

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penggunaan Natrium Benzoat sebagai bahan pengawet makanan dan minuman terhadap gambaran histologi hepar tikus putih. Natrium Benzoat diberikan dalam bentuk larutan dan diberikan per oral dengan tiga dosis yaitu 300 mg/kgBB, 600 mg/kgBB, dan 1200 mg/kgBB. Tolok ukur pengaruh penggunaan Natrium Benzoat dievaluasi berdasarkan derajat kerusakan sel dan banyaknya sel radang pada sel hepar yang diperiksa melalui pengamatan mikroskopis menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk pembuktian tentang pengaruh penggunaan Natrium Benzoat sebagai bahan pengawet makanan dan minuman terhadap kerusakan hepar.

A. Natrium Benzoat

Natrium Benzoat yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bahan kimia yang dijual bebas dan kami dapatkan di toko roti. Natrium Benzoat sering digunakan sebagai bahan pengawet pada makanan seperti roti. Selain itu bahan kimia ini juga sering ditambahkan pada minuman.

Penggunaan bahan pengawet terutama dilakukan untuk menghambat terjadinya kerusakan atau pembusukan makanan dan minuman, juga menghambat atau menghentikan aktivitas mikroba seperti bakteri. Natrium Benzoat dipilih karena bahan kimia ini adalah salah satu bahan dasar yang paling banyak

digunakan dalam pembuatan makanan atau minuman yang membutuhkan bahan pengawet dalam penyajiannya.

Natrium Benzoat sebagai bahan pengawet bisa mempunyai pengaruh terhadap kesehatan, zat ini dapat membuang sejumlah besar kalsium dalam tubuh. Selain itu zat ini juga berperan sebagai karsinogenik apalagi pada minuman dengan penambahan vitamin C (*ascorbic acid*), reaksi antara Natrium Benzoat dengan asam korbat ini akan membentuk suatu senyawa yaitu benzene yang merupakan karsinogenik bagi tubuh.

Untuk menjadi kanker, karsinogenik harus melalui serangkaian proses yang disebut karsinogenesis, jadi kanker bukan merupakan penyakit yang terjadi begitu saja melainkan timbul akibat akumulasi atau penumpukan kerusakan-kerusakan tertentu dalam tubuh. Semakin banyak atau semakin mengkonsumsi makanan atau minuman yang mengandung bahan pengawet, berarti tubuh mengumpulkan bahan-bahan karsinogenik yang nantinya akan menyebabkan kerusakan dalam tubuh dan dalam jangka waktu tertentu bisa saja menjadi kanker.

Dalam penelitian ini bukan untuk melihat pengaruh Natrium Benzoat terhadap terjadinya kanker, tapi disini bisa dilihat pengaruh Natrium Benzoat terhadap struktur histologis hati, dimana terjadi peradangan atau kerusakan sel akibat pemberian Natrium Benzoat. Bisa saja kondisi ini merupakan awal dari proses terbentuknya kanker mengingat Natrium Benzoat merupakan bahan karsinogenik atau pemicu kanker dan terbentuknya kanker itu sendiri merupakan proses yang membutuhkan waktu yang cukup lama dan bisa terjadi bila kondisi ini terus dibiarkan.

B. Uji pengaruh Natrium Benzoat terhadap gambaran histologi hepar

Sebelum diinduksi Natrium Benzoat semua tikus ditimbang terlebih dahulu berat badannya. Pengukuran berat badan ini bertujuan untuk mengelompokkan tikus tersebut ke dalam kelompok yang berbeda agar berat badan dari masing-masing kelompok merata, walaupun memiliki berat badan yang tidak sama persis. Dalam pemberian dosis untuk tiap kelompok diberikan dengan menyesuaikan antara berat badan dan jumlah dosis yang diberikan, dalam hal ini tikus dengan berat badan lebih rendah diberikan dosis dengan jumlah yang kecil, sebaliknya tikus dengan berat badan yang lebih besar diberikan dosis Natrium Benzoat yang lebih besar. Hal ini dilakukan berdasarkan kesesuaian pemberian zat berdasar rasio konsentrasi zat : plasma. Semakin banyak kandungan plasma dalam tubuh, maka semakin besar pula dosis zat yang dibutuhkan (Katzung, 2002). Dengan demikian keefektifan pemberian Natrium Benzoat untuk menghasilkan kerusakan hepar pada masing-masing tikus adalah setara.

Pemberian dosis yang berbeda untuk tiap kelompok dimaksudkan agar diketahui dosis mana yang memberikan efek hepatotoksik dan berapa dosis maksimal pemberian Natrium Benzoat yang aman dan tidak memberikan efek hepatotoksik.

Sebelum tikus diinduksi Natrium Benzoat dengan dosis yang telah ditentukan, tikus tersebut diaklimatisasi selama 7 hari. Hal ini dimaksudkan agar tikus tersebut beradaptasi dahulu dengan kandang dan pakannya. Setelah itu, tikus dipuaskan selama 1 hari, kemudian diberi Natrium Benzoat dengan cara disonde dengan berbagai dosis yang telah ditentukan sesuai dengan kelompoknya,

pemberian Natrium Benzoat ini dilakukan setiap hari selama 30 hari. Sebelum Natrium Benzoat diberikan pada tikus, terlebih dahulu dilarutkan dengan aquades dan dicampur agar homogen.

Untuk penilaian pertumbuhan tikus, maka tikus diukur berat badannya setiap minggu, selain itu dilakukan penggantian kandang agar kondisi tikus selalu dalam keadaan bersih sehingga akan memperlancar jalannya penelitian, karena bila ada tikus yang terkena penyakit atau mati akan mengganggu dalam pengambilan datanya, apalagi bila dalam jumlah yang banyak. Sedangkan untuk pakan dan minum diberikan setiap hari. Pada penelitian ini semua sampel bisa bertahan hidup sampai batas yang telah ditentukan, yaitu selama 30 hari dalam kondisi baik.

Pada hari ke-31 setelah pemaparan ekstrak terakhir, tikus dibunuh secara anestesi dengan menggunakan eter, kemudian dibedah untuk diambil hatinya, difiksasi dengan formalin 10% agar organ tidak rusak, dan dibuat preparat histologinya dengan menggunakan pengecatan Hematoksilin dan Eosin (HE). Pengecatan HE dipilih karena paling banyak digunakan untuk pengecatan histologi. Selain itu keunggulan yang dimiliki oleh pengecatan HE adalah karena tidak hanya bisa menampilkan berbagai unsur jaringan, tetapi juga bisa menunjukkan sifat kimiawi dari jaringan yang diamati (Kelley *et al.*, 1998).

Setelah dibuat preparat selanjutnya dilakukan pengamatan dengan mikroskop. Hasil pengamatan terhadap hati menunjukkan gambaran histologis yang berbeda pada tiap kelompok yang diberi dosis berbeda. Dalam hal pengamatan mikroskopis, yang dinilai adalah derajat kerusakan dan peradangan.

Menurut Michael dan Wang terdapat standar penilaian untuk derajat kerusakan dan derajat peradangan, yaitu seperti yang terlihat pada tabel 1 dan 2 :

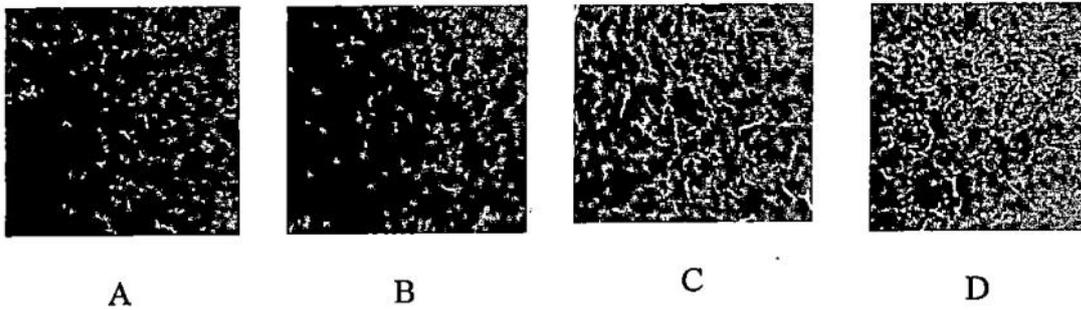
Tabel 1. Standar Perhitungan Derajat Kerusakan Sel

Derajat kerusakan sel	Jumlah kerusakan (dalam %)
0	< 1
1	1 - 5
2	6 - 25
3	26 - 50
4	> 50

Tabel 2. Standar Perhitungan Derajat Peradangan

Derajat peradangan	Jumlah sel radang
0	0
1	1 - 2
2	3 - 5
3	> 5

Gambaran histologi dilihat dengan mengamati keadaan sel hepar menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Masing-masing preparat dilihat dalam 10 lapang pandang. Bagian yang diamati adalah derajat kerusakan sel hepar dan derajat peradangan. Hasil pengamatan histologi hepar dapat dilihat di Gambar 4.



Gambar 4. Histologi hati tikus

(A=kontrol negatif, B=Na Benzoat 300 mg/kgBB, C=Na Benzoat 600 mg/kgBB, D=Na Benzoat 1200 mg/kgBB)

Secara histologis ada perbedaan yang cukup mencolok dari masing-masing kelompok. Pada kelompok kontrol negatif (gambar 4.A), tampak gambaran normal dari struktur histologi hepar. Sel hepar (hepatosit) tersusun radier dan berkelompok membentuk lempeng-lempeng saling berhubungan, dimana kumpulan dari banyaknya lempeng sel disebut lobulus hepar (Kelley *et al.*, 1998). Tiap lempengan hepatica biasanya mempunyai tebal dua sel dan antara sel-sel yang berdekatan terletak kanalikulis biliaris yang kecil. Hepatosit sendiri dipisahkan oleh sinusoid yang tersusun melingkari eferen vena hepatica dan duktus hepaticus. Pada gambaran normal, ruang antar sinusoid tersusun rapat (Amirudin, 2006).

Sementara pada sel yang mengalami kerusakan seperti pada kelompok perlakuan (gambar 4.B, 4.C, dan 4.D) tampak adanya kerusakan pada inti sel. Menurut Robbins dan Kumar ada 3 kerusakan utama pada inti sel hepar:

1. Inti piknosis

→ ukuran inti sel menjadi lebih kecil, padat, dan mengalami penebalan karena terjadinya degenerasi sel.

2. Inti karyoreksis

→ inti sel pecah, kromatin hancur menjadi granul-granul yang tak berbentuk yang dikeluarkan dari dalam sel.

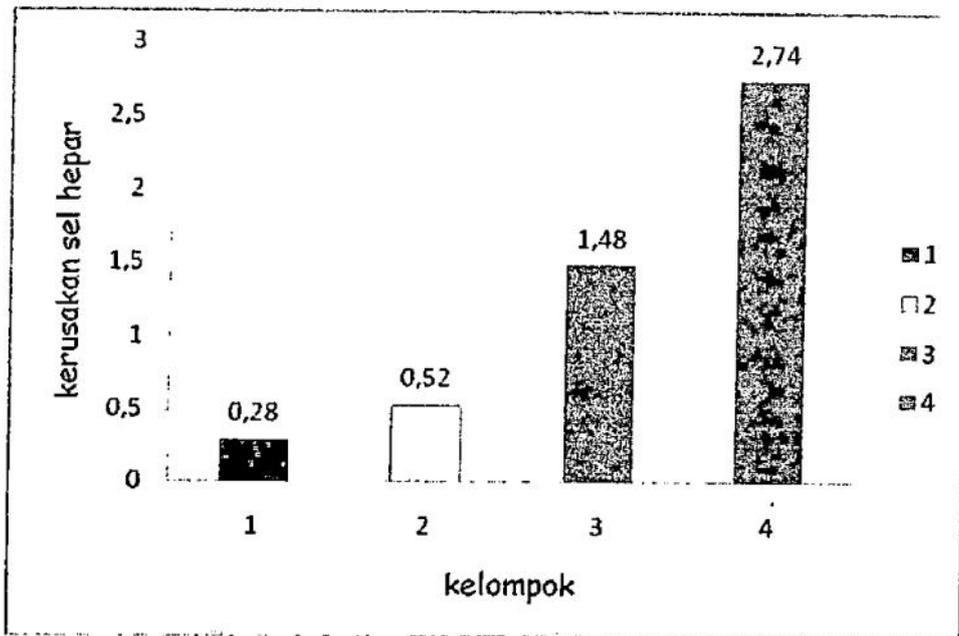
3. Inti karyolisis

→ inti sel membengkak dan selanjutnya kehilangan kromatinnya.

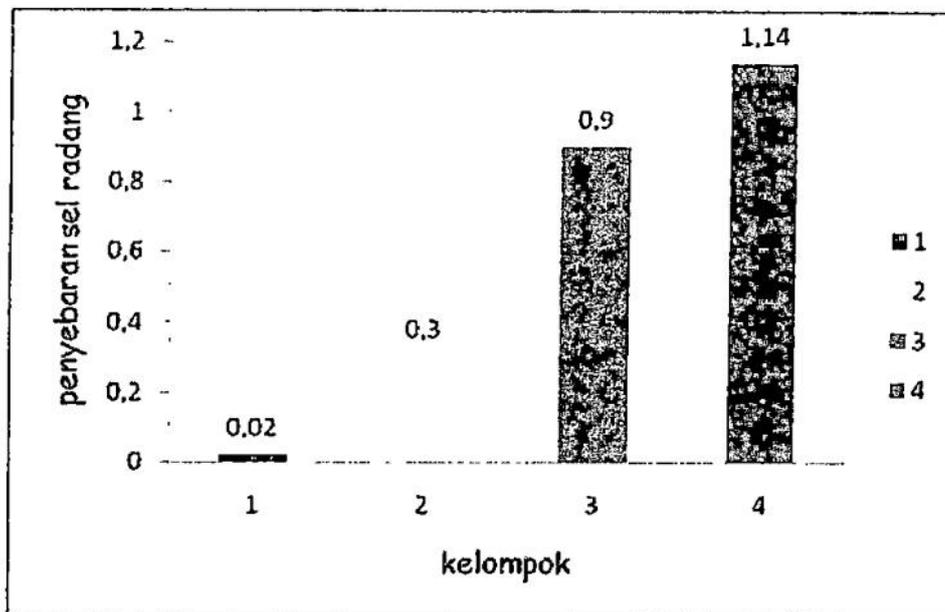
Selain itu, ruang-ruang antar sinusoid yang merenggang pada kelompok perlakuan menunjukkan bahwa telah terjadi kerusakan pada sel hepar. Bila dilihat dengan menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 40x, ditemukan adanya sel-sel peradangan, baik sel mononuklear (monosit/makrofag) maupun polimorfonuklear (netrofil segmen).

Dari masing-masing kelompok perlakuan yang diberikan Natrium Benzoat dengan yang dosis yang berbeda, terdapat perbedaan gambaran histologis yang berbeda pula. Hal ini menunjukkan tingkat keefektifan Natrium Benzoat dalam menyebabkan kerusakan hepar. Dosis 1200 mg/kgBB memperlihatkan gambaran kerusakan hepar yang paling parah, sehingga dinilai memiliki keefektifan yang paling besar untuk merusak hepar.

Hasil perhitungan derajat peradangan dan kerusakan hepar dari tiap kelompok dapat dilihat pada Gambar 5 dan 6.



Gambar 5. Histogram derajat kerusakan sel hepar



Gambar 6. Histogram penyebaran sel radang

Dari diagram tersebut dapat diketahui bahwa ada peningkatan nilai kerusakan hepar dan penyebaran sel radang antara kelompok 2 (dosis 300 mg/kgBB), 3 (dosis 600mg/kgBB), dan kelompok 4 (dosis 1200mg/kgBB). Hal

ini memperlihatkan bahwa pemberian Natrium Benzoat dengan dosis yang lebih besar akan memberikan nilai yang lebih besar pula, artinya pemberian Natrium benzoat dengan dosis yang lebih besar akan menghasilkan kerusakan yang lebih berat pada hepar.

Hasil penelitian kemudian diuji dengan menggunakan *Kruskall Wallis*, metode ini digunakan untuk menguji pengaruh antara variabel independent terhadap variabel dependent, dalam penelitian ini Natrium Benzoat sebagai variabel independent dan histologi hati sebagai variabel dependent. Setelah dianalisis menggunakan *Kruskall Wallis*, analisis data dilanjutkan menggunakan metode *Mann Whitney* yang akan memperlihatkan perbedaan dari masing-masing kelompok yang diberi perlakuan yang berbeda-beda. Dalam penentuan hasil penilaian terhadap hasil suatu penelitian bisa dinilai dari dua aspek yang berbeda, yaitu dari aspek klinis dan dari aspek statistik. Tidak semua hasil secara statistik signifikan atau bermakna akan menunjukkan hasil yang signifikan atau bermakna juga secara klinis. Ataupun sebaliknya tidak semua hasil yang diperoleh signifikan secara klinis tapi tidak bermakna secara statistik.

Hasil pengujian statistik penelitian ini dapat dilihat pada tabel 3 yang menunjukkan hasil perhitungan derajat kerusakan sel dan hasil perhitungan derajat peradangan.

Tabel 3. Hasil perhitungan derajat kerusakan sel dan derajat peradangan

NO	KELOMPOK	DERAJAT KERUSAKAN SEL	DERAJAT PERADANGAN
1	Kontrol tanpa perlakuan	$0,28 \pm 0,454^a$	$0,02 \pm 0,141^a$
2	Na Benzoat dosis 300 mg/kgBB	$0,52 \pm 0,505^b$	$0,30 \pm 0,463^b$
3	Na Benzoat dosis 600 mg/kgBB	$1,48 \pm 0,614^c$	$0,90 \pm 0,544^c$
4	Na Benzoat dosis 1200 mg/kgBB	$2,74 \pm 1,006^d$	$1,14 \pm 0,670^d$

Keterangan: angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)

Pada tabel 3 dapat diketahui bahwa perbedaan signifikansi ditunjukkan dengan perbedaan huruf. Artinya, hasil berupa angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda secara signifikan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat angka yang diikuti dengan huruf yang sama, berarti ada perbedaan derajat kerusakan sel dan derajat peradangan yang signifikan pada masing-masing kelompok, baik pada kelompok kontrol tanpa perlakuan maupun pada tiap kelompok perlakuan yang diberi Natrium Benzoat dengan dosis yang berbeda. Dengan demikian, pemberian Natrium Benzoat dengan dosis yang lebih besar memberikan pengaruh yang signifikan, baik terhadap perusakan sel hepar

maupun pada derajat peradangan, yang ditandai dengan semakin besarnya nilai derajat kerusakan hepar dan nilai derajat peradangan pada kelompok yang diberi Natrium Benzoat dengan dosis yang lebih besar. Hal ini sesuai dengan hasil pengamatan secara mikroskopis, karena dari hasil pengamatan menunjukkan adanya perbedaan dari tiap-tiap kelompok yang diberi dosis berbeda dalam hal pemberian Natrium Benzoat, dimana pemberian Natrium Benzoat dengan dosis yang lebih besar memperlihatkan kerusakan sel hepar yang lebih parah.

Dengan demikian, dari hasil penelitian yang ditunjukkan dengan gambaran histologi hepar, penilaian derajat kerusakan sel, dan penilaian derajat peradangan, dapat dibuktikan bahwa semakin besar dosis Natrium Benzoat yang diberikan, maka akan semakin besar pula kerusakan sel hepar yang akan ditimbulkan.

Penggunaan bahan pengawet terutama dilakukan untuk menghambat terjadinya kerusakan atau pembusukan makanan dan minuman, juga menghambat atau menghentikan aktivitas mikroba seperti bakteri, sehingga diharapkan dapat terpelihara keseegarannya dan aman dikonsumsi oleh tubuh, karena bila dalam makanan atau minuman terdapat bakteri bisa menyebabkan keracunan (Sriatimah, tanpa tahun; Ngili, tanpa tahun). Namun demikian, Natrium Benzoat sebagai bahan pengawet bisa mempunyai pengaruh terhadap kesehatan, karena zat ini dapat membuang sejumlah besar kalsium dalam tubuh. Selain itu zat ini juga berperan sebagai karsinogenik apalagi pada minuman dengan penambahan vitamin C (*ascorbic acid*), reaksi antara Natrium Benzoat dengan asam askorbat ini akan membentuk suatu senyawa yaitu benzene yang merupakan karsinogenik bagi tubuh.

Untuk menjadi kanker, karsinogenik harus melalui serangkaian proses yang disebut karsinogenesis, jadi kanker bukan merupakan penyakit yang terjadi begitu saja melainkan timbul akibat akumulasi atau penumpukan kerusakan-kerusakan tertentu dalam tubuh semakin banyak atau semakin mengkonsumsi makanan atau minuman yang mengandung bahan pengawet, berarti tubuh mengumpulkan bahan-bahan karsinogenik yang nantinya dapat menyebabkan kerusakan dalam tubuh dan dalam jangka waktu tertentu bisa saja menjadi kanker.

Hepatosit memiliki banyak retikulum endoplasma kasar dan licin. Dalam endoplasma kasar membentuk kelompok tersebar dalam sitoplasma, disebut badan basofilik. Sedangkan pada retikulum endoplasma halus yang tersebar secara difus di dalam sitoplasma terjadi beberapa proses penting. Organel ini berfungsi untuk proses konjugasi, dimana berbagai substansi terikat pada sulfat glukuronida selama inaktivasi atau detoksifikasinya sebelum dikeluarkan dari tubuh. Salah satu proses yang utama yang terjadi dalam retikulum endoplasma licin ialah konjugasi dari bilirubin toksik hidrofobik oleh glukuroniltransferase untuk membentuk bilirubin glukuronida non-toksik yang larut dalam air. Konjugat ini diekskresi oleh hepatosit ke dalam empedu. Retikulum endoplasma licin dari hepatosit adalah sistem labil yang bereaksi terhadap perubahan dalam lingkungan. Berbagai obat dan substansi lain dalam hal ini Natrium benzoat dinonaktifkan oleh oksidasi, metilasi atau konjugasi yang gterjadi pada retikulum endoplasma licin dengan bantuan enzim yang berperan dalam proses ini adalah glukuroniltransferase sehingga kerusakan akibat zat toksik dapat dihindari.

Hati memiliki kemampuan regenerasi yang luar biasa ketika mengalami kerusakan, meskipun butuh waktu yang lambat. Hilangnya jaringan hati akibat substansi toksik memicu mekanisme yang merangsang sel-sel hati untuk membelah, sampai maseka jaringan aslinya pulih kembali. Pada tikus, hati dapat memulihkan kehilangan sampai 75% beratnya dalam waktu 1 bulan, sedangkan pada manusia kemampuan ini berkurang banyak. Proses regenerasi dikendalikan oleh substansi yang beredar disebut khalon, yang menghambat pembelahan mitosis jenis sel tertentu. Bila jaringan cedera atau dihilangkan sebagian, jumlah khalon yang dihasilkan akan menurun akibat aktivasi mitotik meningkat dalam jaringan ini. Dengan berlangsungnya regenerasi, maka jumlah khalon yang dihasilkan akan bertambah dan aktivitas mitotik akan berkurang.

Jaringan hati yang di regenerasi umumnya serupa dengan jaringan yang hilang tetapi bila kerusakan itu berulang-ulang, terus menerus atau dalam jumlah yang besar pada organ ini, maka terbentuk banyak jaringan ikat bersama regenerasi sel hati. Kelebihan jaringan ikat ini berakibat kacaunya struktur hati, atau keadaan yang dikenal dengan sirosis. Fungsi hati terganggu dalam keadaan ini, karena jaringan parut (kolagen) tidak hanya mengambil tempat hepatosit fungsional tetapi juga mengacaukan sistem vascular hati dan sistem saluran empedu.