

Perubahan Histopatologi Hati dan Paru Mencit Pascainduksi dengan Zat Karsinogenik *Benzo(a)piren*

(HISTOPATHOLOGICAL CHANGES OF MICE LIVER AND LUNG POST INDUCTION WITH
CARCINOGENIC SUBSTANCES BENZO(A)PYRENE)

Ienioliski Rohi Bire¹, Ida Bagus Oka Winaya², Anak Agung Ayu Mirah Adi²

¹Mahasiswa Pendidikan Profesi Dokter Hewan,

²Laboratorium Patologi Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana,

Jl. P.B. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia, 80234; Telp/Fax: (0361) 223791

e-mail: ienioliski@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran histopatologi hati dan paru-paru mencit pascainduksi dengan zat karsinogenik *benzo(a)piren*. Penelitian ini menggunakan 10 ekor mencit jantan yang dipelihara pada lingkungan serta diet yang sama. Mencit kemudian dibagi menjadi dua kelompok. Kelompok I diinjeksi dengan *benzo(a)piren* sebanyak 0,3 mg dalam 0,1 mL *oleum olivarium* secara subkutan sedangkan kelompok II hanya diinjeksi dengan *oleum olivarium* dengan cara yang sama. Setelah satu bulan, semua mencit dikorbankan. Sampel jaringan hati dan paru dimasukkan kedalam NBF 10% untuk proses pemeriksaan histopatologi lebih lanjut. Data pemeriksaan histopatologi hati dan paru kemudian dianalisis secara deskriptif. Hasil yang didapatkan menunjukkan adanya perbedaan gambaran histopatologi hati dan paru mencit antara kelompok I dibandingkan dengan kelompok II. Adapun gambaran mikroskopik yang dominan pada kelompok I adalah: pada hati terjadi kongesti pada vena sentralis serta nekrosis pada sel hepatosit. Pada paru terjadi nekrosis serta adanya penebalan septa alveoli dan infiltrasi sel radang sedangkan untuk kelompok II, tidak terdapat perubahan pada gambaran mikroskopiknya. Berdasarkan hasil penelitian, zat karsinogenik *benzo(a)piren* dapat menyebabkan terjadinya kongesti pada vena sentralis serta nekrosis pada sel hepatosit serta penebalan pada septa alveoli dan adanya infiltrasi sel-sel radang mononuklear pada paru.

Kata-kata kunci: mencit, benzo(a)piren, hati, paru

ABSTRACT

This research was conducted in order to evaluate the histopathology of liver and lung of the mice that induced with carcinogenic substance benzo(a)pyrene. This study was use 10 male mice that kept in the same place with the same condition and same diet. The mice divided into 2 groups. The mice in group I were injected with 0.3 mg benzo(a)pyrene in 0.1 mL *Oleum olivarium* subcutaneously while the mice in group II were injected with *Oleum olivarium* in the same way. After 1 month, all mice were sacrificed. Tissue sample of liver and lung were subjected into NBF 10% for further process of histopathological examination. Histopathological data examination of liver and lung was then analyzed descriptively. The result that obtained show that there is a differences in liver and lung of the mice in group I compared to Group II. The dominant microscopic picture in group I is: in the liver there is congestion in the central vein and necrosis in hepatocyte cells, necrosis in the lungs and alveoli septa thickening and inflammatory cell infiltration while for group II, there is no change in the microscopic picture. Based on the results of the study, benzo(a) pyrene can cause congestion in the central vein and necrosis in hepatocyte cells and thickening of the alveoli septa and the infiltration of mononuclear inflammatory cells in the lungs.

Keywords: mice, benzo(a)pyrene, liver, lung

PENDAHULUAN

Zat karsinogenik adalah segala jenis zat yang dapat menyebabkan perubahan terhadap struktur dan fungsi sel tubuh. Di lingkungan sekitar kita terdapat berbagai jenis zat yang dapat digolongkan kedalam zat karsinogen. Terdapat tiga jenis golongan karsinogen yaitu bahan kimia, radiasi, dan agen biologi.

Bahan kimia yang memiliki sifat karsinogen dibagi menjadi dua kelompok berdasarkan cara kerjanya. Bahan karsinogen yang bereaksi secara langsung misalnya *dimethyl sulphate*, *dimethyl carbamyl chlorida*, sedangkan yang tidak langsung menimbulkan transformasi sel disebut pro-karsinogen yang memerlukan perubahan metabolis agar berubah menjadi karsinogen yang aktif (Sarasin and Meunier-Rotival, 1976; Hayes, 1995; Lai and Shields, 1999; Klaunig *et al.*, 2000; Oesch *et al.*, 2000; Poirier *et al.*, 2000; Luch, 2005). Contoh yang masuk di dalam golongan ini adalah *polycyclic aromatic hydrocarbons* (PAH), *amine aromatic* dan zat pewarna azo, nitrosamin dan unsur-unsur logam.

Benzo(a)piren merupakan salah satu zat karsinogenik dari golongan *polycyclic aromatic hydrocarbons* yang bersifat toksik dan sangat berbahaya (Jung, 2010). *Benzo(a)piren* sendiri dapat kita temukan dalam kehidupan sehari-hari. Salah satu sumber utama dari *benzo(a)piren* ialah hasil dari pembakaran bahan organik yang tidak sempurna, misalnya erupsi gunung api, asap knalpot, pembakaran kayu, tembakau, tar dan juga pembakaran batu bara. Selain itu *benzo(a)piren* juga dapat ditemukan pada beberapa jenis makanan, misalnya daging dan ikan dipanggang dengan arang, diasap atau digoreng dengan minyak yang telah dipakai berulang-ulang. Sel-sel yang terpapar *benzo(a)piren* akan mengalami perubahan pada DNA sehingga sel-sel tersebut tumbuh secara tidak terkendali. Proses karsinogenesis yang dialami sel terdiri atas tiga tahap yaitu inisiasi, promosi, dan progresi (Kartawiguna, 2001).

Pada tahap inisiasi zat karsinogen menyerang asam nukleat (DNA/RNA) namun pada zat karsinogenik golongan *polycyclic aromatic hydrocarbons*, sebelum menyerang asam nukleat, zat ini harus dikonversikan atau diaktifkan terlebih dahulu secara metabolik menjadi bentuk defisit elektron yang disebut karsinogen elektrofilik reaktif. Tahap promosi terjadi apabila sel-sel yang telah terinisiasi berkembang menjadi sel-sel preneoplasma akibat stimulasi dari zat lain (promotor). Pada tahap progresi sel-sel preneoplasma berkembang menjadi sel neoplasma. Setelah itu terjadi ekspansi populasi sel-sel ini secara spontan dan

irreversibel. Sel-sel kemudian menjadi tidak responsif terhadap sistem imunitas tubuh dan regulasi sel (Kartawiguna, 2001).

Hati dan paru-paru merupakan organ yang memiliki peran sangat penting bagi tubuh. Hati berperan penting dalam metabolisme serta pertahanan tubuh sedangkan paru-paru berperan penting dalam pernafasan. Setiap zat yang masuk ke dalam tubuh dimetabolisme di hati sehingga zat-zat berbahaya yang masuk ke dalam tubuh tentunya akan menimbulkan perubahan baik itu secara fisiologis, anatomi maupun secara histologis. Hal ini terkait dengan fungsi hati sebagai organ pertahanan yang menetralkan zat-zat toksik yang masuk ke dalam tubuh.

Paru-paru merupakan organ yang berfungsi sebagai tempat pertukaran oksigen dengan karbondioksida. Pada paru-paru terdapat banyak kapiler-kapiler darah, sehingga terdapat kemungkinan zat-zat beracun yang ada dalam peredaran darah, ikut terbawa dan menimbulkan gangguan pada paru-paru itu.

Pada penelitian tentang tumor, zat kimia *benzo(a)piren* sering digunakan untuk menginduksi tumor fibrosarkoma pada jaringan lunak hewan percobaan. Kejadian *cardiac fibrosarcoma* primer dapat ditemukan pada kucing, domba dan monyet. Berdasarkan atas lokasinya, tumor ini ditemukan pada atrium dan septa interventrikuler (Speltz *et al.*, 2007). Fibrosarkoma merupakan tumor yang bersifat agresif dan dapat melakukan metastasis ke tempat jauh seperti hati, paru, tulang dan otak (Vander, 2000). Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui bagaimana gambaran histopatologi hati dan paru mencit yang diinduksi dengan *benzo(a)piren*

METODE PENELITIAN

Sebanyak 10 ekor mencit jantan berumur dua bulan, dibagi menjadi dua kelompok secara acak yang masing-masing berjumlah lima ekor. Kelompok I diberikan injeksi *benzo(a)piren* sebanyak 0,3 mg/0,1 mL dalam *oleum olivarum* secara subkutan pada daerah intrascapuler sebanyak lima kali (Parwata *et al.*, 2015), dengan selang dua hari sedangkan kelompok II hanya diinjeksikan dengan *oleum olivarum* dengan cara yang sama. Selanjutnya seluruh mencit dipelihara dalam suasana dan diet yang sama. Dilakukan pengamatan selama 1 bulan, kemudian mencit dikropsi untuk mengetahui gambaran histopatologi hati dan parunya.

Pembuatan Preparat

Pembuatan preparat histologi dilakukan dengan cara, organ mencit (hati dan paru-paru) difiksasi menggunakan *neutral buffer formalin* 10%, kemudian jaringan dipotong dengan ketebalan 0,3-0,5 mm dan dimasukkan kedalam *tissue cassette*. Selanjutnya dilakukan dehidrasi secara berturut-turut menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat masing- masing 70%, 80%, 90%, Etanol I, dan Etanol II secara berurutan dalam toples selama dua jam. Selanjutnya ialah proses *clearing*, jaringan dibersihkan menggunakan xylol kemudian dicetak menggunakan blok paraffin sehingga sediaan tercetak dalam blok dan disimpan dalam lemari es selama 24 jam. Setelah itu blok yang berisi jaringan tersebut dipotong menggunakan mikrotom setebal 4-5 μ m. Hasil potongan diapungkan dalam air hangat yang bersuhu 60°C selama 24 jam untuk merenggangkan agar jaringan tidak terlipat. Sediaan kemudian diangkat dan diletakkan dalam gelas objek dan diwarnai dengan Hematoxylin dan Eosin (HE). Selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop cahaya (Muntha, 2001).

Pemeriksaan Histopatologi

Pengamatan histopatologi jaringan hati dan paru mencit dilakukan dengan cara membandingkan kelompok I dengan kelompok II. Variabel yang diamati pada kedua organ (hati dan paru-paru) mencit, adalah: peradangan, nekrosis, penebalan jaringan dan kongesti. Data yang didapat berupa gambaran histopatologi paru dan hati pada semua mencit, data kemudian ditabulasi dan dianalisis secara deskriptif

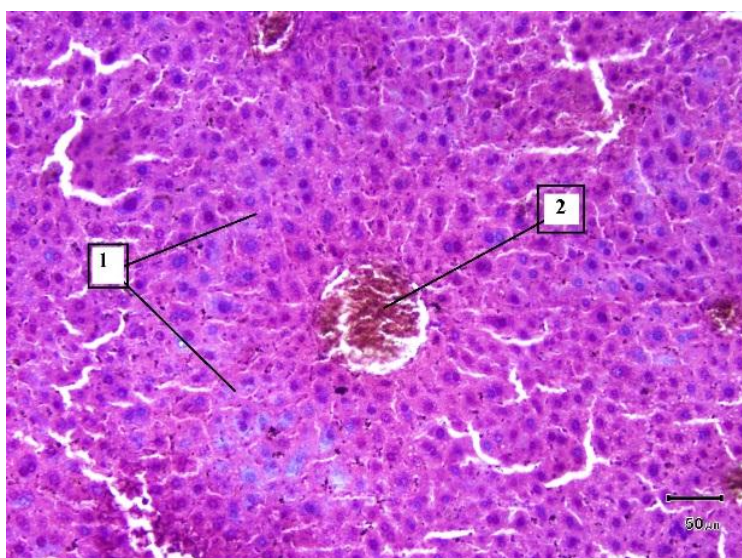
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada kelompok perlakuan 1 (K1) teramati adanya kongesti pada vena sentralis serta nekrosis (piknosis) pada sel hati (hepatosit). Gambaran piknosis dapat ditemukan dari tepi vena sentralis sampai daerah centrolobuler pada hati (Gambar 1). Pada paru ditemukan adanya penebalan pada septa alveoli, nekrosis, serta adanya infiltrasi sel radang pada tepi pembuluh darah atau perivascular (Gambar 2). Pada mencit kelompok perlakuan 2 (K2) tidak ditemukan adanya perubahan yang signifikan pada hati dan paru-paru mencit.

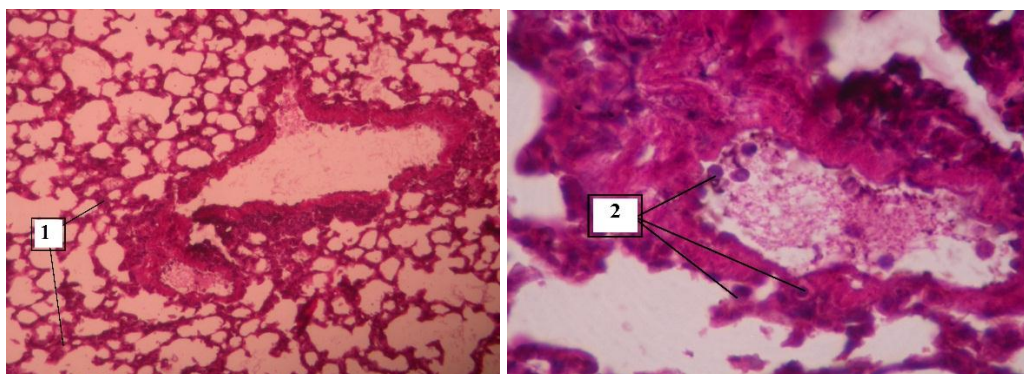
Tabel 1. Jenis dan frekuensi lesi pada hati dan paru-paru mencit pada dua kelompok perlakuan

Organ dan Perubahan	Kelompok I (x/n)	Kelompok II (x/n)
Lesi pada Hati		
Kongesti	5/5	0/5
Nekrosis	5/5	0/5
Lesi pada Paru-Paru		
Penebalan septa alveoli	5/5	0/5
Nekrosis	5/5	0/5
Infiltrasi sel radang	5/5	0/5

Keterangan: x = jumlah sampel yang menunjukkan lesi; n = jumlah total sampel; KI= 5; KII= 5



Gambar 1. Gambaran histopatologi pada hati mencit yang mendapat perlakuan injeksi *benzo(a)piren*. Terlihat bagian sel-sel hati yang mengalami nekrosis berupa piknosis (1) serta adanya kongesti pada vena sentralis (2). (Pewarnaan HE, 100x)



Gambar 2. Gambaran histopatologi pada paru-paru mencit yang diinjeksikan dengan *benzo(a)piren*. Terlihat adanya penebalan septa alveoli (1) dan juga infiltrasi sel radang (2). (Pewarnaan HE, 100x dan 1000x)

Hati dan paru-paru merupakan organ-organ yang berhubungan erat dengan sistem peredaran darah, karena hati berperan dalam proses metabolisme zat-zat yang masuk ke dalam tubuh, sedangkan paru-paru terlibat dalam proses pertukaran oksigen dengan karbondioksida dalam darah yang merupakan hasil dari metabolisme tubuh. Fungsi kedua organ ini dapat terganggu akibat beberapa faktor, salah satunya adalah zat-zat toksik yang masuk ke dalam tubuh.

Zat toksik yang masuk ke dalam tubuh dapat menimbulkan gangguan pada organ-organ tubuh, namun hal ini juga tergantung pada jumlah zat toksik yang masuk serta berapa lama organ terpapar pada zat toksik tersebut. Zat kimia di dalam hati yang terlalu banyak serta berada dalam jangka waktu yang lama dapat menimbulkan berbagai perubahan di antaranya nekrosis, piknosis, degenerasi, serta kongesti (Guyton dan Hall, 1997) dan pada paru-paru perubahan histopatologi yang ada sering terjadi dalam bentuk nekrosis, degenerasi, penebalan serta kemungkinan adanya infiltrasi sel radang (Berata *et al.*, 2014).

Setelah dilakukan injeksi *benzo(a)piren* dengan dosis 0,3 mg/0,1 mL dalam *oleum olivarum* dan dilakukan pengamatan selama satu bulan, hati dan paru-paru mencit (*Mus musculus*) yang diperiksa gambaran histopatologinya menunjukkan hasil yang berbeda pada organ hati dan paru-paru.

Pada hati kelompok mencit yang diinjeksikan dengan *benzo(a)piren*, dapat diamati adanya kongesti serta nekrosis. Nekrosis ini ditandai dengan adanya piknosis sampai pada daerah sentrolobuler hati. Ciri-ciri dari sel yang telah mengalami piknosis antara lain inti sel atau nukleus mengecil, tampak lebih bundar, dan tampak lebih jelas atau berwarna lebih gelap (Sudiono *et al.*, 2001), sedangkan pada kelompok mencit yang hanya diinjeksikan dengan *oleum olivarum* secara umum tidak ditemukan adanya perubahan gambaran histopatologi hati yang signifikan. Berdasarkan hasil yang teramati, dapat dikatakan bahwa nekrosis yang teramati pada hati mencit (*M. musculus*) kelompok perlakuan 1 (K1) merupakan efek dari toksisitas *benzo(a)piren* yang diinjeksikan. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Ashish *et al.* (2008) yang menunjukkan bahwa toksitas *benzo(a)piren* menurunkan kemungkinan sel untuk bertahan hidup. Selain itu Chen *et al.* (2011) menyatakan bahwa *benzo(a)piren* yang ada akan meningkatkan aktivitas caspase-3 atau 7, 8, 9 dan 12 yang juga akan menurunkan kemampuan sel untuk bertahan hidup sehingga akan berujung pada kematian sel. Diketahui juga yang masuk ke dalam tubuh baik secara per oral, per inhalasi ataupun per interal akan terdistribusi dan mengendap pada organ

seperti paru, hati, ginjal dan jantung. Selanjutnya akan terbentuk reaktif metabolik 7,8-diol-9,10 epoxide benzo(a)piren hasil konversi dari benzo(a)piren oleh sitokrom 450. Reaktif metabolik ini dapat menginisiasi peroksidasi lipid di dalam membran sel. Kalau tubuh terpapar metabolit ini dalam jangka waktu lama dapat meningkatkan permeabilitas atau kerusakan membran sel dan berakhir dengan kematian pada sel tersebut (Cigremis *et al.*, 2004; Selvandisan *et al.*, 2004). Nekrosis yang tampak masih dalam tahap piknosis sehingga inti sel masih dapat dilihat. Hal ini kemungkinan besar disebabkan oleh lama waktu organ terpapar zat tersebut. Semakin lama suatu organ atau sel terpapar atau kontak dengan zat toksik semakin besar pula tingkat keparahan nekrosis yang terlihat. Jika mencit terus menerus terpapar benzo(a)piren maka kemungkinan besar akan terjadi kelanjutan dari tahap piknosis yaitu karyoheksis dan karyolisis. Nekrosis yang teramati, terdapat pada daerah sentrolobuler. Hal ini disebabkan benzo(a)piren yang diinjeksikan ikut terbawa aliran darah ke hati, dan daerah sentrolobuler merupakan bagian pada hati yang paling mendekati saluran darah sehingga daerah tersebut menjadi daerah yang paling parah terpapar benzo(a)piren.

Dari pengamatan yang dilakukan pada paru-paru mencit (*M. musculus*) yang diinjeksikan dengan benzo(a)piren ditemukan adanya nekrosis serta penebalan pada septa alveoli. Selain itu, pada tepi pembuluh darah (perivaskuler) juga ditemukan adanya infiltrasi sel-sel radang mononuklear. Nekrosis yang terjadi pada paru-paru disebabkan karena adanya reaksi metabolit dari benzo(a)piren sebagai hasil konversi dari sitokrom 450 (Selvendisan *et al.*, 2004). Penebalan pada septa alveoli ini merupakan bentuk dari kerusakan serta proliferasi jaringan parut paru-paru sehingga jaringan paru-paru tersebut menjadi tebal dan kaku. Penebalan ini terjadi karena adanya usaha perbaikan jaringan sebagai mekanisme pertahanan terhadap penyakit pada paru-paru maupun kerusakan jaringan akibat terpapar pada zat toksik (Horton dan Wayne, 2014) dalam hal ini yaitu benzo(a)piren. Benzo(a)piren yang masuk ke paru-paru dapat menimbulkan transformasi DNA yang berujung pada timbulnya kanker serta peradangan pada paru yang ditandai dengan adanya sel-sel radang mononuklear (Omayma *et al.*, 2014) namun dari hasil yang didapat pada penelitian ini hanya terlihat penebalan serta adanya infiltrasi sel-sel radang. Hal ini kemungkinan besar disebabkan oleh proses metabolisme enzimatik benzo(a)piren yang belum sempurna, sebab untuk dapat menimbulkan kanker, benzo(a)piren harus mengalami transformasi terlebih dahulu agar menjadi zat karsinogenik aktif baru dapat menimbulkan kanker. Zat toksik benzo(a)piren

yang ikut terbawa ke paru-paru setelah injeksi secara subkutan hanya mampu menimbulkan respons peradangan yang ditandai adanya infiltrasi sel-sel radang mononuklear.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, zat karsinogenik *benzo(a)piren* dapat menyebabkan terjadinya kongesti pada vena sentralis serta nekrosis pada sel hepatosit serta penebalan pada septa alveoli dan adanya infiltrasi sel-sel radang mononuklear pada paru.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Patologi Veteriner, dan Laboratorium Histologi Veteriner FKH Unud yang telah bersedia membantu dalam kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashish S, Neekhra A, Gramajo AL, Patil J, Chwa M, Baruch D, Kuppermann M, Kenney C. 2008. Effects of Benzo(a)Pyrene, a Toxic Component of Cigarette Smoke, on Human Retinal Pigment Epithelial Cells In Vitro. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49: 5111-5117.
- Berata IK Winaya IBO, Adi AAAM, Adnyana IBW, Kardena IM. 2014. *Buku Ajar Patologi Veteriner Umum*. Denpasar. Swasta Nulus. 8-24.
- Chen NG, Szalay AA. 2011. Cancer Management in Man: Chemotherapy, Biological Therapy, Hyperthermia and Supporting Measures. Oncolytic Virotherapy of Cancer Cancer Growth and Progression. Volume 13. Springer; New York, NY, USA. pp. 295-316.
- Cigremis Y, Turkoz Y, Akgoz M, Sozmen M. 2004. The effect of chronic expose to ethanol and cigarette smoke on the liver of reduced glutathione and malondialdehyde in rat kidney. *Urolres* 23: 213-218.
- Guyton AC, Hall JE. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 9. Jakarta: EGC. 74,76, 80-81, 244, 248, 606,636,1070,1340.
- Hayes RB. 1995. Genetic susceptibility and occupational cancer. *Med Lav* 86: 206-213.
- Horton M, Wayne M. 2014. A mouse model of chronic idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Physiological Medicine* 2(2): 331-335.
- Jung KH, Yan B, Chillrud SN, Perera FP, Whyatt R, Camann D, Kinney PL, Miller RL. 2010. Assessment of Benzo(a)pyrene-equivalent Carcinogenicity and Mutagenicity of Residential Indoor versus Outdoor Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Exposing Young Children in New York City. *Int. J. Environ. Res. Public Health*.2010,7.
- Kartawiguna E. 2001. Faktor-faktor yang berperan pada karsinogenesis. *J Kedokter Trisakti* 20: 1-16.
- Klaunig JE, Kamendulis LM, Xu Y. 2000. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Hum Exp Toxicol* 19: 543-555.

- Lai C, Shields PG. 1999. The role of interindividual variation in human carcinogenesis. *J Nutr* 29: 552S–555S.
- Luch A. 2005. Nature and nurture – lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 5: 113–125
- Muntha M. 2001. Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan Dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (H&E). Temu Teknis Fungsional Non Peneliti 2001. 156-153
- Oesch F, Herrero ME, Hengstler JG, Lohmann M, Arand M. 2000. Metabolic detoxification: implications for thresholds. *Toxicol Pathol* 28: 382–387
- Omayma AR, Abou Zaid, Eman N, Shaimaa Abdel Ati, Abdel Fattah M. Badawi. 2014. Effect of novel nanocomposite (NSACC) against Benzo[a]pyrene induced lung cancer in mice on p53, caspase 3, 9 genes and histopathological examination. *Int J Pharma Sci* 4(4): 645-650
- Parwata A, Sukardiman, Mulja SH, Whidiartini A, Gunawan. 2015. Induction of Apoptosis and Antiangiogenesis Effects of Pinostrobin from *Kaempferia pandurata* Roxb against Induction of Fibrosarcoma Mice Results Benzopiren. *Pure and Applied Chemical Sciences*, Vol. 3, 2015, no. 1, 19-29
- Poirier MC, Santella RM, Weston A. 2000. Carcinogen macromolecular adducts and their measurement. *Carcinogenesis* 21: 353–359.
- Sarasin A, Meunier-rotival M. 1976. How chemicals may induce cancer. *Biomedicine* 24: 306–316.
- Selvandisan K, Senthil KP, Hagesh V, Shacti S. 2004. Modulatory effect of piperine on mitochondrial antioxidant system in benzo(a)pyren induced experimental lung carcinogenesis. *Phytomedicine* 11: 85-89.
- Spletz MC, Manivel JC, Tobias AH, Hayden DW. 2007. Primary cardiac fibrosarcoma with pulmonary metastasis in a labrador retriever. *Vet Pathol* 44: 403-407.
- Sudiono J, Kurniadi D, Djimantoro B. 2003. *Ilmu Patologi*. Jakarta. Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Vander STJ. 2000. Unusual primary tumors of the heart. *Semin Thorac Cardiovasc Surgis* 12: 89-100.