

Efek Hepatoprotektif Ekstrak Etanol Brokoli (*Brassica oleracea L. var. italica*) terhadap Kerusakan Histologis Sel Hati Tikus Wistar yang Diinduksi DMBA

(*Hepatoprotective Effect of Ethanolic Extract of Broccoli (Brassica oleracea L. var. italica) on the Histologically Damage of Wistar Rats Liver Cell Induced by DMBA*)

Muhtar Ady Kusuma, Elly Nurus Sakinah, Rosita Dewi
Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail: maktarmuhtar@aol.com

Abstract

DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene) is one of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon's form that is abundant on air pollution, i.e. automobile exhaust, cigarette smoke, and wood stoves. DMBA is metabolized in liver result in DMBA-DE. DMBA-DE is a free radical compound that has hepatotoxic effect. Broccoli contains flavonoid that has antioxidant effect. It can stabilize DMBA-DE radical compound. This research was conducted to investigate the hepatoprotective effect of ethanolic extract of broccoli on the damage of rat's liver cells induced by DMBA. This research used 30 white male rats that was divided into 6 groups: normal control (aquadest), positive control (DMBA) and the treatment groups (using broccoli ethanolic extract with dose : 250, 500, 1000, and 2000 mg/kgBB). The treatment was given for 7 days followed by single-dose DMBA 15 mg/kgBB induction in the 8th day. Histological appearance of liver cells were examined on the 12th day. Data were analyzed by using Kruskal Wallis test followed by Mann Whitney. The result showed that there was a significant difference among the groups with $p < 0.05$. In conclusion, there were some differences of hepatoprotective effect of broccoli ethanolic extract on the histologically damage of rats liver cells induced by DMBA.

Keywords: ethanolic extract of broccoli, DMBA, histopathology, hepatoprotective

Abstrak

DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene) merupakan salah satu bentuk Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) yang banyak terdapat pada polutan asap kendaraan bermotor, asap rokok, dan asap dapur. DMBA dimetabolisme di hati menjadi DMBA-DE. DMBA-DE merupakan senyawa radikal bebas yang bersifat hepatotoksik. Brokoli memiliki kandungan flavonoid yang berperan sebagai antioksidan dengan menstabilkan senyawa radikal DMBA-DE. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek hepatoprotektif pemberian ekstrak etanol brokoli terhadap kerusakan histologis sel hati tikus wistar yang diinduksi DMBA. Penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus wistar jantan yang dibagi menjadi 6 kelompok yaitu kontrol normal (aquades), kontrol positif (DMBA), dan perlakuan (ekstrak etanol brokoli dosis 250, 500, 1000, dan 2000 mg/kgBB). Perlakuan diberikan selama 7 hari diikuti dengan induksi DMBA dosis tunggal 15 mg/kgBB pada hari ke-8. Sampel organ hati diambil untuk pengamatan kerusakan sel hati tikus secara mikroskopis pada hari ke-12. Data dianalisis menggunakan uji *Kruskal Wallis* dilanjutkan dengan *Mann Whitney*. Hasil penelitian menunjukkan ada perbedaan bermakna antarkelompok dengan nilai signifikansi $p < 0,05$. Penelitian ini menyimpulkan bahwa terdapat perbedaan efek hepatoprotektif pada pemberian ekstrak etanol brokoli terhadap kerusakan histologis sel hati tikus wistar yang diinduksi DMBA.

Kata Kunci: ekstrak etanol brokoli, DMBA, histopatologi, hepatoprotektif

Pendahuluan

Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) merupakan polutan lingkungan yang bersifat karsinogenik. Sebagian besar PAH berasal dari asap kendaraan bermotor. Menurut data Korlantas Polri, pada tahun 2013 jumlah kendaraan bermotor di Indonesia adalah 104,2 juta unit, jumlah ini meningkat 24% dari tahun 2011 sehingga jumlah paparan PAH terhadap populasi manusia diprediksi akan terus mengalami peningkatan [1]. Sumber lain penghasil PAH seperti limbah industri, kebakaran hutan, hasil pembakaran stasioner, dan asap rokok akan menambah kekhawatiran terhadap dampak bahaya dari paparan PAH terhadap kesehatan [2]. Salah satu bentuk PAH yang juga terdapat pada asap kendaraan bermotor adalah senyawa 7,12-dimetilbenz(a)antrasen (DMBA). DMBA akan dimetabolisme di hati oleh enzim sitokrom P450 dan *microsomal epoxide hydrolase* (mEH) menjadi metabolit yang lebih reaktif, yaitu DMBA-DE [3]. DMBA-DE ini merupakan radikal bebas yang dapat bereaksi dengan lipid, protein, dan DNA. Ikatan DMBA-DE dengan makromolekul tersebut akan menyebabkan kerusakan sel hati. Kerusakan hati yang terjadi ditingkat seluler tersebut dapat dilihat melalui gambaran histopatologi berupa fokal nekrosis dengan inti piknosis disertai infiltrasi sel radang, inti polimorfik, dan kongesti pembuluh darah hepatoporta serta dilatasi vena sentral [4, 5, 6].

Efek destruktif DMBA terhadap sel-sel hati dapat dicegah dengan antioksidan endogen yang ada. Namun, keterbatasan jumlah antioksidan endogen dalam tubuh dapat menyebabkan jumlah antioksidan endogen tidak sebanding dengan jumlah radikal bebas yang ada sehingga diperlukan antioksidan eksogen yang berperan sebagai agen hepatoprotektor terhadap kerusakan sel hati. Salah satu antioksidan eksogen yang dapat diteliti sebagai agen hepatoprotektor adalah brokoli.

Brokoli merupakan sayuran dengan bunga berwarna hijau yang termasuk dalam famili dari *Brassicaceae*. Brokoli mengandung senyawa bioaktif seperti beta karoten, vitamin C, E, dan A, karotenoid, dan polifenol terutama flavonoid yang merupakan antioksidan alami [7, 8]. Aktivitas antioksidan yang dimiliki brokoli tergolong sebagai antioksidan yang sangat kuat dengan nilai IC₅₀: 3,63 µg/ml [9]. Penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa ekstrak brokoli dosis 1000 mg/kgBB mampu menurunkan secara signifikan (p<0,05) kenaikan

enzim SGPT, SGOT, dan ALP yang diinduksi parasetamol [10]. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan perbedaan efek hepatoprotektif ekstrak etanol brokoli terhadap kerusakan histologis sel hati tikus yang diinduksi DMBA.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (*true experimental design*) dengan rancangan *post-test only control group design*. Penelitian ini telah mendapatkan perizinan *ethical clearance* dari komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember, Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, dan Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr. Soebandi Jember pada bulan Oktober sampai dengan Desember.

Ekstrak etanol brokoli diperoleh dengan cara mengekstraksi bunga brokoli dengan pelarut etanol 70% melalui metode maserasi. DMBA diperoleh dari *Sigma Aldrich* (USA) dan dilarutkan dalam *corn oil*. Sampel penelitian yaitu 30 ekor tikus wistar jantan umur 2-3 bulan, berat badan 100-200 gram, dan kondisi fisik sehat. Sampel kemudian dibagi menjadi 6 kelompok dengan teknik *random sampling*, masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor tikus. Kelompok kontrol normal (KN) dan kelompok kontrol positif (K+) diberi aquades secara per oral selama 7 hari; sedangkan kelompok perlakuan (P1, P2, P3, dan P4) masing-masing diberi ekstrak etanol brokoli dengan dosis 250 mg/kgBB, 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 2000 mg/kgBB secara per oral selama 7 hari. Pada hari ke-8, seluruh kelompok kecuali kelompok kontrol normal (KN) diinduksi DMBA 15 mg/kgBB dalam 1 ml *corn oil* secara per oral, *single dose*.

Sampel organ hati diambil pada hari ke-12 kemudian difiksasi dalam formalin 10% minimal selama 6 jam lalu dilakukan tahapan pembuatan preparat seperti dehidrasi dengan alkohol bertingkat, *clearing* dengan xylol, *embedding*, *sectioning*, *mounting*, dan *staining* dengan *Hematoxylin eosin*. Pengamatan dilakukan dengan menilai tingkat degenerasi dan nekrosis sel-sel hati pada seluruh lapang pandang dan diklasifikasikan ke dalam 6 kategori sebagai berikut:

- 0 : tidak terjadi kerusakan sel hati;
- 1 : < 25% sel-sel hati mengalami degenerasi ;
- 2 : 25% sampai 50% sel-sel hati mengalami degenerasi ;
- 3 : >50% sel-sel hati mengalami degenerasi dan atau < 25% sel-sel hati mengalami nekrosis;
- 4 : 25%-50% sel-sel hati mengalami nekrosis;
- 5 : > 50% sel-sel hati mengalami nekrosis.

Pengamatan dilakukan pada seluruh lapang pandang oleh ahli patologi anatomi dengan metode *blinding*. Data yang didapatkan dianalisis dengan uji *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan dengan uji Post hoc *Mann Whitney*.

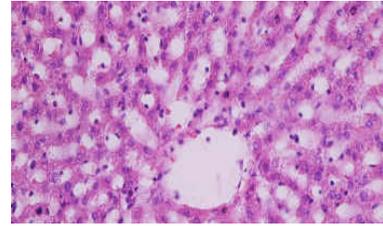
Hasil Penelitian

Berdasarkan hasil pengamatan, rata-rata kerusakan sel hati tikus pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada tabel 1.

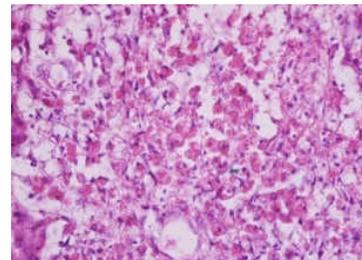
Tabel 1. Rata-rata kerusakan sel hati tikus

Kelompok	Rata-Rata Tingkat Kerusakan Sel Hati Tikus
Kontrol Normal	0,6
Kontrol Positif	3,4
P1	1,6
P2	0,8
P3	1,2
P4	1,4

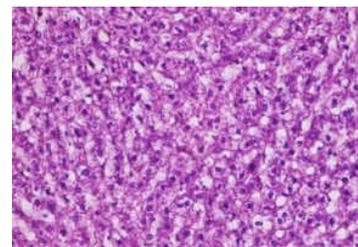
Hasil pengamatan sel hati tikus pada kelompok KN, K(+), P1, P2, P3, dan P4 pada perbesaran 400 kali dapat dilihat berturut-turut pada gambar 1 yang menunjukkan skor 0 dengan tidak ditemukannya kerusakan pada sel hati tikus, gambar 2 menunjukkan skor 5 dengan sel hati yang mengalami nekrosis lebih dari 50%, gambar 3 menunjukkan skor 3 dengan sel hati yang mengalami degenerasi lebih dari 50%, gambar 4 menunjukkan skor 0 dengan gambaran sel hati yang normal, gambar 5 dan 6 menunjukkan skor 1 dengan sel hati yang mengalami degenerasi kurang dari 25%.



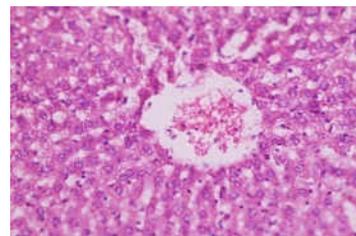
Gambar 1. Foto preparat hati tikus kelompok kontrol normal (perbesaran 400x). Tampak struktur jaringan hati yang tersusun dari lobulus dengan vena sentral dan *hepatocyte plate* yang teratur



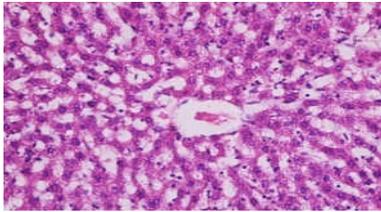
Gambar 2. Foto preparat hati tikus kelompok kontrol positif (perbesaran 400x). Tampak sel-sel hati mengalami nekrosis (kariolisis) dengan infiltrasi sel radang



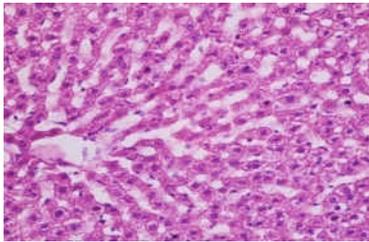
Gambar 3. Foto preparat hati tikus kelompok P1 (perbesaran 400x). Tampak lebih dari 50% sel-sel hati mengalami *blebbing*



Gambar 4. Foto preparat hati tikus kelompok P2 (perbesaran 400x). Tampak struktur jaringan hati yang tersusun dari lobulus dengan vena sentral dan *hepatocyte plate* yang teratur



Gambar 5. Foto preparat hati tikus kelompok P3 (perbesaran 400x). Tampak kurang dari 25% sel-sel hati mengalami *blebbing*



Gambar 6. Foto preparat hati tikus kelompok P4 (perbesaran 400x). Tampak kurang dari 25% sel-sel hati mengalami *blebbing*

Hasil uji analisis statistik dengan *Kruskal Wallis* didapatkan perbedaan yang signifikan dengan nilai $p = 0,008$, kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) pada kelompok K(+) dengan kelompok KN serta kelompok K(+) dengan kelompok P2, P3, dan P4.

Pembahasan

Pada kontrol positif terjadi peningkatan yang signifikan ($p < 0,05$) skor rata-rata kerusakan sel hati tikus dibandingkan dengan kelompok kontrol normal. Hal ini membuktikan bahwa pemberian DMBA dapat menyebabkan kerusakan histologis sel hati tikus. Pada kelompok kontrol positif ditemukan sel-sel hati yang mengalami nekrosis pada lebih dari 50% dalam seluruh lapang pandang. Pemberian DMBA dosis 15 mg/kgBB *single dose* per oral menunjukkan hasil yang sama dengan penelitian sebelumnya berupa gambaran nekrosis pada kerusakan sel hati tikus [6].

Nekrosis yang terjadi pada kelompok kontrol positif disebabkan oleh metabolit reaktif dari DMBA. DMBA yang masuk dalam tubuh akan dimetabolisme oleh hati dengan bantuan enzim sitokrom P450 dan enzim mEH menjadi senyawa yang lebih reaktif, yaitu DMBA-DE [3].

DMBA-DE dapat berikatan dengan membran sel sehingga terjadi peroksidasi lipid dan peningkatan permeabilitas membran sel. Adanya peningkatan permeabilitas membran sel akan menyebabkan terjadinya akumulasi ion Ca^{2+} di dalam sel. Akumulasi tersebut akan menyebabkan penurunan produksi ATP, aktivasi fosfolipase dan protease, dan kerusakan inti sel sehingga kerusakan membran sel semakin parah. Kerusakan yang berkelanjutan akan menyebabkan sel mengalami nekrosis [11].

Pada kelompok perlakuan didapatkan skor rata-rata kerusakan sel hati tikus yang lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Pada kelompok perlakuan 1 tidak didapatkan adanya penurunan signifikan tetapi penurunan signifikan skor rata-rata kerusakan sel hati tikus terhadap kontrol positif terjadi pada kelompok perlakuan 2, 3, dan 4. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol brokoli dosis 500 mg/KgBB, 1000 mg/KgBB, dan 2000 mg/KgBB mampu memberikan efek hepatoprotektif terhadap kerusakan sel hati tikus yang diinduksi DMBA tetapi belum memberikan efek hepatoprotektif pada dosis 250 mg/KgBB. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa pemberian ekstrak brokoli dosis tunggal 1000 mg/KgBB mampu memberikan efek hepatoprotektif terhadap kerusakan sel-sel hati yang diinduksi parasetamol [10]. Namun, pada pemberian dosis ekstrak brokoli yang lebih rendah, yaitu 500 mg/KgBB ternyata sudah mampu memberikan efek hepatoprotektif.

Brokoli memiliki efek hepatoprotektif karena mengandung senyawa seperti flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan. Kandungan flavonoid dalam ekstrak maserasi brokoli sebesar 43,67 $\mu\text{g/mL}$ dan memiliki nilai IC_{50} : 3,63 $\mu\text{g/mL}$ yang tergolong sebagai antioksidan yang sangat kuat [9]. DMBA-DE merupakan salah satu jenis oksidan yang mampu distabilkan oleh flavonoid. Flavonoid akan menstabilkan DMBA-DE dengan mendonorkan atom hidrogen dari gugus hidroksil sehingga toksisitas dari DMBA akan menurun dan peroksidasi lipid tidak akan terjadi [12]. Akhirnya kematian sel-sel hati akibat induksi DMBA dapat dicegah.

Pada kelompok perlakuan 3 dan 4 didapatkan adanya sel hati yang mengalami nekrosis dengan skor rata-rata kerusakan sel hati tikus yang lebih tinggi dari kelompok perlakuan 2 tetapi masih lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Faktor yang diduga menyebabkan hal tersebut

adalah efek toksik dan efek antiproliferatif yang dimiliki brokoli pada pemberian dosis tinggi. Brokoli mengandung senyawa aktif seperti flavonoid yang apabila kadarnya berlebih dapat menginduksi terbentuknya radikal bebas dengan mereduksi ion logam seperti Cu^{2+} menjadi Cu^+ dan Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} . Ion Cu^+ dan Fe^{2+} akan mengkatalisis pembentukan radikal hidroksil dari hidrogen peroksida yang dapat menyebabkan reaksi berantai radikal bebas yang bersifat merusak. Radikal hidroksil ini juga dapat menyebabkan kerusakan membran mitokondria sehingga mengaktifkan pelepasan sitokrom c yang berperan dalam proses apoptosis [13]. Selain memiliki efek toksik jika diberikan dalam dosis yang tinggi, brokoli juga dapat menginduksi proses apoptosis pada sel hati yang mengalami mutasi oleh karena DMBA. Sel-sel hati yang mengalami mutasi ditunjukkan dengan memadatnya kromatin inti. Sel-sel tersebut akan aktif membelah tetapi pembelahan tersebut dapat dicegah oleh flavonoid dengan mekanisme penghambatan aktivasi DNA topoisomerase II yang berperan dalam pembelahan sel dan mengaktifkan apoptosis sel sehingga sel-sel yang bermutasi yang aktif membelah akan mengalami kematian sel [13].

Simpulan dan Saran

Terdapat perbedaan efek hepatoprotektif ekstrak etanol brokoli terhadap kerusakan histologis sel hati tikus wistar yang diinduksi DMBA.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan mengisolasi senyawa aktif brokoli sehingga dimungkinkan penggunaan dosis yang lebih efektif, penelitian lebih lanjut mengenai dosis toksik ekstrak etanol brokoli, penelitian lebih lanjut mengenai pemanfaatan potensi ekstrak etanol brokoli sebagai anti-kanker terhadap induksi DMBA dalam dosis yang lebih tinggi, serta penelitian lebih lanjut mengenai aspek farmakokinetik dan farmakodinamik dari DMBA untuk mengetahui profil DMBA sebagai agen hepatotoksik.

Daftar Pustaka

[1] Ismiyanti, Marlita D, Saidah D. Pencemaran Udara Akibat Emisi Gas Buang Kendaraan Bermotor. *Jurnal Manajemen Transportasi & Logistik (JMTransLog)*. 2014; 01(03): 241-248.

[2] Zhang Y, Shu T. Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. *J. atmospheric environment*. 2009; 43: 812-819.

[3] Gao J, Lauer FT, Mitchaell LA, Burchiel SW. Microsomal epoxide hydrolase is required for DMBA (7,12-Dimethyl benz(a)anthracene)-induced immuno-toxicity in mice. *J. Toxicol Sci*. 2007; 98(1): 37-44.

[4] Rahardhian MRR, Mulyadi, Nurkhasanah. Efek Hepatoprotektif Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosella pada Tikus yang Diinduksi DMBA: Kajian Aktivitas SGPT, SGOT, ALP, dan Gambaran Histopatologi Hepar. Surabaya: Fakultas Pascasarjana Farmasi Universitas Ahmad Dahlan. 2014.

[5] Sharma V, Paliwal R. Chemo Protective Role of *Moringa oleifera* and Its Isolated Saponin Against DMBA Induced Tissue Damage in Male Mice: A Histopathological Analysis. *International Journal of Drug Development & Research*. 2014; 4(4): 215-228.

[6] Dakrory, Fahmy, Soliman, Mohamed, Amer. Protective and Curative Effects of the Sea Cucumber *Holothuria atra* Extract against DMBA-Induced Hepatorenal Diseases in Rats. *BioMed Research International*. 2015; 1-11.

[7] Faller ALK, Fialho E. The Antioxidant Capacity and Polyphenol content of Organic and Conventional Retail Vegetables after Domestic Cooking. *Food Res*. 2009; 42: 210-215.

[8] Monero, Perez, Ferreres, Gil-Izquierdo, Viguera. Acylated Anthocyanins in Broccoli Sprouts. *Food Chem*. 2010; 123: 358-363.

[9] Lutfita DR. Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Terhadap Kandungan Flavanoid Total dan Aktivitas Antioksidan Brokoli (*Brassica oleracea* L. cv. Group Broccoli). *Jurnal E-library UNISBA*. 2012; 25-33.

[10] Hashem, Motawea, El-Shabrawy, El-Sherbini, Shaker, Farrag. Hepatoprotective activity of *Brassica oleracea* L. var *italica*. *Egyptian Pharmaceutical Journal*. 2013; 12: 177-185.

[11] Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Buku Ajar Patologi Robbins*, 7th Edition. Jakarta : EGC. 2012.

[12] Ridho EA, Sari R, Wahdaningsih S. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Buah Lakum dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil). Universitas Tanjungpura: Program Studi Farmasi Fakultas

Kedokteran. 2013.
[13]Galati, O'brien PJ. Flavonoid and

Isoflavones (Phytoestrogens). Free Radical
Biology & Medicine. 2004; 37(3): 287-303.