

BAB IV

HASIL

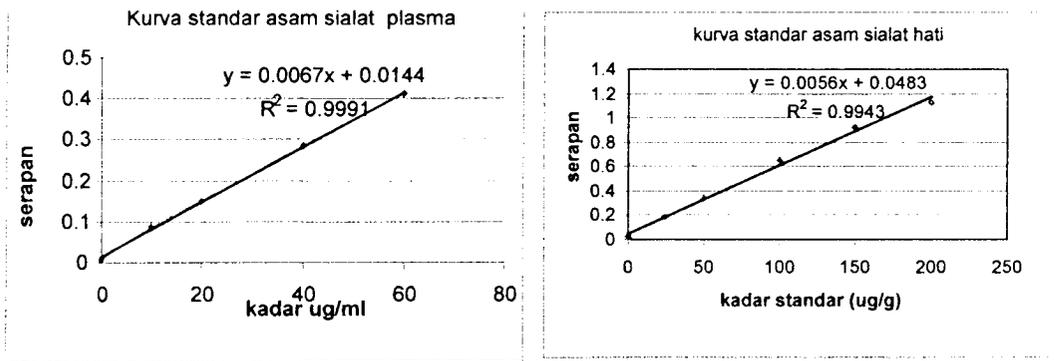
Telah dilakukan induksi karsinogenesis menggunakan FAA pada tikus (*Rattus norvergicus* L) selama 8 minggu. Penilaian pengaruh minyak buah merah terhadap induksi karsinogenesis tersebut dilakukan dengan memeriksa beberapa parameter yaitu: kadar asam sialat hati dan plasma, kadar proteasom hati dan plasma, kadar protein total, albumin, elektroforesis protein plasma, aktivitas GPT plasma dan gambaran histopatologis. Hasil-hasil tersebut akan disajikan dalam bentuk narasi dan grafik.

4.1. Pemeriksaan kadar asam sialat

Sumber asam sialat yang diperiksa pada penelitian ini ada 2 macam yaitu plasma dan jaringan hati. Sebelum diperiksa sampel hati dihomogenasi terlebih dahulu menggunakan *homogenizer*. Karena asam sialat terikat pada protein, maka untuk mendapatkan asam sialat bebas, sampel harus dihidrolis ringan terlebih dahulu menggunakan H_2SO_4 0,1 N. Pemeriksaan kadar asam sialat dilakukan menggunakan kurva standar asam sialat. Berhubung terdapat perbedaan rentang kadar asam sialat di hati dan plasma yang cukup jauh maka pada pemeriksaan ini digunakan 2 kurva asam sialat yaitu: kurva standar asam sialat plasma dan hati (gambar 11).

4.1.1 Kurva standar asam sialat

Pengukuran standar asam sialat plasma dilakukan pada standar dengan berbagai kadar yaitu 10, 20, 40, 60 dan 80 $\mu g/L$ yang menghasilkan suatu persamaan garis lurus yaitu $Y = 0,0067x + 0,0144$, dan koefisien regresi = 0,9991. Nilai koefisien regresi yang didapatkan cukup baik sehingga kurva ini dapat dijadikan acuan penentuan kadar asam sialat plasma. Selanjutnya kadar asam sialat di dalam sampel plasma dapat dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linear standar asam sialat seperti yang terlihat pada gambar 11.

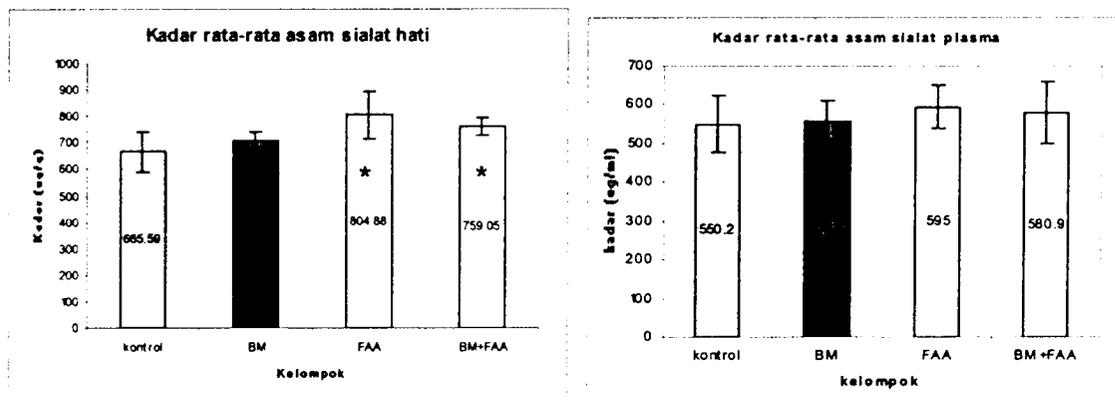


Gambar 11. Kurva standar asam sialat

Pada penelitian ini standar asam sialat hati dibuat juga dengan mengukur serapan asam sialat standar pada berbagai konsentrasi yaitu: 0, 25, 50, 100, 150 dan 200 ug/ml. Dari hasil pengukuran didapatkan persamaan garis lurus $Y = 0,0056X + 0,0483$ dengan nilai koefisien regresi 0.9943. Nilai koefisien regresi dinilai cukup memenuhi syarat sehingga persamaan regresi linear bisa digunakan sebagai standar untuk penentuan kadar asam sialat hati (gambar 11).

4.1.2. Penentuan kadar asam sialat

Pada pemeriksaan sampel plasma didapatkan kadar rata-rata asam sialat \pm SD ($\mu\text{g/mL}$) masing-masing kelompok perlakuan yaitu: kelompok kontrol = $550,2 \pm 72,6 \mu\text{g/mL}$, BM = $559,4 \pm 49,4 \mu\text{g/mL}$, FAA = $595 \pm 56,55 \mu\text{g/mL}$ dan BM+FAA = $580,9 \pm 80,8 \mu\text{g/mL}$. Pada uji normalitas (uji Kolmogorof-Smirnov) dan homogenitas (uji Lavenne *statistic*) didapatkan bahwa data ini normal dan homogen sehingga dapat langsung dilakukan uji Anova 1 arah. Hasil uji ANOVA 1 arah menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna diantara kelompok perlakuan ($p > 0,05$) sehingga tidak dilanjutkan dengan uji Tukey.



Gambar 12. Kadar rata-rata asam sialat plasma dan hati

Pada pemeriksaan kadar asam sialat hati didapatkan hasil Sebagai berikut: Kontrol = $647,9 \pm 69,8 \mu\text{g/g}$, BM = $710,53 \pm 29 \mu\text{g/g}$, FAA = $804,9 \pm 91,9 \mu\text{g/g}$, BM+FAA = $759 \pm 32,7 \mu\text{g/g}$ (lihat gambar 12). Dari data terlihat bahwa pada kelompok FAA terjadi peningkatan asam sialat hati yang cukup tinggi dibandingkan ketiga kelompok lain. Karena data yang didapatkan normal dan homogen maka dilanjutkan uji ANOVA 1 arah. Pada uji ANOVA terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan sehingga dilanjutkan dengan uji Tukey dengan hasil seperti terlihat pada tabel 8.

Tabel 8. Perbandingan asam sialat hati antar perlakuan (uji Tukey)

Kelompok yang diuji	Hasil
BM vs kontrol	TB
FAA vs kontrol	↑B
BM+FAA vs kontrol	↑B
BM+FAA vs FAA	TB
FAA vs BM	TB

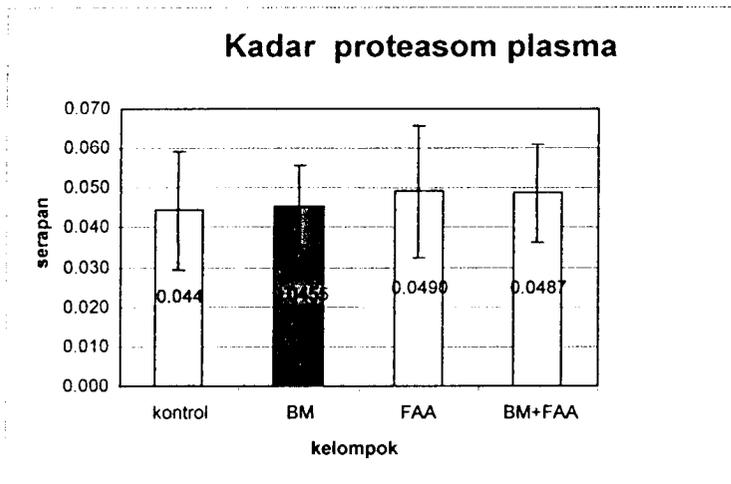
ket: B = bermakna $p < 0,05$, TB = tidak bermakna pada $p > 0,05$ ↓ = lebih rendah, ↑ = lebih tinggi

4.5. Pemeriksaan proteasom

Kadar proteasom yang diperiksa adalah kadar proteasom plasma dan jaringan hati. Pada pemeriksaan ini data yang didapatkan adalah nilai serapan proteasom. Dalam penelitian ini tidak dilakukan penentuan kadar proteasom yang sebenarnya karena tidak tersedianya standar murni proteasom. Meskipun pada penelitian ini hanya didapatkan nilai serapan, namun nilai ini (serapan) dianggap dapat mencerminkan kadar proteasom pada sampel yang diperiksa.

4.5.1 Penentuan kadar proteasom plasma

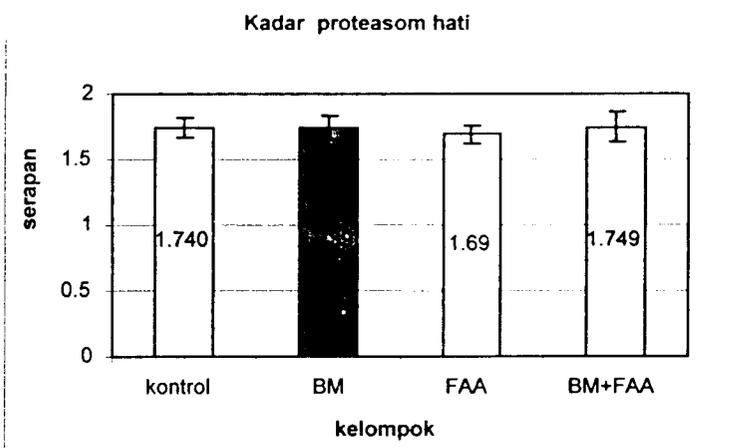
Pada pemeriksaan proteasom didapatkan nilai serapan rata-rata sebagai berikut: kontrol = $0,0443 \pm 0,014$; BM = $0,0456 \pm 0,01$; FAA = $0,049 \pm 0,016$; BM+FAA = $0,0487 \pm 0,012$ (gambar 13). Hasil yang didapatkan normal dan homogen sehingga dilanjutkan dengan uji anova 1 arah. Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok sehingga tidak dilanjutkan dengan uji Tukey.



Gambar 13. Kadar rata-rata proteasom plasma

Penentuan kadar proteasom hati

Pada pengukuran proteasom hati didapatkan hasil sebagai berikut: kelompok kontrol = $1,75 \pm 0,077$; kelompok BM = $1,72 \pm 0,09$; kelompok FAA = $1,69 \pm 0,074$; kelompok BM+FAA = $1,75 \pm 0,12$ (gambar 14). Data tersebar secara normal dan homogen. Pada pemeriksaan ANOVA 1 arah tidak ditemukan perbedaan yang bermakna antar keempat perlakuan.

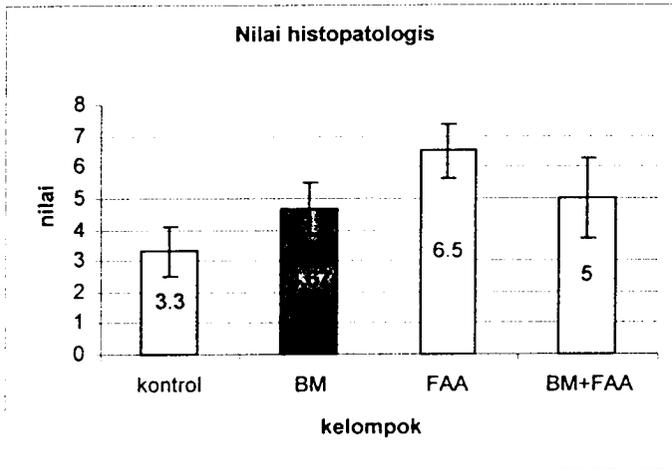


Gambar 14. Kadar rata-rata proteasom hati

4.6 Pemeriksaan derajat karsinogenesis secara histopatologis

Pada pemeriksaan sedian histopatologis jaringan hati tikus didapatkan skor rata-rata karsinogenesis hati tikus sebagai berikut: kelompok kontrol = $3,3 \pm 0,8$; kelompok BM = $4,67 \pm 0,8$; kelompok FAA = $6,5 \pm 0,83$; kelompok BM+FAA = $5 \pm 1,2$ (gambar 15). Bila data ini diinterpretasikan ke gambaran histopatologis maka didapatkan kelompok FAA mengalami premaligna ringan (gambar 20 dan 21), sedangkan ketiga

kelompok lain (kontrol, BM dan BM+FAA) masih dalam batas normal (gambar 18, 19 dan 22). Peningkatan nilai karsinogenesis ini disertai dengan peningkatan proliferasi sel oval dan sel radang pada kelompok tikus yang mendapatkan FAA (gambar 20 dan 21). Data pemeriksaan histopatologis ini adalah normal dan homogen sehingga dapat diuji lebih lanjut dengan ANOVA 1 arah.



Gambar 15 . Nilai histopatologis hati

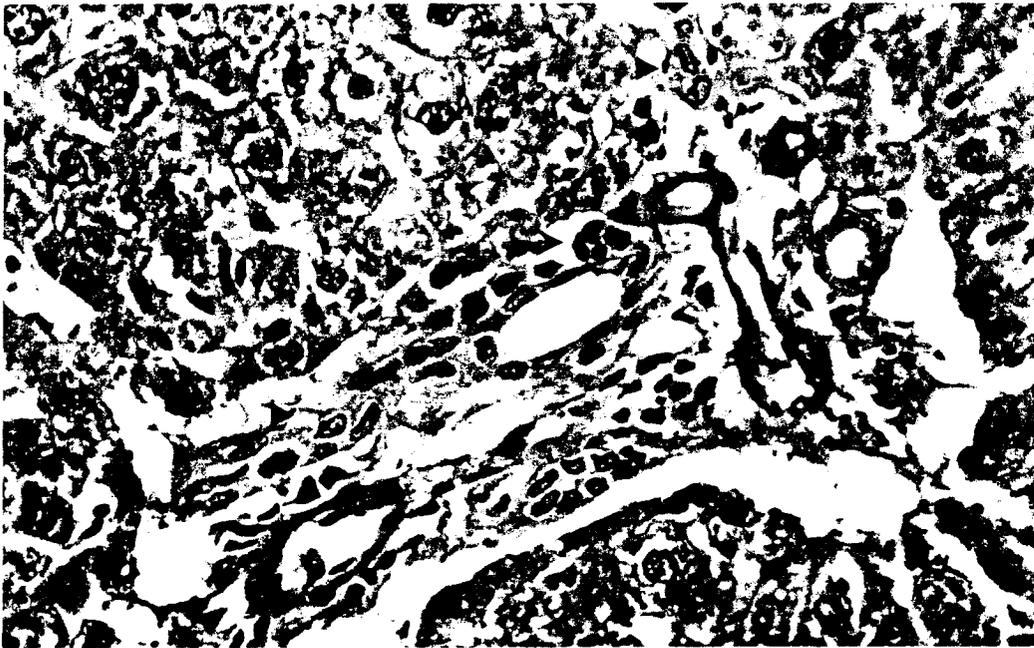
Pada uji ANOVA 1 arah didapatkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan sehingga dilanjutkan dengan uji Tukey. Pada uji Tukey di didapatkan hasil seperti ditampilkan pada tabel 9.

Tabel 9. Perbandingan rata-rata skor histopatologis antara kelompok perlakuan dengan uji Tukey

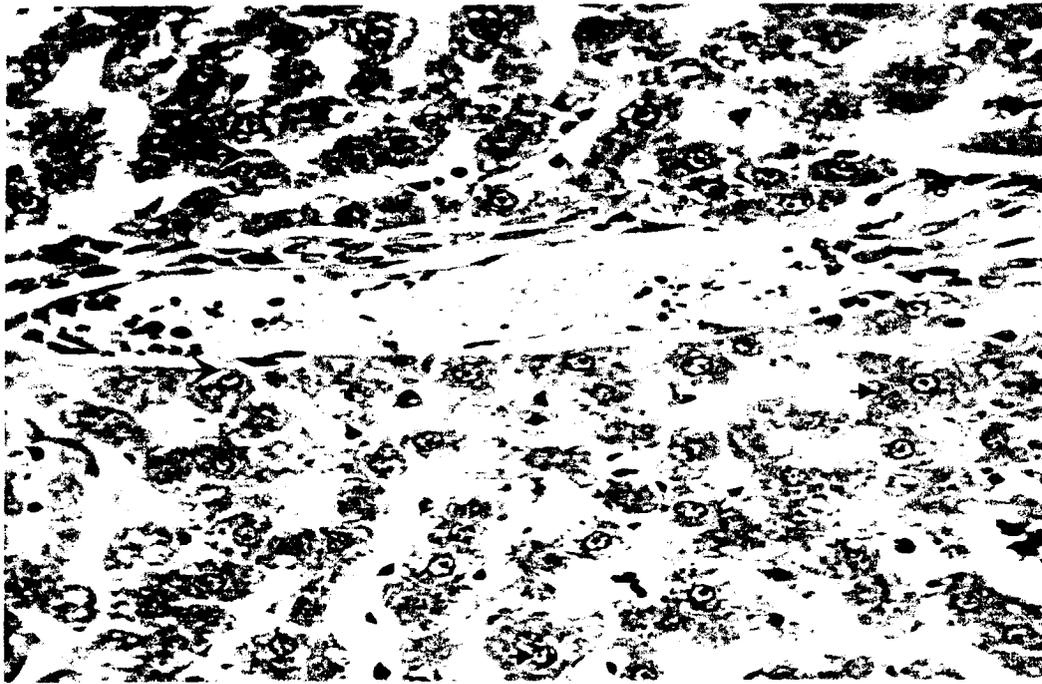
Kelompok yang diuji	Hasil
BM vs kontrol	TB
FAA vs kontrol	↑B
BM+FAA vs kontrol	TB
BM vs FAA	↓B
FAA vs BM+FAA	TB

Keterangan: TB = tidak bermakna, B = bermakna pada $p \leq 0,05$ ↓ = lebih rendah, ↑ = lebih tinggi

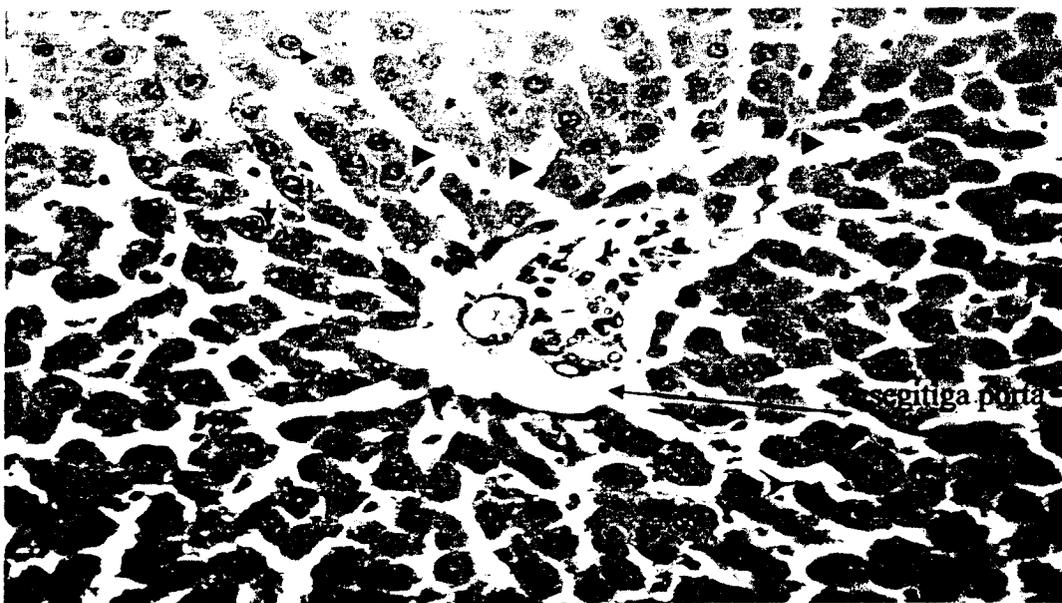
Meskipun skor histopatologis pada kelompok BM merah dan BM+FAA cukup baik namun terdapat hasil pemeriksaan yang mengherankan yaitu perubahan morfologi sel hati pada kedua kelompok tersebut. Perubahan tersebut adalah pembengkakan sel hati /hepatosit, yang menyebabkan sinusoid hati menjadi menyempit, sesuai dengan gambaran histopatologi hati pada keadaan degenerasi hidropik. Temuan ini menunjukkan adanya kerusakan dini pada sel hati.(gambar 19 dan 22)



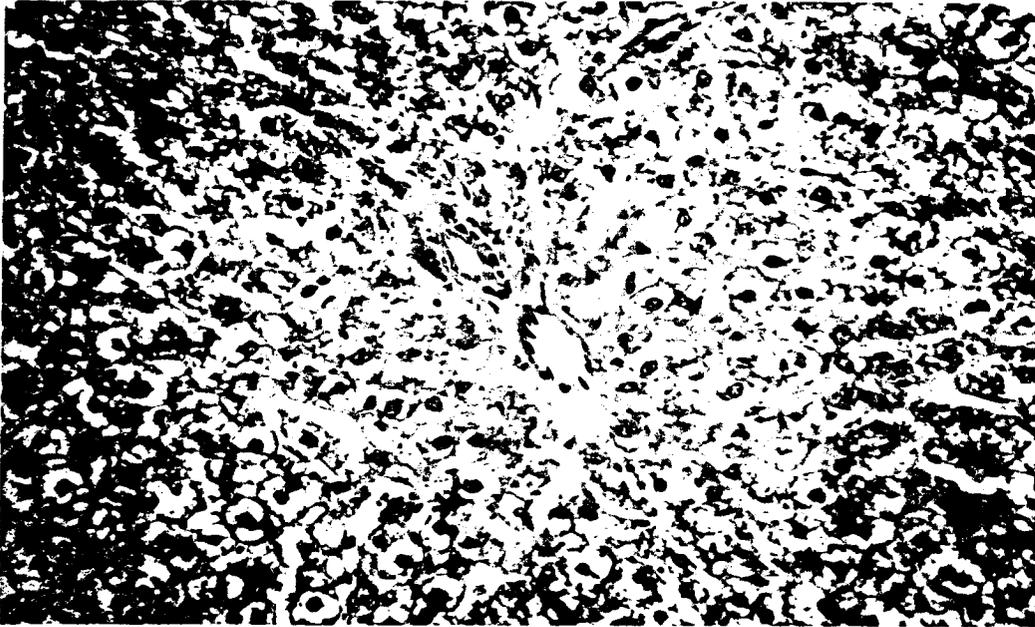
Gambar 16. Gambaran sel oval (▶) dan sel radang (→) (HE, 400X). Pada kelompok FAA. Sel radang berbentuk bulat dengan inti yang lebih padat atau berlobus. Sel oval bentuknya relatif oval, sitoplasma sedikit dan inti pucat.



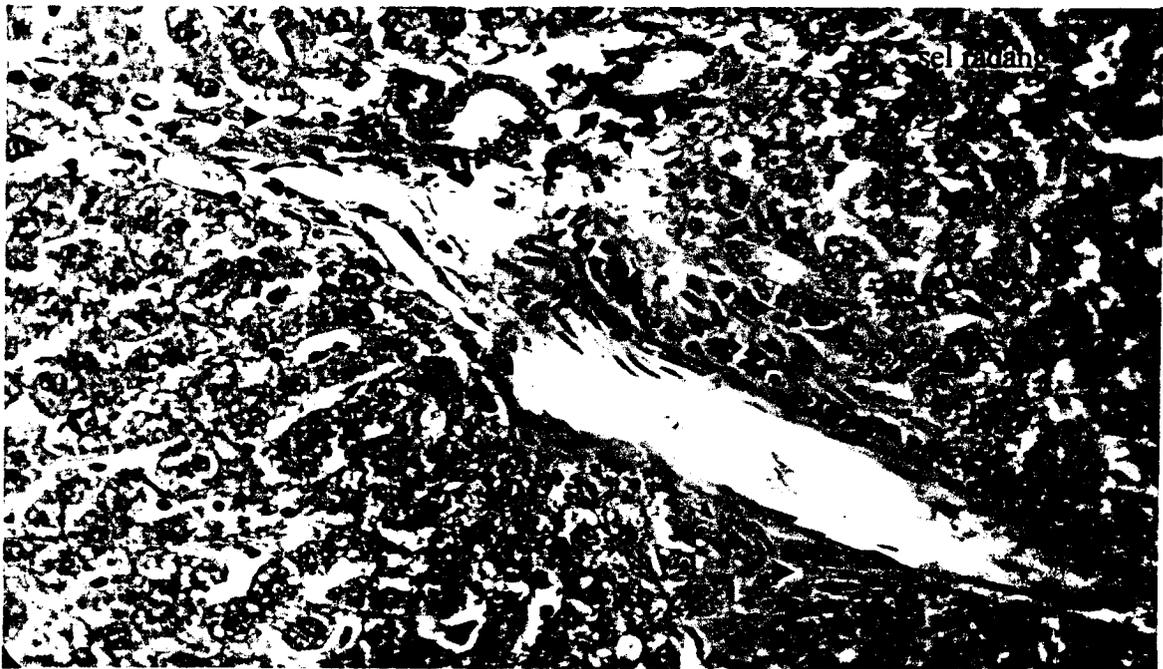
Gambar 17. Sel berinti dua (→) (HE,400X)



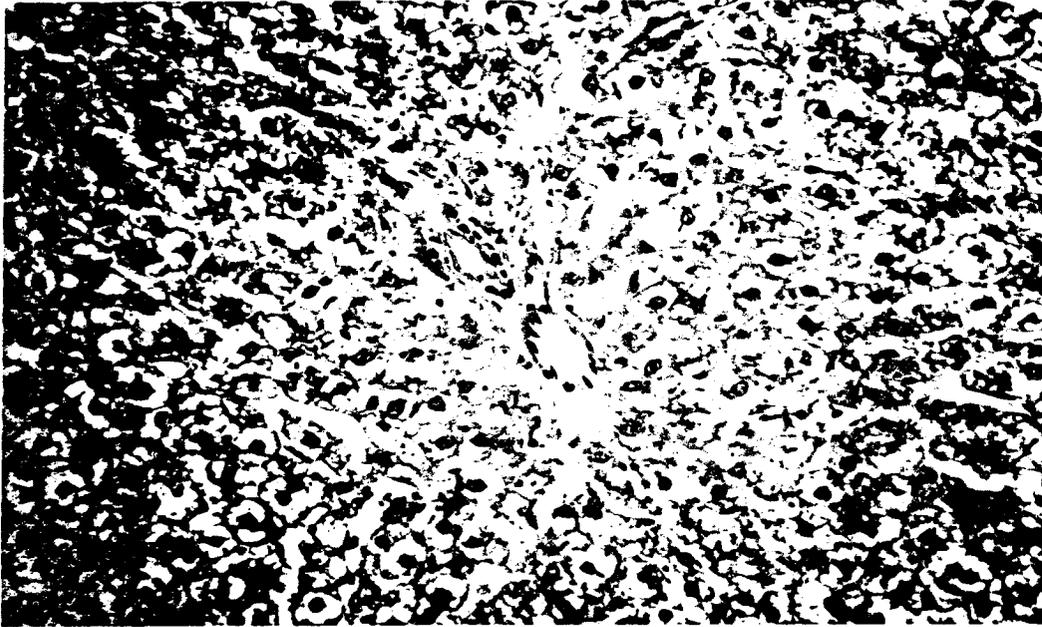
Gambar 18. Hati tikus pada kelompok kontrol. Sel-sel hepatosit (→) dengan inti dan sitoplasma normal, sel berukuran normal, struktur hati baik sinusoid (▶) normal. Mitosis dalam batas normal, tidak ditemukan pleomorfisme dan hiperkromasia inti (HE,400X)



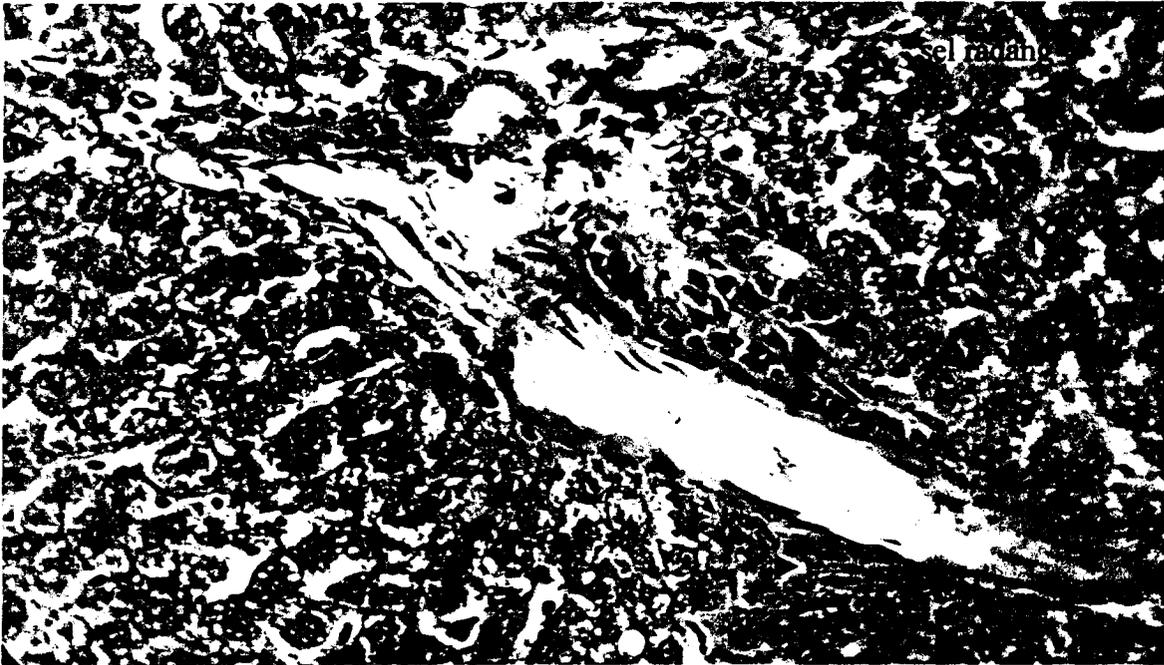
Gambar 19 Gambaran histopatologis kelompok buah merah (BM). Tidak ditemukan peningkatan mitosis, pleomorfisme dan hiperkromasia inti, serta nekrosis. Sel oval jarang dan tidak terjadi infiltrasi sel radang. Hepatosit mengalami degenerasi hidropik sehingga sinusoid menjadi tidak jelas.(HE,400X).



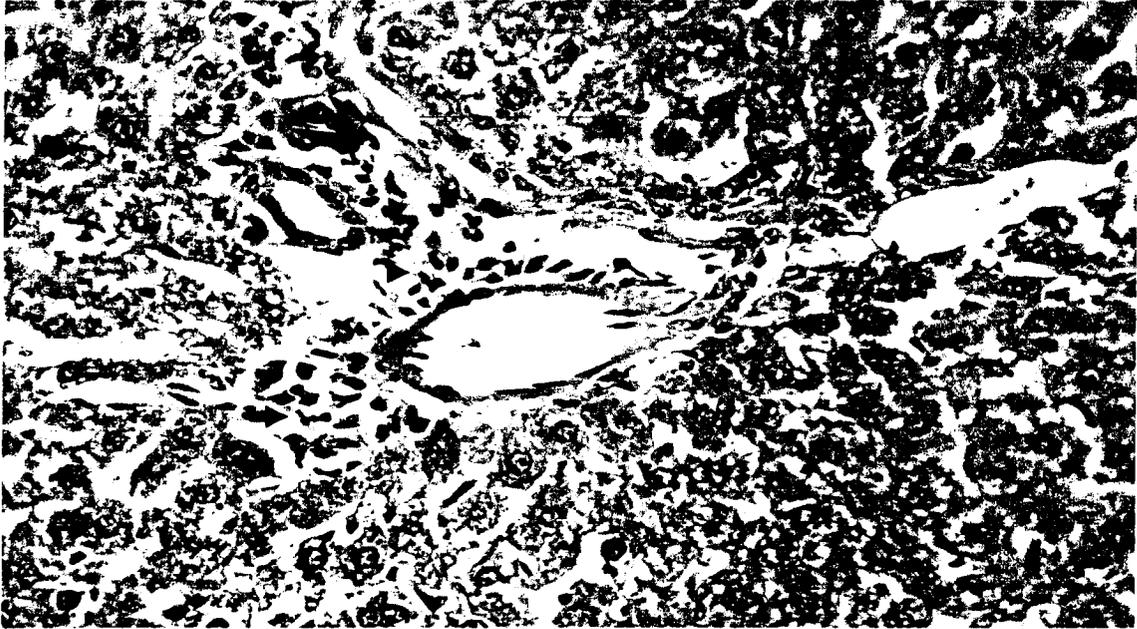
Gambar 20 Pada kelompok FAA (FAA) ditemukan proliferasi sel oval (▶) dan infiltrasi sel radang (♥) (HE 400X).



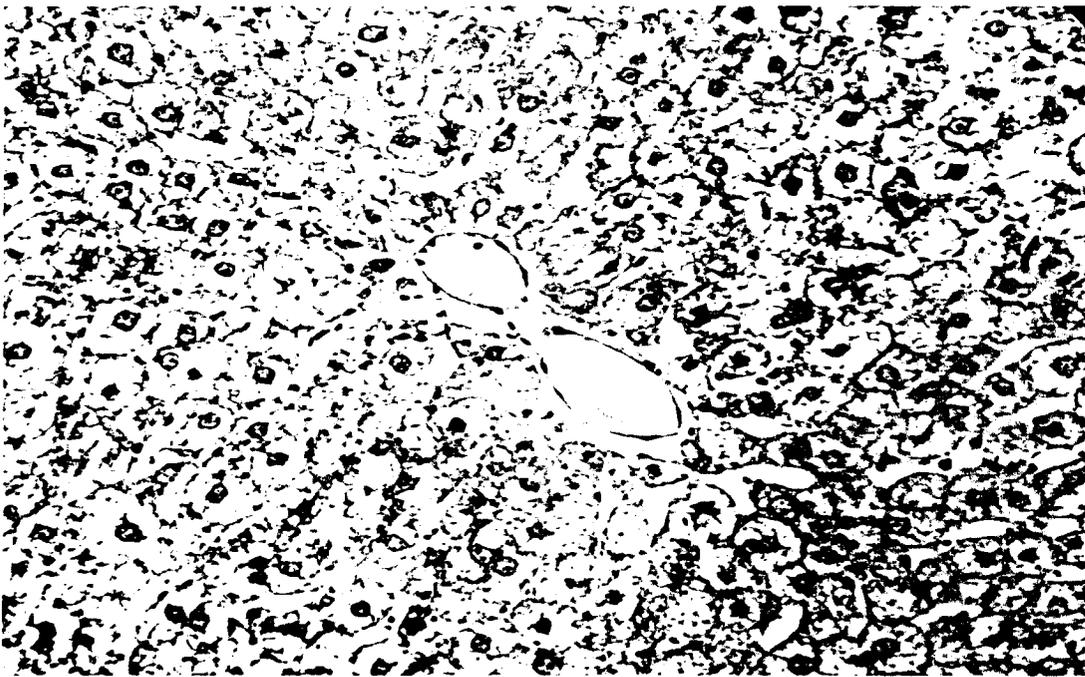
Gambar 19 Gambaran histopatologis kelompok buah merah (BM). Tidak ditemukan peningkatan mitosis, pleomorfisme dan hiperkromasia inti, serta nekrosis. Sel oval jarang dan tidak terjadi infiltrasi sel radang. Hepatosit mengalami degenerasi hidropik sehingga sinusoid menjadi tidak jelas.(HE,400X).



Gambar 20 Pada kelompok FAA (FAA) ditemukan proliferasi sel oval (▶) dan infiltrasi sel radang (♥) (HE 400X).



Gambar 21. Gambaran histopatologis pada kelompok FAA. Terlihat infiltrasi sel radang (▶) (HE,400X)



Gambar 22. Gambaran histopatologis hati tikus kelompok BM+FAA.. Ditemukan gambaran yang mirip kelompok BM yaitu terlihatnya gambaran degenerasi hidropik sedangkan tanda-tanda keganasan tidak ditemukan (HE, 400X)

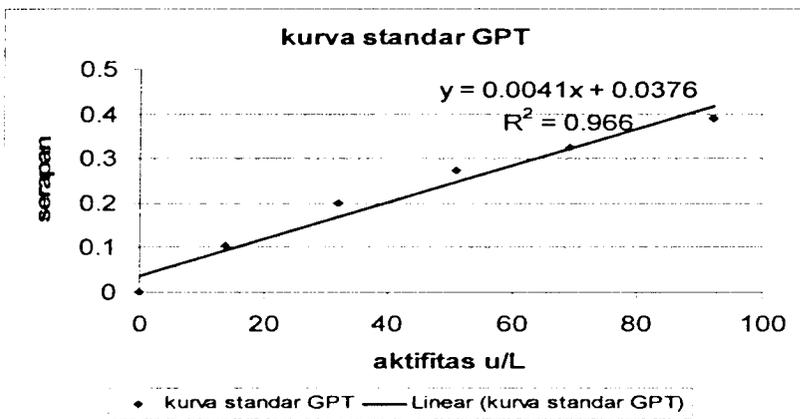
4.2. Aktivitas GPT plasma

Pada penelitian ini aktivitas GPT hanya diukur di plasma. Pengukuran ini ditujukan untuk menilai kerusakan sel hati tikus. Seperti telah diuraikan sebelumnya bahwa GPT adalah enzim yang banyak terdapat di dalam sel hati. Pada keadaan

normal aktivitasnya di plasma sangat rendah. Apabila terjadi gangguan integritas membran sel hati misalnya pada keadaan nekrosis, enzim ini akan tumpah ke dalam plasma sehingga menyebabkan peningkatan aktivitasnya di plasma.

4.2.1 Kurva standar GPT

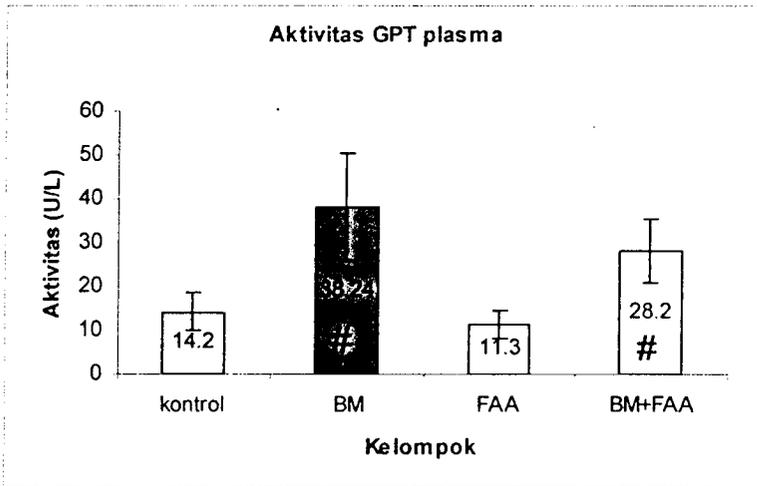
Pengukuran serapan standar GPT dilakukan pada berbagai tingkat aktivitas enzim yaitu: 0, 14, 32, 51, 69, 92 U/L. Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas standar GPT didapatkan persamaan garis lurus yaitu $Y = 0,0041x + 0,0376$ dengan nilai koefisien regresi 0,966. Nilai koefisien regresi tersebut cukup memenuhi syarat sebagai acuan penentuan aktivitas enzim dalam sampel plasma (gambar 23).



Gambar 23. Kurva standar GPT

4.2.2 Penentuan GPT plasma

Nilai aktivitas rata-rata GPT plasma (U/L) pada masing-masing kelompok adalah: kelompok kontrol = $14,14 \pm 4,26$ (U/L); kelompok BM = $38,24 \pm 12,3$ (U/L); kelompok FAA = $11,3 \pm 3,32$ (U/L); kelompok BM+FAA = $28,2 \pm 7,1$ (U/L). Gambar 24 memperlihatkan diagram batang aktivitas GPT. Data ini normal dan homogen sehingga dilanjutkan dengan uji ANOVA 1 arah. Dengan uji ANOVA 1 arah didapatkan bahwa terdapat perbedaan bermakna diantara kelompok perlakuan sehingga dapat dilanjutkan dengan uji Tukey (lihat tabel 10).



Gambar 24. Aktivitas rata-rata GPT plasma

Tabel 10. Perbandingan rata-rata aktivitas GPT plasma minggu ke 8 antar kelompok dengan uji Tukey

Kelompok yang diuji	Hasil
BM vs kontrol	↑ B
FAA vs kontrol	TB
BM+FAA vs kontrol	↑ B
BM vs FAA	↓ B
BM+FAA vs FAA	↓ B

Ket: TB = tidak bermakna ($p > 0,05$), B = bermakna ($p \leq 0,05$) ↓ = lebih rendah, ↑ = lebih tinggi

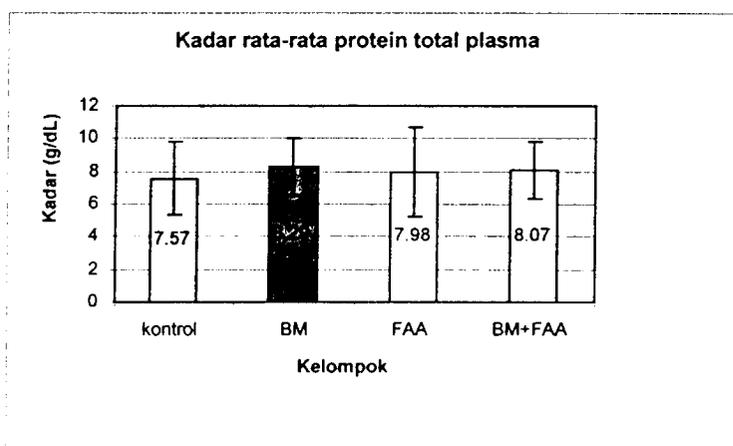
Dari hasil tersebut tampak bahwa aktivitas GPT pada kelompok FAA tidak berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol. Hasil yang mengherankan adalah pada kelompok BM dan kelompok BM+FAA ditemukan aktivitas GPT masing-masing kelompok ini lebih tinggi secara bermakna baik dibandingkan dengan kelompok kontrol maupun kelompok FAA.

4.3 Pengukuran kadar protein total, albumin plasma dan rasio albumin globulin

Pengukuran protein total dan albumin plasma dilakukan dengan menggunakan kit. kemudian dibandingkan dengan standar protein . Pada pemeriksaan ini hanya digunakan 1 standar yang telah diuji sebelumnya oleh perusahaan pembuat kit.

4.3.1 Pengukuran kadar protein total dengan cara Biuret

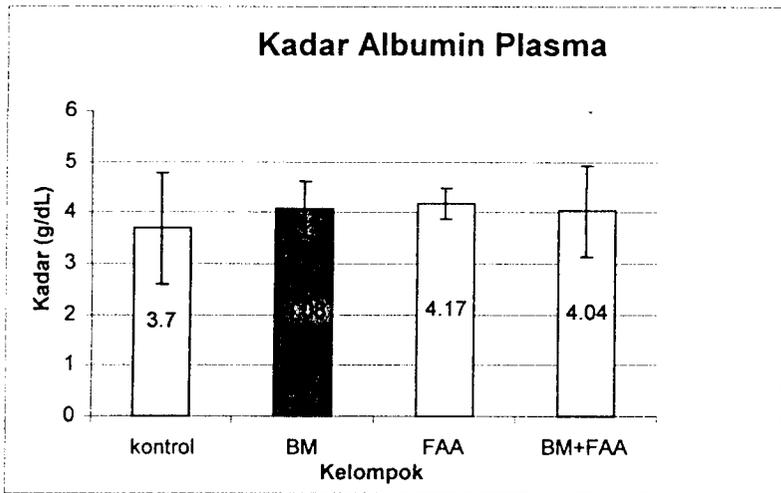
Pada pengukuran kadar protein total didapatkan nilai rata-rata \pm SD pada setiap kelompok perlakuan adalah sebagai berikut: kelompok kontrol = $7,6 \pm 2,2$ g/dL, kelompok BM = $8,3 \pm 1,7$ g/dL, kelompok FAA = $7,97 \pm 2,7$ g/dL, kelompok BM+FAA = $8,06 \pm 1,7$ g/dL (gambar 25). Data yang didapatkan pada pengukuran ini normal dan homogen. Pada uji ANOVA 1 arah didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok sehingga tidak dilakukan uji Tukey. Dapat disimpulkan kadar protein total rata-rata pada semua kelompok masih dalam batas normal (6,2 -8,5 g/dL).



Gambar 25. Kadar rata-rata protein total plasma

4.3.2 Pengukuran kadar Albumin plasma dengan cara brom cressol green (BCG)

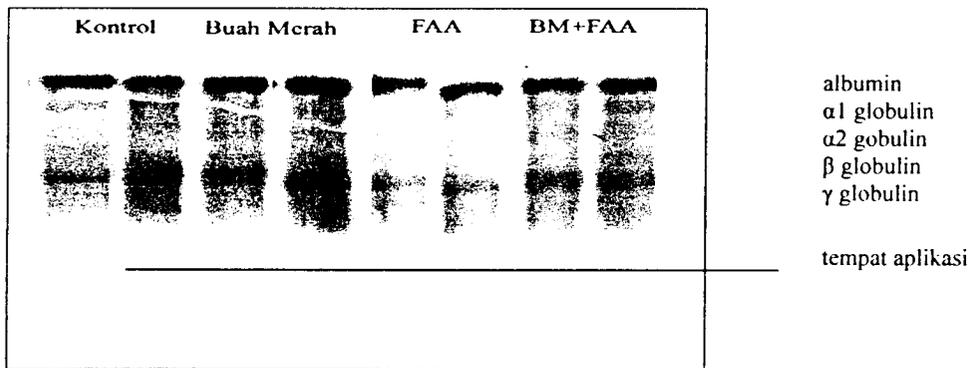
Hasil pemeriksaan albumin plasma rata-rata pada masing-masing kelompok perlakuan adalah sebagai berikut: kelompok kontrol = $3,7 \pm 1,1$ g/dL; BM = $4,1 \pm 0,53$ g/dL; kelompok FAA = $4,17 \pm 0,3$ g/dL; kelompok BM+FAA = $4,04 \pm 0,88$ g/dL (gambar 26). Hasil ini masih dalam batas normal yaitu 3,5-5,3 g/dL. Pada uji normalitas dan homogenitas didapatkan bahwa data homogen dan normal. Pada uji ANOVA 1 arah didapatkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna kadar albumin rata-rata antar kelompok sehingga tidak dilaksanakan uji Tukey.



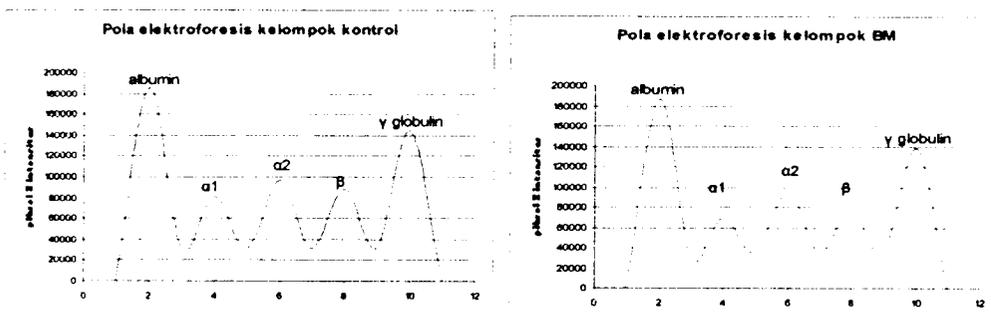
Gambar 26. Kadar rata-rata albumin plasma

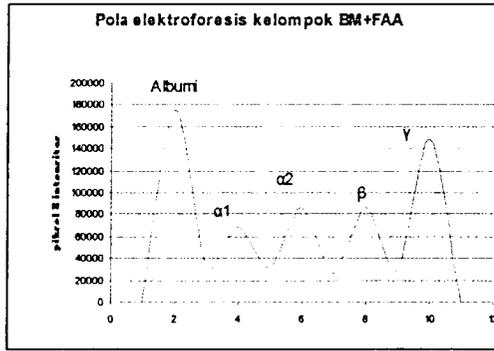
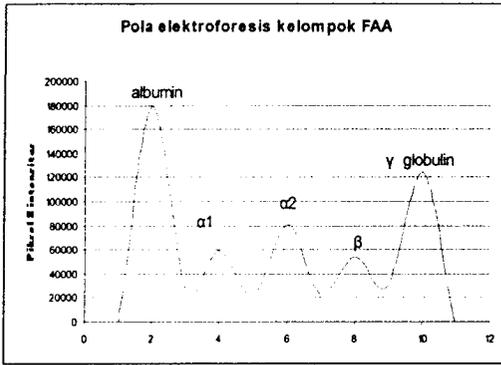
4.3. Pemeriksaan pola elektroforesis plasma

Pada elektroforesis didapatkan bahwa tidak ada fraksi protein yang hilang dan tidak ditemukan timbulnya fraksi protein baru (gambar 27). Pita-pita ini diukur intensitas dan luasnya dalam piksel. Nilai intensitas kemudian dikalikan dengan luas sehingga didapatkan suatu angka yang kemudian dapat ditampilkan menjadi suatu pola elektroforesis (gambar 28).



Gambar 27. Hasil elektroforesis protein plasma





Gambar 28. Pola elektroforesis protein plasma