

Efek Hepatoprotektif Ekstrak Etanol Brokoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) terhadap Kadar Malondialdehid Hepar Tikus Wistar yang Diinduksi DMBA

(*Hepatoprotective Effect of Ethanolic Extract of Broccoli (Brassica oleracea* L. var. *italica*) on Liver Malondialdehyde in Wistar Rats Induced by DMBA)

Dear Farah Sielma, Elly Nurus Sakinah, Yudha Nurdian
Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail: dfsielma@gmail.com

Abstract

DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene) is a prototype of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) which is present in automobile exhaust, cigarette smoke, and wood stoves. DMBA is converted into its reactive metabolites DMBA-DE and cause liver cell membrane lipid peroxidation, which results in an increased of liver malondialdehyde (MDA) levels. Broccoli contains flavonoid that able to prevent lipid peroxidation. The current study was conducted to find out the different hepatoprotective effect of ethanolic extract of broccoli against DMBA-induced hepatotoxicity in wistar rats using liver MDA as a marker. A total of 24 male wistar rats were divided into six groups, consisting of normal control (distilled water), negative control (DMBA), and treatment (ethanolic extract of broccoli in doses of 250, 500, 1000, and 2000 mg/kgBW). Rats were treated for 7 days prior to a single dose of DMBA on the 8th day of treatment. Liver tissue samples were taken on the 12th day for measurement of liver MDA levels. Data were analyzed using One Way ANOVA followed by Post Hoc Test LSD. The present study showed significant differences on liver MDA levels between groups ($p < 0.001$). This study concluded that there were different hepatoprotective effects of ethanolic extract of broccoli treatment on liver MDA levels in wistar rats induced by DMBA.

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

Abstrak

DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene) merupakan prototipe Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) yang banyak terdapat pada polutan asap kendaraan bermotor, asap rokok, dan asap dapur. DMBA dikonversi menjadi metabolit reaktif DMBA-DE dan menyebabkan peroksidasi lipid membran sel hepar sehingga kadar malondialdehid (MDA) hepar meningkat. Brokoli memiliki kandungan flavonoid yang mampu menghambat peroksidasi lipid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan efek hepatoprotektif pada pemberian ekstrak etanol brokoli terhadap kadar MDA hepar tikus putih galur wistar yang diinduksi DMBA. Penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus wistar jantan yang dibagi menjadi 6 kelompok yaitu kontrol normal (aquades), kontrol negatif (DMBA), dan perlakuan (ekstrak etanol brokoli dosis 250, 500, 1000, 2000 mg/kgBB). Perlakuan diberikan selama 7 hari diikuti dengan induksi DMBA dosis tunggal pada hari ke-8. Sampel jaringan hepar diambil untuk pengukuran kadar MDA hepar pada hari ke-12. Data dianalisis menggunakan uji *One Way Anova* dilanjutkan dengan *Post Hoc Test LSD*. Hasil penelitian menunjukkan nilai rata-rata kadar MDA hepar antarkelompok memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,001$). Penelitian ini menyimpulkan bahwa terdapat perbedaan efek hepatoprotektif pada pemberian ekstrak etanol brokoli terhadap kadar MDA hepar tikus putih galur wistar yang diinduksi DMBA.

Kata kunci: ekstrak etanol brokoli, DMBA, malondialdehid, hepatoprotektif

Pendahuluan

Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) merupakan kelompok senyawa organik yang tersebar luas di alam sebagai hasil dari pembakaran material organik yang tidak sempurna. Hasil pembakaran yang tidak sempurna tersebut rentan teroksidasi menjadi senyawa radikal bebas [1]. Salah satu prototipe dari senyawa PAH yaitu DMBA (*7,12-Dimethylbenz(a)anthracene*). DMBA merupakan produk hasil degradasi PAH yang banyak terdapat pada polutan asap kendaraan bermotor, asap rokok, dan asap dapur [2].

Indonesia merupakan penyumbang emisi PAH terbesar nomor lima setelah China, India, Amerika Serikat, dan Nigeria [3]. Fenomena tersebut mengakibatkan paparan radikal bebas DMBA di lingkungan semakin banyak. Paparan DMBA secara terus-menerus berdampak negatif terhadap kesehatan manusia [1]. DMBA dimetabolisme oleh hepar dan akan menjadi senyawa yang reaktif setelah mengalami metabolisme, hal ini dapat menyebabkan kerusakan hepar [4]. Alur metabolisme DMBA yaitu melalui aktivasi enzim sitokrom P450. Enzim sitokrom P450 CYP1A1 atau CYP1B1 dan enzim mikrosomal hidrolase pada metabolisme fase 1 mengubah DMBA menjadi radikal DMBA-3,4-diol-1,2-epoksida (DMBA-DE) yang bersifat destruktif, hepatotoksik, serta menginduksi peningkatan *Reactive Oxygen Species (ROS)* dalam sel secara berlebihan [5, 6].

Radikal tersebut bereaksi dengan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) pada membran sel hepar sehingga menghasilkan peroksidasi lipid. Proses tersebut selanjutnya mengubah struktur dan fungsi membran sel hepar berupa meningkatnya permeabilitas membran sel, diikuti oleh influx massif kalsium, hingga kematian sel [7, 8]. Malondialdehid (MDA) merupakan salah satu produk akhir peroksidasi PUFA di dalam sel. Peningkatan produksi MDA dalam sel hepar dapat digunakan sebagai indikator adanya kerusakan sel atau jaringan akibat meningkatnya peroksidasi lipid [9].

Proses peroksidasi lipid dapat dicegah melalui pemberian antioksidan eksogen. Salah satu antioksidan eksogen alami yang telah diteliti memiliki aktivitas antioksidan tinggi yaitu brokoli (*Brassica oleracea L. var. italica*). Ekstrak etanol brokoli dengan metode maserasi mempunyai aktivitas antioksidan tertinggi dengan nilai IC_{50} sebesar 8,36 $\mu\text{g/ml}$ dan kadar flavonoid total terbesar [10]. Aktivitas dan komponen antioksidan ekstrak etanol brokoli tersebut diharapkan dapat memberikan efek hepatoprotektif terhadap induksi DMBA yang ditandai dengan penurunan kadar MDA

hepar. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan efek hepatoprotektif pada pemberian ekstrak etanol brokoli (*Brassica oleracea L. var. italica*) terhadap kadar MDA hepar tikus putih galur wistar 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 Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Laboratorium Biokimia dan Biomolekular Fakultas Kedokteran Universitas Jember, serta Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember.

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 24 ekor tikus wistar jantan umur 2-3 bulan, berat badan 100-200 gram, dan kondisi fisik sehat. Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *simple random sampling*, kemudian dibagi menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok terdiri atas 4 ekor tikus. Kelompok kontrol normal (K) dan kelompok kontrol negatif (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 (K) diinduksi DMBA 15 mg/kgBB dalam 1 ml *corn oil* secara per oral, *single dose*.

Sampel jaringan hepar diambil pada hari ke-12. Sebanyak 1 ml homogenat hepar *disentrifuge* dan bagian supernatan diambil untuk analisis kadar MDA hepar. Kadar MDA hepar diukur menggunakan *MDA ELISA Kit Elabscience*. Setelah pengambilan sampel, bagian hewan coba yang tidak dipakai dikremasi. Data dianalisis menggunakan uji *One Way Anova* dilanjutkan dengan *Post Hoc Test LSD* dengan taraf kepercayaan 95%.

Hasil Penelitian

Hasil rata-rata kadar MDA hepar (ng/ml \pm SD) disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata Kadar MDA Hepar Tikus

Kelompok	Rata-rata Kadar MDA Hepar (ng/ml \pm SD)
Kontrol Normal	22,0304 \pm 5,5049
Kontrol Negatif	60,0065 \pm 5,2880
Dosis 250 mg/kgBB	33,9981 \pm 4,0214
Dosis 500 mg/kgBB	27,9162 \pm 3,2425
Dosis 1000 mg/kgBB	26,6487 \pm 3,1053
Dosis 2000 mg/kgBB	24,0169 \pm 4,3663

Penurunan rata-rata kadar MDA hepar terhadap kelompok kontrol negatif disajikan pada Tabel 2. Kelompok kontrol negatif merupakan kelompok tanpa pemberian ekstrak etanol brokoli.

Tabel 2. Persentase Penurunan Rata-Rata Kadar MDA Hepar

Kelompok Perlakuan	Penurunan Rata-Rata MDA (ng/ml)	Persentase Penurunan Rata-Rata MDA (%)
Dosis 250 mg/kgBB	26,0084	43,34
Dosis 500 mg/kgBB	32,0903	53,48
Dosis 1000 mg/kgBB	33,3578	55,59
Dosis 2000 mg/kgBB	35,9895	59,98

Uji *One Way Anova* pada penelitian ini menunjukkan bahwa nilai rata-rata kadar MDA hepar antarkelompok memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,001$). Hasil uji LSD kadar MDA hepar antara kelompok kontrol normal dan kontrol negatif menunjukkan bahwa induksi DMBA dosis 15 mg/kgBB menyebabkan peningkatan kadar MDA hepar ($p < 0,001$). Uji LSD kadar MDA hepar antara kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan dosis 250, 500, 1000 dan 2000 mg/kgBB menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol brokoli mampu menurunkan kadar MDA hepar tikus wistar yang diinduksi DMBA ($p < 0,001$). Uji LSD kadar MDA hepar antara kelompok kontrol normal dan kelompok dosis 250, 500, 1000 dan 2000 mg/kgBB menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol brokoli dosis 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB dan 2000 mg/kgBB

mampu menurunkan kadar MDA hepar hingga mendekati kontrol normal, sedangkan pada dosis 250 mg/kgBB terjadi penurunan kadar MDA hepar, akan tetapi belum mendekati kadar MDA hepar kontrol normal.

Pembahasan

Induksi DMBA dosis 15 mg/kgBB menyebabkan peningkatan kadar MDA hepar, dengan estimasi DMBA mampu bekerja sebagai hepatotoksik yaitu 96 jam. Rata-rata kadar MDA hepar meningkat hingga mencapai 60,0065 \pm 5,2880 ng/ml, sedangkan rata-rata kontrol normal hanya sebesar 22,0304 \pm 5,5049 ng/ml. Hasil ini mendukung penelitian sebelumnya bahwa induksi DMBA dosis 15 mg/kgBB *single dose* per oral pada tikus menyebabkan peningkatan kadar MDA menjadi 3,44 \pm 0,07 nmol/g jaringan hepar dari kelompok normal sebesar 3,24 \pm 0,04 nmol/g jaringan hepar [11].

Mekanisme peningkatan kadar MDA tersebut didasari oleh konversi DMBA menjadi senyawa yang reaktif setelah mengalami metabolisme di hepar. Alur metabolisme DMBA melalui aktivasi enzim sitokrom P450. Enzim sitokrom P450 CYP1A1 atau CYP1B1 dan enzim mikrosomal hidrolase pada metabolisme fase 1 mengubah DMBA menjadi DMBA-3,4-diol-1,2-epoksida (DMBA-DE) yang bersifat destruktif, hepatotoksik, serta menginduksi peningkatan *Reactive Oxygen Species (ROS)* dalam sel secara berlebihan [5, 6]. Radikal tersebut bereaksi dengan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) pada membran sel hepar. Fosfolipid dan glikolipid merupakan *lipid bilayer membrane* yang mengandung asam lemak tak jenuh ganda dan rentan teroksidasi sehingga menimbulkan reaksi berantai yang disebut peroksidasi lipid [12]. MDA merupakan salah satu produk akhir peroksidasi PUFA di dalam sel. Oleh sebab itu, terjadinya reaksi peroksidasi lipid pada membran sel hepar akan meningkatkan produksi senyawa MDA dalam sel hepar [13]. Jumlah MDA dapat digunakan sebagai indikator adanya kerusakan sel atau jaringan akibat peningkatan aktivitas peroksidasi lipid [9].

Pemberian ekstrak etanol brokoli pada dosis 500, 1000, dan 2000 mg/kgBB dalam penelitian ini mampu memberikan efek hepatoprotektif terhadap DMBA. Efek hepatoprotektif tersebut ditandai dengan penurunan kadar MDA hepar hingga mendekati kontrol normal. Besar dosis yang diberikan berbanding lurus dengan penurunan kadar MDA hepar. Sedangkan pada dosis 250 mg/kgBB, terjadi penurunan rata-rata kadar MDA hepar sebesar 26,0084 ng/ml atau sebesar 43,34%, akan tetapi belum mendekati

kadar MDA hepar kelompok normal. Dosis 250 mg/kgBB dalam penelitian ini dikatakan belum mampu memberikan efek hepatoprotektif terhadap DMBA. Hal ini dipengaruhi oleh jumlah flavonoid, dimana kandungan flavonoid yang semakin banyak akan mempengaruhi efektivitas penurunan kadar malondialdehid hepar [14].

Pemberian ekstrak etanol brokoli mampu menurunkan kadar MDA hepar tikus wistar yang diinduksi DMBA. Hasil ini mendukung penelitian sebelumnya bahwa pemberian ekstrak brokoli pada tikus yang diinduksi CCl_4 menunjukkan penurunan yang signifikan pada enzim-enzim hepar (AST, ALT, ALP), kadar bilirubin dan MDA jaringan hepar tikus, serta memperlihatkan efek hepato-protektif pada pemeriksaan histopatologis [15]. Ekstrak etanol brokoli dengan metode maserasi mempunyai kadar flavonoid total paling tinggi dan aktivitas antioksidan tertinggi dengan nilai IC_{50} sebesar 8,36 $\mu\text{g/ml}$ [10]. Hasil pengujian fitokimia pada brokoli terdapat kandungan quercetin dan kaempferol yang merupakan salah satu zat aktif flavonoid sebesar 0,03-10,85 mg/100 g dan 0,24-13,20 mg/100 g; dimana quercetin memiliki fungsi untuk mencegah bahaya oksidasi sel, lipid dan DNA oleh radikal bebas [16, 17].

Flavonoid berfungsi sebagai *chain breaking antioxidant* atau pemutus reaksi berantai dari radikal bebas [18]. Penambahan antioksidan sekunder berupa flavonoid mampu menghambat reaksi peroksidasi lipid pada tahap inisiasi maupun propagasi. Pada tahap inisiasi, flavonoid memberikan donor atom hidrogen dari gugus hidroksilnya pada radikal lipid sehingga radikal tersebut bersifat stabil. Pada tahap propagasi, flavonoid memberikan donor atom hidrogen pada radikal hidroperoksida. Hasil reaksi propagasi tersebut berupa hidroperoksida lipid non-radikal serta turunan radikal antioksidan. Radikal antioksidan yang terbentuk pada reaksi tersebut memiliki keadaan yang lebih stabil dibandingkan dengan radikal lipid, tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipid lain dan membentuk radikal lipid baru. Kestabilan ini menyebabkan terhentinya reaksi berantai peroksidasi lipid [19].

Berdasarkan hasil penelitian ini, diketahui bahwa terdapat perbedaan efek hepatoprotektif pada pemberian ekstrak etanol brokoli terhadap kadar MDA hepar tikus putih galur wistar yang diinduksi DMBA. Efek hepatoprotektif ekstrak etanol brokoli terhadap DMBA ditandai dengan penurunan kadar MDA hepar hingga kadarnya mendekati kontrol normal, yakni pada dosis 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 2000 mg/kgBB. Pemberian ek-

strak etanol brokoli dosis 250 mg/kgBB menunjukkan penurunan kadar MDA hepar, namun kadarnya masih belum mendekati kontrol normal, sehingga dosis 250 mg/kgBB dikatakan belum mampu memberikan efek hepatoprotektif terhadap DMBA.

Simpulan dan Saran

Terdapat perbedaan efek hepatoprotektif pada pemberian ekstrak etanol brokoli terhadap kadar MDA hepar tikus putih galur 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 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] Fessenden RJ, Fessenden JS. Kimia Organik, Jilid 1. Edisi Ketiga. Terjemahan Aloysius Hadyana Pudjaatmaka Ph.D. Jakarta: Erlangga; 1986.
- [2] CDC. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals 2009. US: Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention; 2009.
- [3] Zhang Y, Shu T. Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. *J. atmospheric environment*. 2009; 43: 812-819.
- [4] Conney AH. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G.H.A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res*. 1982; 42 (12): 4875-4917.
- [5] Gao J, Lauer FT, Mitchaell LA, Burchiel SW. Microsomal epoxide hydrolase is required for DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene)-induced immuno-toxicity in mice. *J. Toxicol Sci*. 2007; 98(1): 37-44.
- [6] Adetyara YV, Oktavianie DA, Roosdiana A. Pengaruh Induksi Multiple Low Dose (MLD) DMBA (7,12-Dimethylbenz(a)anthracene) terhadap Ekspresi Sitokrom P450 dan Gambaran Histopatologi Hepar dalam Pembuatan Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Ca Mammarie. *Student Journal Vet. School UB*. 2012; 10: 1-8.

- [7] El Gerbed MSA. Silymarin, Protects Against DMBA (7,12-Dimethyl benz(a)anthracene)-Induced Hepatotoxicity in Albino Rats. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Science*. 2013; 4(3): 1534-1548.
- [8] Haki M. Efek Ekstrak Daun Talok (*Muntingia calabura L.*) Terhadap Aktivitas Enzim SGPT Pada Mencit Yang Diinduksi Karbon Tetraklorida. *Digital Library UNS*. 2009; 11-12.
- [9] Utari DM. Efek Intervensi Tempe Terhadap Profil Lipid, Superoksida Dismutase, LDL Teroksidasi dan Malondialdehyde Pada Wanita Menopause. *IPB Scientific Repository*. 2011; 108-115.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Panut I. Hubungan Antara Malondialdehid dengan eLFG Pada Pasien Diabetes Melitus Tipe 2 RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo. *Jurnal Perpustakaan Universitas Indonesia*. 2012; 1-47.
- [13] Winarsi H. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius; 2007.
- [14] Yoshida, Ushida, Ishijima, Suganuma, Inakuma, Yajima et al. Broccoli sprout extract induces detoxification-related gene expression and attenuates acute liver injury. *World Journal of Gastroenterology*. 2015; 21(35): 10091-10103.
- [15] Al Howriny. Evaluation of Hepato-protective Activity of Broccoli. *Pharmacognocny [Internet]*. 2008 [cited 2015 Oct 02]; 2(1):145-156. Available from:http://pubget.com/paper/pgtmp_e4d7ed18bd3f84aa49bfded1e5f56815.html
- [16] Lingga L. *Cerdas Memilih Sayuran*. Cetakan Pertama. Jakarta: PT AgroMedia Pustaka; 2010.
- [17] Koh, Wimalasiri, Chassy, Mitchell AE. Content of Ascorbic Acid, Quercetin, Kaempferol and Total Phenolics In Commercial Broccoli. *J. of Food Composition and Analysis*. 2009; 22(7-8): 637-643.
- [18] Huang C, Tso H, Chang T. Antioxidant Activities of Various Fruits and Vegetables Produced in Taiwan. *Int J Food Sci Nutr*. 2004; 55(5): 423-429.
- [19] Gordon M. The Mechanism of Antioxidant Action in Vitro. In: Hudson BJB, editor. *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science; 1990. p. 1-18.