

Pengaruh Ekstrak Bayam Merah (*Amaranthus gangeticus*) terhadap Morfologi Stratum Hipokampus Model Anak Mencit Pascasapih Induk yang Terpapar Timbal Selama Masa Kehamilan

Viskasari Pintoko Kalanjati, Made Pury Pratiwi, Noer Halimatus Syakdiyah,
Etha Dini Widiyasi, Mayang Rizki Anggraeni, Intan Anggun Pratiwi, Raden Argarini
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Abstrak

Kandungan antioksidan ekstrak bayam merah (*Amaranthus gangeticus*) diduga dapat melawan efek toksik timbal asetat pada sistem saraf pusat. Penelitian ini bertujuan untuk mengamati pengaruh pemberian ekstrak bayam merah terhadap morfologi hipokampus model anak mencit (*Mus musculus*) pascasapih yang induknya terpapar timbal asetat per oral selama masa kehamilan. Penelitian dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga (FKUA) pada bulan April–Juni 2013. Dua puluh tujuh ekor anak mencit pascasapih dibagi dalam 3 kelompok: M0 (*sodium carboxymethyl cellulose* atau CMC Na 0,5%), M1 (CMC Na 0,5%+timbal asetat 1,16 mg/10 g BB/hari) dan M2 (CMC Na 0,5%+timbal asetat 1,16 mg/10 g BB/hari+ekstrak bayam merah 382,2 mg/10 g BB/hari). Sediaan otak diambil untuk dibuat preparat histologi dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin* (HE). Lebar stratum *granulare girus dentatus* (GD), stratum *oriens-piramidale* (SOP) CA1, CA2, dan CA3 dianalisis dengan *analysis of variance* (ANOVA) dan *least significant different* ($p < 0,05$). SOP CA1 dan CA2 pada kelompok M2 lebih lebar dibandingkan dengan kelompok M1 ($p < 0,05$). SOP CA1 kelompok M2 lebih lebar pula bila dibandingkan dengan M0 ($p = 0,001$). Lebar SG dari GD dan SOP CA3 kelompok M2 menunjukkan nilai yang lebih tinggi ($p > 0,05$). Simpulan, pemberian ekstrak bayam merah dapat mengurangi efek negatif timbal asetat yang merusak struktur hipokampus model anak mencit pascasapih yang induknya terpapar timbal selama kehamilan. [MKB. 2014;46(3):125–9]

Kata kunci: Bayam merah, hipokampus, timbal asetat

Effect of Red Spinach (*Amaranthus gangeticus*) Extract on Hippocampus Morphology of Post-Weaning Mice Infant Model from Lead-Acetate Exposed Pregnant Mice

Abstract

Antioxidants in red spinach (*Amaranthus gangeticus*) extract are proposed to combat the toxicity of lead acetate in the central nervous system. The effect of red spinach extract to the morphology of post weaning mouse hippocampus model (*Mus musculus*) in pregnant mice that received oral lead acetate during pregnancy was analyzed. Twenty seven post-weaning mice offsprings were grouped into 3 groups: M0 (sodium carboxymethyl cellulose or CMC Na 0.5%), M1 (CMC Na 0.5%+lead acetate 1.16 mg/10 g of body weight/day) and M2 (CMC Na 0.5%+lead acetate 1.16 mg/10 g of body weight/day+red spinach extract 382.2 mg/10 g of body weight/day). Brains were histologically processed and stained with hematoxylin-eosin (HE). Width of stratum granulare (SG) of the dentate gyrus (GD) and each of stratum oriens-pyramidale (SOP) of CA1, CA2, CA3 from each mouse hippocampus were obtained and analyzed statistically using analysis of variance (ANOVA) and least significant difference (LSD) ($p < 0.05$). The CA1 and CA2 SOPs in M2 were significantly wider compared to those of M1 ($p < 0.05$). Meanwhile, the SOP of CA1 in M2 was significantly wider compared to that of M0 ($p = 0.001$). The SG width of GD and the CA3 SOP in M2 were wider than those of M0 and M1 ($p > 0.05$). In conclusion, red spinach extract might dampen the adverse effects of oral lead acetate in post-weaning mouse hippocampus model from pregnant mice orally exposed to lead acetate during pregnancy. [MKB. 2014;46(3):125–9]

Key words: Hippocampus, lead acetate, red spinach

Korespondensi: Viskasari Pintoko Kalanjati, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya, *mobile* 081235791686, *e-mail* viskasari-p-k@fk.unair.ac.id

Pendahuluan

Kandungan timbal asetat di dalam biosfer semakin mengalami peningkatan dalam kurun waktu 300 tahun terakhir, diakibatkan banyak penggunaan zat yang mengandung timbal asetat antara lain cat, keramik, pipa, solder, bensin, asap buangan kendaraan bermotor, baterai, kosmetik, pewarna rambut, dan juga banyak ditemukan pada sektor pertambangan.¹

Timbal asetat berpotensi toksik pada sistem saraf, sistem urinaria, dan darah.¹ Timbal asetat ($Pb(CH_3COO)_2$) merupakan senyawa berbentuk kristal putih dan memiliki rasa manis yang dibuat dengan mereaksikan timbal(II) oksida dengan asam asetat. Rasa senyawa ini manis, karena itu timbal asetat juga disebut sebagai *lead sugar*. Timbal asetat dapat menimbulkan stres oksidatif melalui generasi *reactive oxygen species* (ROS). Stres oksidatif ini dapat memperbesar prevalensi kerusakan jaringan otak dan juga kemunduran kemampuan belajar oleh karena paparan timbal, utamanya pada anak.²⁻⁴

Pada bayam merah (*Amaranthus gangeticus*) terdapat konsentrasi antioksidan yang tinggi, karena terdapat kandungan β -karoten, asam folat, vitamin C (asam askorbat), pigmen *betacyanin* *amaranthin*, dan *isoamaranthin*.⁵

Penelitian ini dilaksanakan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak bayam merah terhadap morfologi hipokampus pada model anak mencit pascasapih induk mencit yang terpapar timbal asetat secara oral selama masa kehamilan.

Metode

Jenis penelitian ini mempergunakan rancangan *randomized controlled trial* yang telah disetujui oleh Unit Bioetik dan Humaniora Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga (No. 072/EC/KEPK/FKUA/2013). Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April–Juni 2013 di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Penelitian ini menggunakan 27 anak mencit (*Mus musculus*) galur *Balb/C* pascasapih dengan tiga perlakuan yang berbeda. Masing-masing kelompok terdiri atas sembilan ekor anak mencit pascasapih. Kelompok M0 (kontrol) adalah kelompok anak mencit yang berasal dari induk mencit yang diberi plasebo berupa *sodium carboxymethyl cellulose* atau CMC Na 0,5% dan akuades. Kelompok M1 adalah kelompok anak mencit yang berasal dari induk mencit yang diberi CMC Na 0,5% dan timbal asetat 1,16 mg/10 gBB/hari. Kelompok M2 adalah kelompok anak mencit yang berasal dari induk mencit yang diberi ekstrak bayam merah 382,2 mg/10 gBB/hari

dan timbal asetat 1,16 mg/10 gBB/hari. Ketiga perlakuan tersebut diberikan pada induk mencit selama masa kehamilan yaitu selama 21 hari.^{4,5} Anak mencit disapih seminggu setelah kelahiran.

Setelah dilakukan *euthanasia* dengan anestesi *ketamine-xylazine*, sediaan otak diambil untuk dijadikan preparat histologi dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin* (HE). Preparat tersebut diamati memakai mikroskop lapangan pandang terang (*Olympus*, Jepang). Perbesaran yang digunakan adalah okuler 10x dan objektif 20x. Penerangan lampu yang digunakan adalah maksimal. Bagian hipokampus yang diamati yaitu *stratum granulare* (SG) dari *girus dentatus* (GD), *stratum oriens-piramidale* (SOP) dari *cornu amonis* (CA) 1, 2, dan 3.⁶⁻⁸ Stratum-stratum tersebut dipilih untuk diamati karena pada stratum tersebut memiliki struktur yang jelas dan dapat dibedakan dari strata lainnya dengan pewarnaan HE, sehingga mudah untuk diamati secara kualitatif dan diukur lebarnya (kuantitatif). Bagian stratum tersebut dapat dilihat pada Gambar 1. Terhadap masing-masing area hipokampus diambil gambar berupa foto dalam format JPEG menggunakan aplikasi *Ulead* dengan kamera CCTV yang dimodifikasi khusus bermerek *Panasonic* (Indonesia). Pada area *girus dentatus* diambil tiga gambar lapang pandang, sedangkan area CA1, CA2, dan CA3 masing-masing diambil 1 (satu) gambar lapang pandang, sehingga dari 1 (satu) sampel preparat total didapatkan enam lapang pandang. Gambar yang sudah diambil lalu diukur lebar stratumnya dengan menggunakan garis skala pada aplikasi *Motic Image Plus 2.0* (USA). Pada aplikasi ini, *tools* yang digunakan adalah *line*, sebelumnya dilakukan kalibrasi pada pilihan tombol *measure* dengan mengganti perbesaran lensa objektif menjadi 20x, sedangkan satuan yang dipilih yaitu mikrometer (μm). Lebarnya stratum yang diukur dapat muncul setelah melakukan *klik* dan *drag* pada stratum yang akan diukur. Masing-masing gambar dilakukan pengukuran tiga kali dan bertujuan untuk mendapatkan nilai rerata yang valid. Data kuantitatif berupa lebar stratum dalam satuan μm dianalisis dengan uji *analysis of variance* (ANOVA); jika terdapat perbedaan yang bermakna dilanjutkan dengan uji *least significant different* (LSD) dengan menggunakan *software statistical product and service solutions* (SPSS) versi 17 ($p < 0,05$).

Hasil

Tabel 1 mencantumkan data pengukuran lebar strata GD dan CA hipokampus masing-masing kelompok.

Pada SG *girus dentatus* dan SOP CA3, tidak

Tabel 1 Lebar Stratum pada Area Hipokampus

AREA (µm)	M0 (n=9)	M1 (n=9)	M2 (n=9)	F	*p
GD	575,88±141,23	576,16±97,48	617,14±67,27	0,448	0,644
SOP CA3	507,02±161	532,61±193,52	587,07±104,8	0,604	0,554
SOP CA2	960±212,31	748,82±160,63	1255,39±543,07 a (^a lebih tinggi dibandingkan dengan M1)	4,78	0,018 a
SOP CA1	460,04±132,94	468,03±116,08	690,01±139,72b (^b lebih tinggi dibandingkan dengan M0 & M1)	9,08	0,001 b

*Uji ANOVA dan LSD

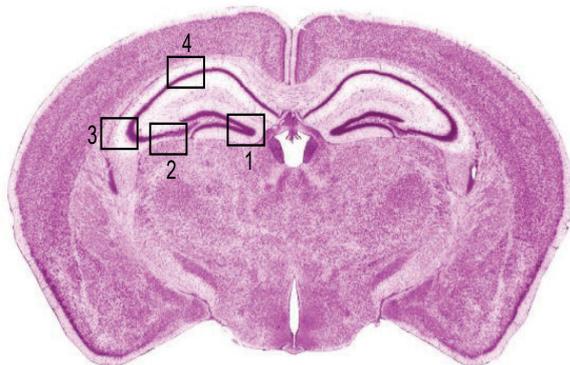
didapat perbedaan lebar yang bermakna antara M0, M1 dan M2, meskipun lebarnya pada M2 lebih besar bila dibandingkan dengan pada M1 dan pada M1 lebih besar dibandingkan dengan pada M0 ($p > 0,05$). Lebar SOP CA2 pada M2 lebih besar dibandingkan dengan M0 ($p > 0,05$), dan M1 ($p > 0,05$). Pada SOP CA1, lebar pada M2 lebih besar secara bermakna bila dibandingkan dengan pada M0 dan M1 ($p > 0,05$).

Observasi kualitatif morfologi strata hipokampus dilakukan pada area GD, CA1, CA2, dan CA3 (Gambar 1). Terdapat perbedaan susunan dan ketebalan strata sel pada strata *girus dentatus* kelompok M1 dan M2 bila dibandingkan dengan dengan kontrol (M0) seperti yang terlihat pada gambar 2-4. Pada GD kelompok M2 (Gambar 4) ditemukan gambaran yang hampir sama dengan GD pada kelompok kontrol M0. Untuk daerah CA1-3, pada preparat dengan pewarnaan

HE tidak terlihat jelas perbedaan kualitatif yang bermakna morfologi susunan strata hipokampus antara kelompok M0, M1, dan M2 (gambar tidak dicantumkan di sini).

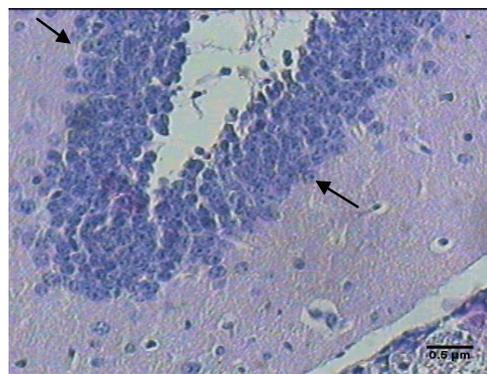
Pembahasan

Pada penelitian ini ditemukan bahwa *stratum oriens-piramidale* (SOP) CA2 kelompok M2 lebih lebar secara bermakna bila dibandingkan dengan kelompok M1, meskipun tidak bermakna dibandingkan dengan kelompok M0. Selain itu, lebar SOP CA1 pada kelompok M2 lebih lebar secara bermakna dibandingkan dengan kelompok M0 serta M1. Keadaan ini dapat dimaknai bahwa terdapatnya usaha perbaikan pada hipokampus kelompok M2 bila dibandingkan dengan M1, walaupun perbaikan dari morfologi hipokampus tersebut belumlah seoptimal kontrol (M0). Hal ini dimungkinkan terjadi karena terdapat kandungan asam folat dan vitamin C yang tinggi pada bayam

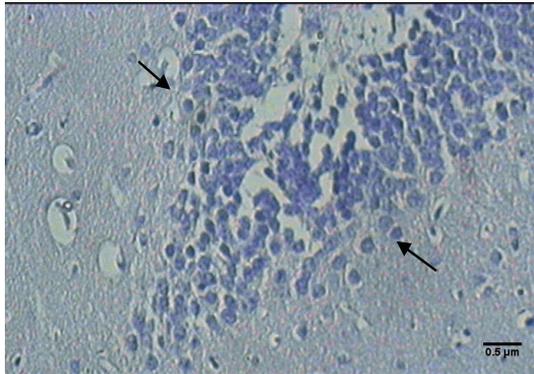


Gambar 1 Area Hipokampus Anak Mencit yang Diamati dengan Pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE)

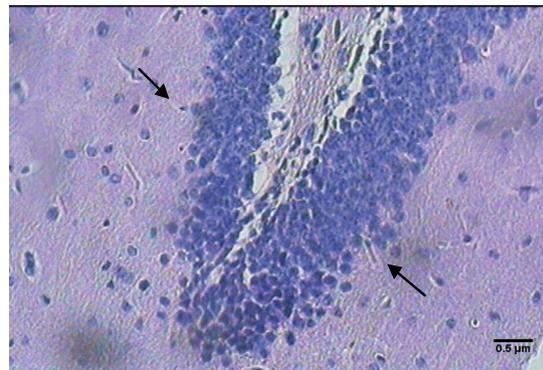
Keterangan: 1. Girus dentatus (GD), 2. CA3, 3. CA2, 4. CA1 (objektif 4x, mikroskop cahaya Olympus, Jepang)



Gambar 2 Girus Dentatus pada Kelompok Kontrol M0 (perbesaran objektif 20x)
Susunan sel tampak rapi, kompak, dan tebal merata (panah)



Gambar 3 *Girus Dentatus* pada Kelompok Kontrol M1 (perbesaran objektif 20x). Susunan sel tampak renggang, agak menipis, dan kurang tersusun rapi (panah)



Gambar 4 *Girus Dentatus* pada Kelompok Kontrol M2 (perbesaran objektif 20x). Tampak susunan sel cukup tebal dan teratur, meskipun ketebalan stratum tidak sama (panah)

merah yang dapat meningkatkan neurogenesis pada hipokampus.⁹

Terlihat bahwa lebarnya stratum rata-rata pada GD, CA3, dan CA1 pada kelompok M1 lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok M0. Hal ini mungkin terjadi karena kompensasi berupa neurogliogenesis pada hipokampus yang terpapar timbal pada M1, sehingga bagian pada hipokampus tersebut mengalami proses usaha perbaikan.

Sel-sel saraf pada *stratum granulare girus dentatus* terdiri atas interneuron, neuron, dan sel neuroglia.⁶⁻⁸ Dapat dimungkinkan terjadi proses pembentukan sel neuroglia menggantikan neuron dan interneuron yang rusak akibat paparan timbal, sehingga lebar *stratum granulare* pada *girus dentatus* kelompok M1 lebih tinggi dibandingkan dengan M0.

Selain itu, pada *stratum oriens-piramidale* juga terdapat sedikit sel neuroglia,⁶⁻⁸ sehingga pada pengukuran lebar SOP CA3 dan CA1 juga memperlihatkan rata-rata yang lebih tinggi pada kelompok M1 dibandingkan dengan kelompok M0. Keadaan tersebut memerlukan pengamatan lebih lanjut untuk melihat proporsi sel neuron, interneuron, dan juga sel glia pada stratum di hipokampus dengan pewarnaan preparat yang lebih sesuai (teknik imunohistokimia).

Pada pengamatan ditemui perbedaan susunan sel dan kesan jumlah sel yang bermakna pada *girus dentatus* antara kelompok M0, M1, dan M2. Pada kelompok kontrol M0 (Gambar 2) ditemukan sel-sel neuron pada *girus dentatus* tampak kompak, padat, dan tersusun rapi. Pada kelompok M1 (Gambar 3) ditemukan sel-sel neuron pada *girus dentatus* tampak renggang, agak menipis, dan tidak tersusun rapi. Perbedaan morfologi antara kelompok M1 dan M0 tersebut mungkin karena

kerusakan parsial sekelompok sel pada stratum *girus dentatus* akibat efek toksik timbal asetat, dan hal ini tampaknya dapat diperbaiki dengan pemberian ekstrak bayam merah seperti yang tampak pada *girus dentatus* kelompok M2 bila dibandingkan dengan kelompok M1.

Peningkatan kandungan timbal asetat di dalam biosfer terakumulasi pada tanah, udara, dan juga berbagai produk yang mengandung timbal asetat. Jika timbal asetat tersebut masuk ke dalam tubuh manusia melalui pencernaan, pernapasan, kulit atau plasenta ibu hamil yang terpapar timbal asetat maka manusia tersebut dapat mengalami keracunan timbal.^{1,2} Paparan timbal asetat pada ibu hamil dapat menembus sawar darah pada plasenta sehingga calon bayi dapat ikut terpapar timbal asetat tersebut.¹⁻³ Kerusakan otak yang ditimbulkan berupa edema serebri dan dilatasi ventrikel serta *vermis cerebelli*.⁴ Paparan timbal juga mampu menurunkan kemampuan belajar dan memori karena dapat memengaruhi kinerja neurotransmitter pada lokasi hipokampus, korteks frontalis, dan striatum.^{2,3} Selain stres oksidatif, beberapa studi melaporkan bahwa peningkatan lipid peroksidase atau penurunan antioksidan intrinsik pada jaringan memperkuat munculnya kemunduran makromolekul biologis sel sebagai patogenesis keracunan timbal.^{1,2}

β -karoten, asam folat, dan vitamin C pada bayam merah dapat menghambat peroksidasi lipid pada hewan coba dan manusia yang mengalami stres oksidatif.⁹⁻¹¹ Selain itu, vitamin B6 dalam bayam merah dapat meningkatkan level enzim antioksidan pada jaringan.⁵⁻¹⁰ Perbaikan susunan dan tebal strata pada berbagai bagian hipokampus mencit yang diberi timbal asetat pada penelitian ini kemungkinan dapat terjadi oleh karena efek antioksidan bayam merah yang memutus rantai

peroksidase lipid akibat dari pemberian timbal asetat.^{5,10,11} Aplikasinya terhadap manusia masih harus ditelaah lebih lanjut.

Simpulan penelitian ini adalah, timbal asetat dapat memberikan efek negatif pada neuron dan glia hipokampus. Ekstrak bayam merah mampu memperbaiki proses patologis pada hipokampus model anak mencit pascasapih yang terpapar timbal asetat selama dalam kandungan.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Departemen Anatomi dan Histologi serta Departemen Ilmu Faal Fakultas Kedokteran (FK) Universitas Airlangga, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya dan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI) yang telah turut andil dalam penyediaan sarana dan prasarana serta pendanaan penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. NHMRC. Blood lead levels: lead exposure and health effects in Australia, 2009. An information paper for practitioners and policy makers 2009 [diunduh 20 Mei 2012]. Tersedia dari: http://www.nhmrc.gov.au/files_nhmrc/file/publications/synopses/gp02-lead-info-paper.pdf.
2. Flora G, Gupta D, Tiwari A. Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicol.* 2012;5(2):47–58.
3. Bijoor AR, Sudha S, Venkatesh T. Neurochemical and neurobehavioral effects of low lead exposure on the developing brain. *Ind J Clin Biochem.* 2012;27(2):147–51.
4. Berkowitz S, Tarrago R. Acute brain herniation from lead toxicity. *Pediatrics.* 2006;118:2548–57.
5. Sani HA, Rahmat A, Ismail M, Rosli R, Endrini S. Potential anticancer effect of red spinach (*Amaranthus gangeticus*) extract. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2004;13(4):396–400.
6. Kalanjati VP, Miller S, Ireland Z, Colditz PB, Bjorkman ST. Developmental expression and distribution of GABA-A receptor alpha1, alpha3 and beta 2 subunits in pig brain. *Developmental Neurosci.* 2011;33(2):99–109.
7. Ellis H. The central nervous system. Dalam: Misina M, Sugden M, penyunting. *Clinical anatomy.* Edisi ke-11. Hong Kong: Blackwell Publishing; 2006. hlm. 339–61.
8. Scanlon VC, Sanders T. The nervous system. Dalam: Richman IH, Sorkowitz A, Deitch LB, penyunting. *Essentials of anatomy and physiology.* Edisi ke-5. Philadelphia: F.A. Davis Company; 2007. hlm. 163–95.
9. Nogueira CR, Borges F, Lameu E, Franca C, Ramalho A. Effects of supplementations of antioxidant vitamins and lipid peroxidation in critically ill patients. *Nutr Hosp.* 2013;28(5):1666–72.
10. Zhuo JM, Pratico D. Acceleration of brain amyloidosis in an Alzheimer's disease mouse model by a folate, vitamin B6 and B12-deficient diet. *Exp Gerontol.* 2010;45(3):195–201.
11. Jackie T, Haleagrahara N, Chakravarthi S. Antioxidant effects of *Etlingera elatior* flower extract against lead acetate-induced perturbations in free radical scavenging enzymes and lipid peroxidation in rats. *BMC Res Notes.* 2011;4:67.