini didukung oleh Lyhatskiy *et al* (2013) yang pada penelitiannya menyatakan bahwa pemberian sodium nitrit sebanyak 45 mg/kgBB/hari dapat menyebabkan peningkatan yang bermakna methemoglobin pada darah. Hal ini dikarenakan nitrit dapat bersifat toksik dengan cara mengoksidasi hemoglobin darah menjadi methemoglobin, dimana ion Fe^{2+} pada hemoglobin biasa diubah menjadi Fe^{3+} , sehingga afinitasnya terhadap oksigen berkurang yang berujung pada hipoksia. Hal ini juga diperkuat dengan hasil penelitian Zaidi (2010) yang menyatakan bahwa pemberian sodium nitrit peroral sebanyak 75mg/kgBB/hari dapat menyebabkan *hypoxic liver injury* (HLI) yang berujung pada degenerasi serta

nekrosis hepatoseluler yang ditunjukkan dengan terjadinya vakuolisasi yang luas, degenerasi, serta nekrosis yang berat pada gambaran histopatologi hepar terutama di daerah periportal. Zaidi (2010) menyatakan bahwa respon seluler terhadap terjadinya hipoksia melibatkan kejadian yang kompleks, dimana ATP intraseluler memerankan peran penting di dalamnya. Depleksi ATP yang terus menerus dapat berlanjut pada gangguan permeabilitas membran sel serta gangguan homeostasis ion, seperti peningkatan Ca^{2+} intraseluler dan peningkatan hidrolisis dari fosfolipid membran sel yang berujung pada kehancuran sel. Penelitian yang dilakukan Sherif dan Gayar (2015) menyatakan bahwa pemberian sodium nitrit peroral sebanyak 80 mg/kgBB/hari menyebabkan peningkatan ROS dan mengakibatkan kerusakan sel-sel hepar yang ditunjukkan dengan perubahan gambaran histopatologis dan juga peningkatan secara signifikan berbagai sitokin proinflamasi hepar seperti *tumor necrosis factor* (TNF)- α , *C-reactive protein* (CRP), *transforming growth factor* (TGF)- β 1, *interleukin-1* beta (IL)-1 β , dan *caspase-3*.

Salama *et al* (2013) menyatakan bahwa pemberian sodium nitrit peroral sebanyak 80 mg/kgBB/hari dapat mengakibatkan efek hepatotoksik karena ROS yang dihasilkan akibat hipoksia akan menimbulkan stres oksidatif dan juga penghambatan aktivitas antioksidan pada hepar yang ditunjukkan dengan peningkatan yang signifikan dari beberapa biomarker stres oksidatif (*malondialdehyde* (MDA), hidrogen peroksida dan anion superoksida), penurunan yang signifikan dari aktivitas antioksidan (*glutathione*, *superoxide dismutase* (SOD), dan *catalase* (CAT)), serta peningkatan yang signifikan pada *DNA fragmentation assay*. Pada penelitian Salama *et al.* juga ditemukan peningkatan signifikan fungsi hepar (*Serum alkaline phosphatase* (ALP) dan *alanine aminotransferase* (ALT)) pada kelompok yang hanya diinduksi sodium nitrit saja.

Hipoksia dan selanjutnya stres oksidatif yang terjadi dapat menginduksi apoptosis melalui jalur intrinsik, bermula dari terhambatnya famili Bcl-2 dan Bcl-X yang berperan sebagai protein antiapoptosis yang selanjutnya menginduksi famili lain yaitu Bax dan Bak (*Bcl-2 Associated killer*), yang berperan sebagai protein

proapoptosis. Inseri Bax dan Bak ke dalam membrane mitokondria akan menstimulasi pelepasan substrat sitokrom C ke dalam sitoplasma (Kumar *et al.*, 2013). Sitokrom C kemudian akan berikatan dengan APAF 1 (*apoptosis protease activating factor-1*) membentuk CARD (*Caspase Recruitment domain*). Beberapa CARD akan bergabung membentuk suatu kompleks yang disebut kompleks apoptosom, yang kemudian mengikat serta mengaktivasi procaspase 9 menjadi caspase 9. Caspase 9 merupakan caspase inisiator dan selanjutnya menginduksi aktivasi procaspase 3 menjadi caspase 3, yang merupakan caspase efektor dalam terjadinya apoptosis dengan cara memecah berbagai macam protein dalam sel sehingga inti sel akan pecah (Hidayat *et al.*, 2011).

Stres oksidatif akibat produksi ROS yang disebabkan oleh sodium nitrit akan merusak homeostasis tubuh sehingga merusak berbagai jaringan tubuh, dan hepar merupakan target utama yang diserang oleh ROS. Khrishnamoorthy dan Sangeetha (2008) dalam penelitiannya menemukan bahwa induksi sodium nitrit sebanyak 300 mg/kgBB/hari juga dapat meningkatkan kejadian peroksidasi lipid (LPO). Hassan *et al* (2009) juga menyatakan bahwa pemberian sodium nitrit sebanyak 80mg/kgBB/hari juga dapat menyebabkan stres oksidatif yang berujung pada peningkatan kejadian peroksidasi lipid. Stres oksidatif dapat menginduksi terjadinya peroksidase lipid dalam hepar akibat proliferasi sel stellata dan sintesis kolagen. Peroksidase lipid selanjutnya dapat menyebabkan terjadinya steatosis, yaitu akumulasi lipid intraseluler, yang sangat berbahaya bagi hepar (Li *et al*, 2015).

Berdasarkan hasil penelitian ini didapatkan perbedaan kerusakan sel yang signifikan diantara kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan satu (P1) serta antara kelompok kontrol (K) dengan kelompok perlakuan dua (P2), sedangkan antara kelompok perlakuan satu (P1) dan kelompok perlakuan dua (P2) tidak didapatkan perbedaan yang signifikan, maka dapat disimpulkan bahwa propolis yang diberikan pada kelompok P1 dan P2 bersifat hepatoprotektif sehingga kerusakan sel hepar, baik degenerasi maupun nekrosis, pada kelompok P1 dan P2 tidak seluas pada kelompok kontrol (K). Hal ini serupa dengan penelitian Wided, Hassiba, dan Mesbah (2014)

yang mengatakan bahwa pemberian ekstrak etanol propolis sebanyak 100mg/kgBB/hari dapat menghambat terjadinya stres oksidatif pada sel dan mitokondria hepar akibat induksi doksorubisin (DOX). Efek hepatoprotektif tersebut disebabkan karena propolis mengandung berbagai macam kandungan biologis yang bermanfaat, terutama flavonoid dan senyawa fenol. Kandungan dari propolis tersebut memiliki efek anti oksidan karena merupakan *scavenger* yang kuat terhadap radikal bebas. Selain sebagai antioksidan, propolis juga dapat menghambat terjadinya peroksidasi lipid (LPO) pada sel hepar, yang ditunjukkan dengan penurunan angka biomarker *Malondialdehyde* (MDA) yang signifikan. Hal ini dikarenakan flavonoid dan senyawa fenol pada propolis dapat bertindak sebagai *scavenger* terhadap MDA atau dengan cara menghambat rantai reaksi *cytosoliclipoperoxydation*. Hal ini juga didukung oleh Kanbur, Eraslan, dan Silici (2007) yang menyatakan bahwa pemberian propolis sebanyak 100mg/kgBB/hari dapat menurunkan kejadian stres oksidatif yang ditunjukkan dengan penurunan kadar MDA jaringan dan plasma, serta peningkatan kadar *superoxide dismutase* (SOD), *catalase* (CAT), serta glutathione peroxidase (GSH-Px). *Malondialdehyde* (MDA) merupakan produk akhir dari terjadinya peroksidasi lipid, dimana peningkatan konsentrasi MDA merupakan bukti dari terjadinya toksisitas akibat radikal bebas (Talas dan Gulhan, 2009).

Penelitian Zhao *et al.* (2009) menyatakan bahwa pemberian propolis sebanyak 200mg/kgBB/hari memiliki potensi terapeutik sebagai agen hepatoprotektif karena dapat menjadi antioksidan dan mencegah lipid peroksidase dalam melawan stres oksidatif yang diinduksi intoksikasi merkuri. Hal ini ditunjukkan dengan penurunan yang signifikan pada kadar lipid peroksidase (LPO) dan *oxidized glutathione* (GSSG), yang merupakan biomarker terjadinya stres oksidatif. Selain itu, juga ditemukan peningkatan yang signifikan pada kadar *glutathione* (GSH) dan beberapa enzim antioksidan seperti *glutathione S-transferase* (GST), *glucose-6-phosphate dehydrogenase* (G6PD), *superoxide dismutase* (SOD), dan *catalase* (CAT). Hal ini dikarenakan kandungan flavonoid dan substansi fenol yang terdapat pada propolis dapat menetralkan langsung terhadap adanya ROS, meningkatkan kapasitas

antioksidan endogen, serta memodulasi reduksi oksidasi seluler. Propolis juga dapat menembus membrane sel serta dapat berakumulasi di lingkungan hidrofilik maupun hidrofobik sehingga dapat melindungi sel hepar dari stres oksidatif. Selain itu, propolis juga mengandung quercetin yang dapat menghambat LPO dengan mengikat radikal bebas dan/atau mempengaruhi transisi ion metal. Vasilveya *et al.* (2000) menambahkan bahwa quersetin memiliki efek antilipoperoxidatif, dengan cara menjadi kelasi ion, mengikat radikal peroksil, serta mereduksi Fe^{2+} . Quercetin dapat berdifusi ke dalam membrane sel sehingga mampu menjadi *scavenger* terhadap oksiradikal pada beberapa bagian *lipid bilayer*. Yousef *et al.* (2010) dari hasil penelitiannya juga menyatakan bahwa quercetin dapat menurunkan kerusakan pada hepar dan renal yang mengalami stres oksidasi akibat induksi parasetamol. Efek antioksidan quercetin didapatkan dari beberapa mekanisme. Pertama, quercetin memiliki struktur *pentahydroxyflavone*, yang membuat quercetin dapat melakukan kelasi terhadap ion metal *via* struktur *orthodihydroxy phenolic*, sehingga dapat mengikat *lipid alkoxyl* dan *peroxyl radicals*. Kedua, quercetin dapat menghambat enzim-enzim oksidatif seperti *xanthine oxidase*, *lipoxygenase* and *NADPH oxidase*, yang merupakan enzim-enzim penting dalam proses terjadinya kerusakan akibat stres oksidatif. Ketiga, quercetin dapat meningkatkan pembentukan antioksidan endogen, seperti peningkatan ekspresi *γ-glutamylcysteine synthetase*, yang dapat meningkatkan kadar *glutathione* (GSH) intrasel. Efek hepatoprotektif dari Quercetin didapatkan dari kemampuan quercetin dalam mengatur reduksi oksidasi (redoks) intrasel, kemampuan antioksidan, serta kemampuan penghambatan kanal kalsium.

Penelitian Bhadauria, Nirala, dan Shukla (2007) juga menyatakan pemberian propolis sebanyak 200mg/kgBB/hari dapat memperbaiki gambaran histopatologis hepar tikus yang mengalami stres oskidatif setelah diinduksi karbontetraklorida (CCl_4). Hal ini dikarenakan kandungan flavonoid pada propolis menghambat rantai reaksi awal dari terjadinya peroksidasi lipid, dengan bertindak sebagai *scavenger* dari *peroxyradicals of polyunsaturated fatty acids* (PUFA). Selain itu, propolis juga mengandung *caffeic acid phenylethyl ester* (CAPE) yang juga dapat bertindak sebagai

scavenger dan penghambat produksi ROS. Chen dan Gong (2011) dalam penelitiannya menyimpulkan bahwa CAPE dapat menghambat terjadinya stres oksidatif. Efek antioksidan dari CAPE didapatkan dari struktur fungsional orto-dihydroxil di cincin katekol pada CAPE. Struktur ini dapat menjadi perantara oksidasi dan meningkatkan transfer atom H ke *peroxyl radicals*, sehingga terbentuk *phenoxy radicals* yang bersifat lebih stabil.

Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian Garba *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa pemberian ekstrak *aloe vera* dan madu memiliki pengaruh yang sangat kecil atau bahkan tidak memiliki pengaruh sama sekali terhadap kerusakan hepar yang diinduksi ibuprofen. Penelitian yang dilakukan Garba *et al.* tidak menggunakan propolis tapi menggunakan *aloe vera* dan madu murni. Walau kadar madu yang diberikan dalam penelitian itu lebih banyak (1 gr/kgBB/hari), namun pemberiannya hanya dilakukan selama 14 hari. Sedikit efek yang diberikan oleh madu dalam penurunan angka kerusakan hepar bukanlah efek langsung terhadap terjadinya kerusakan hepar akibat induksi ibuprofen, namun merupakan efek madu terhadap sumbatan saluran empedu, yang merupakan efek lebih lanjut dari kerusakan hepar akibat ibuprofen.

Pada penelitian ini tidak didapatkan perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan satu (P1) dengan kelompok perlakuan dua (P2), sehingga dapat disimpulkan bahwa efek yang didapatkan dari pemberian propolis 100mg/kgBB/hari dan 200mg/kgBB/hari tidak jauh berbeda.