

Pengaruh ekstrak daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*) terhadap kadar metil merkuri darah dan karakteristik eritrosit tikus putih pasca pemaparan metil merkuri klorida

The effect of *sambung nyawa* (*Gynura procumbens*) leaves extract to methyl mercury concentration in blood and characteristics of erythrocyte of rat after exposed by methyl mercury chloride.

WIWIK WIDYAWATI, WIRYANTO, SHANTI LISTYAWATI

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 5 Februari 2007. Revisi disetujui: 27 Februari 2007.

Abstract. Widyawati W, Wiryanto, Listyawati S. 2007. *The effect of sambung nyawa (Gynura procumbens) leaves extract to methyl mercury concentration in blood and characteristics of erythrocyte of rat after exposed by methyl mercury chloride. Biofarmasi 5: 26-37.* Methyl mercury is the most toxic kind of mercury that has been used in society on various levels since a long time ago. Naturally, methyl mercury is produced from the methanogenic bacteria's methylation process of inorganic mercury on aquatic sediment. The existence of methyl mercury in the district area will be toxic if it enters the organism's body. The research aimed to study the effect of *sambung nyawa (Gynura procumbens)* (Lour) Merr.) leaves extract to methyl mercury concentration in blood and the characteristics of erythrocyte of rat (*Rattus norvegicus* L.) after being exposed by methyl mercury chloride, and to study the most effective dose of *sambung nyawa (Gynura procumbens)* (Lour) Merr.) leaves extract to reduce the concentration of methyl mercury in blood and to repair the characteristics of erythrocyte after exposed by methyl mercury chloride. The research used a Completely Random Design with six groups; each group consisted of 4 repetitions. The treatments of each group were aqua dest 2.5 ml (placebo), methyl mercury chloride 2.99 mg/kg BW (negative control), L-Cysteine 5.4 mg/kg BW (positive control), and the extract of *sambung nyawa* leaves 1.945, 3.889, and 5.834 g/kg BW. The observation included the concentration of methyl mercury in blood, hemoglobin concentration, erythrocyte number, and Packed Cell Volume (PCV), which was analyzed by Analysis of Variance (ANOVA) and continued with Duncan Multiple Range Test (DMRT) at a significance level of 5%. The morphology of erythrocyte observation was analyzed qualitatively. The research showed that the extract of *sambung nyawa* leaves at doses of 1.945, 3.889, and 5.834 g/kg BW affected the reduction of the concentration of methyl mercury in the blood significantly and repaired the characteristics of the erythrocyte. The extract of *sambung nyawa* leaves that had the highest effectiveness to reduce the methyl mercury concentration in blood and repair erythrocyte's characteristics was on a dose of 5.834 mg/kg BW.

Keywords: Erythrocyte, *Gynura procumbens*, methyl mercury chloride, *sambung nyawa*

PENDAHULUAN

Dalam kehidupan sehari-hari, manusia terancam oleh zat kimia berbahaya yang terpapar secara langsung maupun tidak langsung. Sedikitnya 50.000 jenis zat kimia saat ini telah digunakan oleh manusia dan oleh karena tidak terhindarkan maka manusia harus menyadari bahaya yang ditimbulkannya (Darmansjah 1995).

Merkuri (Hg) merupakan logam berat yang umumnya bersifat toksik dan cukup berperan pada polusi lingkungan. Toksisitas merkuri tergantung pada bentuk senyawa kimia dan tempat pemaparannya (Beim dan Groshva 1991). Dari hasil pengujian toksisitas diketahui bahwa merkuri organik, khususnya metil merkuri, lebih toksik dibanding jenis merkuri yang lain (Oda dan Ingle 1981; Beayens 1992). Metil merkuri bersifat lipofilik sehingga dapat dengan mudah melintasi sawar darah-otak dan menyebabkan kerusakan pada sistem saraf pusat (Athena et al. 1992; Darmono 1995; Lu 1995; Katzung 1997;

Hodgson dan Levi 2000). Gejala-gejala saraf terjadi pada tikus yang diberi perlakuan metil merkuri selama 10-90 hari dengan dosis kumulatif 100 mg/kg BB (Buck dan Osweiler 1976).

Metil merkuri merupakan salah satu pencemar makanan utama. *Intake* harian metil merkuri diperkirakan 4 µg/hari, terutama melalui konsumsi ikan (*US Public Health Service* 1988). Merkuri yang diserap oleh dalam tubuh akan didistribusikan dan ditimbun dalam jaringan tubuh (Fujiki 1973). Metil merkuri akan berikatan dengan eritrosit dalam bentuk Hg²⁺ (Buck dan Osweiler 1976). Di dalam eritrosit, Hg²⁺ dengan cepat akan membentuk senyawa kompleks bersama senyawa organik (Taras et al. 1971).

Berbagai zat toksik dapat menyebabkan perubahan pada eritrosit, *Packed Cell Volume*, dan hemoglobin (Hariono 1994). *Lethal Dose 50* (LD50) metil merkuri yang diberikan pada tikus per oral adalah 29,9 mg/kg BB

dan toksisitas akutnya meliputi efek neurologi, yaitu perubahan tingkah laku dan kematian sel otak.

Sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour) Merr.) merupakan salah satu jenis tumbuhan yang daunnya banyak digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional (Sudarto 1990). Dari hasil isolasi flavonoid daun sambung nyawa didapatkan 2 macam senyawa flavonoid, yaitu kaempferol (suatu flavonol), flavonol, dan auron (Sugiyanto et al. 1994). Kemampuan daun sambung nyawa dalam mengkelat/mengikat ion logam berat merkuri diduga karena keberadaan flavonoid (Afana's et al. 1989; Bors et al. 2000; Szymusiak dan Zielinski 2000).

Daun sambung nyawa sering digunakan untuk mengobati berbagai penyakit, namun penelitian lebih lanjut mengenai khasiat tanaman ini masih harus dilakukan. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian secara eksperimental tentang khasiat ekstrak daun sambung nyawa terhadap kadar metil merkuri dalam darah dan karakteristik eritrosit tikus putih pasca pemaparan metil merkuri klorida per oral, meliputi jumlah dan morfologi eritrosit, hematokrit/*Packed Cell Volume*, serta kadar hemoglobin.

Tujuan Penelitian ini adalah: (1) mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun sambung nyawa (*G. procumbens*) terhadap kadar metil merkuri dalam darah dan karakteristik eritrosit tikus putih (*R. norvegicus* L. strain Wistar) pasca pemaparan metil merkuri klorida per oral, serta (2) mengetahui dosis ekstrak daun sambung nyawa yang efektif untuk menurunkan kadar metil merkuri dalam darah dan memperbaiki karakteristik eritrosit tikus putih pasca pemaparan metil merkuri klorida per oral.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan April sampai dengan Juli 2006 yang meliputi pembuatan ekstrak, pemberian perlakuan pada hewan percobaan, pengukuran kadar metil merkuri dan kadar hemoglobin dalam darah, penghitungan jumlah eritrosit, pengukuran hematokrit/*Packed Cell Volume*, pembuatan preparat apus darah, serta pengamatan hasil penelitian.

Daun sambung nyawa yang digunakan dalam penelitian berasal dari Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO) Tawangmangu, Karanganyar, Surakarta. Pembuatan ekstrak daun sambung nyawa dilakukan di Laboratorium Pusat MIPA Sub Laboratorium Biologi, Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Pemeliharaan dan pemberian perlakuan pada tikus dilakukan di Layanan Penelitian Praktikum dan Pengembangan Hewan Percobaan, Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LP3HP-LPPT) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pengukuran kadar metil merkuri dalam darah tikus uji dilakukan di Laboratorium Balai Penyelidikan Penyakit Veteriner (BPPV) Wates, Yogyakarta. Sementara itu, pengukuran kadar hemoglobin dalam darah, penghitungan jumlah eritrosit, pengukuran hematokrit/*Packed Cell Volume*, pembuatan preparat apus darah, dan pemotretan preparat apus darah dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Bahan dan alat

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun sambung nyawa meliputi blender, alat potong, pipet ukur, *magnetic stirrer*, *hot plate*, neraca analitik, kertas saring, Erlenmeyer ukuran 500 ml, batang pengaduk, *rotary evaporator*, corong, oven, pipet ukur, pipet volume, dan desikator. Alat yang digunakan untuk perlakuan terhadap hewan uji meliputi *disposable syringe* 2,5 ml, *canule*, kandang untuk pemeliharaan tikus, dan tempat air minum. Alat yang digunakan untuk pengambilan sampel darah yaitu kapiler hematokrit/mikrohematokrit, cangkir porselin ukuran 100 ml, timbangan elektrik, pipet, dan tabung Eppendorf. Alat yang digunakan untuk pengukuran kadar metil merkuri dalam darah meliputi oven merek Fisher Scientific, lumpang porselin, neraca analitik, pipet, labu ukur, Erlenmeyer, corong, kertas saring Whatman No.42, alat Gorsuch dengan modifikasi, spektrometer, serapan atom perkin Elmer 3110 dengan panjang gelombang 253,6 nm yang dilengkapi dengan sistem uap dingin/MHS-10. Alat yang digunakan untuk pengukuran kadar hemoglobin yaitu *Kit Hb Merck* 3317. Alat yang digunakan untuk penghitungan jumlah eritrosit yaitu hematokrit, pipet volumetrik 0,5 ml, 2 ml, dan 4 ml, kamar hitung *Double Improved Neubauer*, kaca penutup, dan mikroskop. Alat yang digunakan untuk penghitungan hematokrit/*Packed Cell Volume* yaitu mikrohematokrit, *microcapillary reader*, dan sentrifus. Alat yang digunakan untuk pembuatan dan pengamatan preparat apus darah yaitu kaca objek ukuran 25x75 mm², rak kaca objek, kapas, kertas label, dan mikroskop cahaya yang terhubung dengan kamera Nikon Eclipse E 400.

Sementara itu, bahan yang diperlukan untuk pembuatan ekstrak yaitu daun sambung nyawa yang besar dan sehat (nomor 3 dari pucuk), etanol 95%, dan akuades. Bahan untuk perlakuan yaitu tikus putih jantan (*R. norvegicus*) strain Wistar umur 2 bulan dengan berat rata-rata 200 g sebanyak 24 tikus, Par G pelet sebagai pakan tikus, akuades, air minum, dan L-sistein. Bahan untuk pengambilan sampel darah adalah NaEDTA 1%. Bahan untuk pengukuran kadar metil merkuri dalam darah yaitu sampel darah tikus uji, air bebas mineral, CH₃Hg⁺ 10 g/L dalam metanol yang berasal dari CH₃HgCl, HCl 1 M, NaBH₄ 2,5% (b/v), H₂SO₄ p.a. 96%, HNO₃ p.a. 65%, H₂O₂ p.a. 30%, KMnO₄ 5%, NaOH 1% (b/v), dan HNO₃ 1,5% (v/v). Bahan untuk pengukuran kadar hemoglobin yaitu larutan Drabkin yang terdiri atas natrium bikarbonat 1 g, kalium sianida 50 mg, kalium ferrisianida 200 mg, dan akuades 1000 ml. Bahan untuk penghitungan jumlah eritrosit adalah larutan Hayem. Bahan untuk pembuatan preparat apus darah meliputi metanol, air mengalir, dan zat warna Giemsa (1 gram dalam 10 ml metanol).

Rancangan percobaan

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan rancangan percobaan berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan uji dibagi dalam 6 kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 4 ulangan.

Cara kerja

Persiapan hewan uji

Sebelum perlakuan, tikus putih jantan berumur 2 bulan dengan berat badan rata-rata 200 g diadaptasikan terlebih dahulu pada kondisi laboratorium selama 1 minggu dengan diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Tikus-tikus tersebut dipelihara di dalam kandang perlakuan yang masing-masing terdiri dari 4 tikus (total perlakuan 24 tikus putih jantan).

Penimbangan berat badan tikus

Sebelum pemberian bahan uji per oral, tikus uji ditimbang berat badannya lebih dahulu untuk mengetahui berat awal. Penimbangan berat badan dilakukan 2 hari sekali untuk mengetahui perubahan berat badan.

Pembuatan ekstrak daun sambung nyawa

Daun yang telah dibersihkan dari kotoran dicuci dengan akuades lalu dikeringanginkan selama satu malam, selanjutnya daun dimasukkan ke dalam oven bersuhu 37-40°C sampai daun menjadi kering. Daun yang telah kering lalu dipotong kecil-kecil dan diblender. Serbuk daun yang diperoleh dari hasil pembenderan lalu dimaserasi dengan larutan etanol 95% selama 24 jam. Setelah itu, filtrat diperoleh dengan menyaring menggunakan kertas saring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu maksimal 60°C dengan kecepatan putar 150 per menit. Ekstrak lembek yang diperoleh kemudian dikeringkan dalam desikator hingga diperoleh ekstrak kering. Ekstrak kering tersebut kemudian digunakan untuk perlakuan kepada hewan uji (Sudarto 1990).

Penentuan dosis

Penentuan dosis Metil Merkuri Klorida/MMK (CH_3HgCl). Berdasarkan nilai LD_{50} metil merkuri yang diberikan pada tikus per oral sebesar 29,9 mg/kg BB (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry* 1989) maka batas aman yang digunakan adalah 10% dari LD_{50} , yaitu 2,99 mg/kg BB. Dosis ini sebelum diberikan pada tikus harus dilarutkan terlebih dahulu dengan akuades.

Penentuan dosis ekstrak daun sambung nyawa. *Lethal Dose 50* (LD_{50}) untuk ekstrak daun sambung nyawa yang terlarut dalam etanol per oral pada mencit adalah sebesar 5,556 g/kg BB (Eva et al. 1993). Dosis yang digunakan sebesar 0,556 g/kg BB yang diperoleh dari 10% LD_{50} ekstrak daun sambung nyawa. Dosis tersebut adalah dosis untuk mencit. Berdasarkan tabel konversi didapatkan faktor konversi dari mencit (20 g) ke tikus (200 g) adalah 7 (Lourence dan Bacharach 1964), sehingga didapatkan dosis terapi untuk tikus sebesar 3,889 g/kg BB yang diperoleh dari hasil perhitungan (0,556 g/kg BB x 7). Ekstrak daun sambung nyawa tersebut dilarutkan dalam akuades terlebih dahulu sebelum diberikan pada tikus. Dosis yang diperoleh kemudian divariasikan menjadi 0,5; 1,0; dan 1,5 kali lipatnya. Jadi, dosis yang digunakan dalam perlakuan adalah 1,945; 3,889; dan 5,834 g/kg BB.

Penentuan dosis L-sistein. Terapi untuk mengatasi keracunan merkuri organik adalah dengan memberikan L-sistein dosis 300 mg per hari (Mutschler 1991) per oral selama 10 hari (Chadhq 1995). Dosis tersebut adalah dosis untuk manusia. Berdasarkan tabel konversi didapatkan

faktor konversi dari manusia (70 kg) ke tikus (200 g) adalah 0,018 (Lourence dan Bacharach 1964), sehingga didapatkan dosis terapi untuk tikus sebesar 5,4 mg/kg BB yang diperoleh dari hasil perhitungan (300 mg x 0,018).

Perlakuan hewan uji

Dua puluh empat ekor tikus jantan dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok sebanyak 4 tikus. Tikus uji diberi pakan Par G pelet dan minum secara *ad libitum*. Tiap kelompok diperlakukan selama 20 hari dengan masing-masing kelompok sebagai berikut:

- 1) Kelompok I (plasebo): 2,5 ml akuades selama 20 hari.
- 2) Kelompok II (kontrol negatif): metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB/hari selama 10 hari dan dilanjutkan 2,5 ml akuades selama 10 hari.
- 3) Kelompok III (kontrol positif): metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB/hari selama 10 hari dan dilanjutkan L-sistein 5,4 mg/kg BB/hari selama 10 hari.
- 4) Kelompok IV: metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB/hari selama 10 hari dilanjutkan ekstrak daun sambung nyawa 1,945 g/kg BB/hari selama 10 hari.
- 5) Kelompok V: metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB/hari selama 10 hari dan dilanjutkan ekstrak daun sambung nyawa 3,889 g/kg BB/hari selama 10 hari.
- 6) Kelompok VI: metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB/hari selama 10 hari dan dilanjutkan ekstrak daun sambung nyawa 5,834 g/kg BB/hari selama 10 hari.

Metil merkuri klorida diberikan selama 10 hari (hari ke-1 sampai hari ke-10) untuk menimbulkan akumulasi metil merkuri klorida dalam darah tikus pada kelompok perlakuan II, III, IV, V, dan VI. L-sistein diberikan selama 10 hari, yaitu hari ke-11 sampai hari ke-20 (Chadhq 1995) setelah tikus uji (kelompok perlakuan III) dipapari metil merkuri klorida per oral selama 10 hari.

Pemberian ekstrak daun sambung nyawa dilakukan per oral menggunakan *disposable syringe* 2,5 cc yang ujungnya telah diganti dengan *canule* dan dimasukkan melalui mulut tikus yang telah dipapari metil merkuri klorida selama 10 hari, yaitu pada kelompok perlakuan IV, V, dan VI, setiap hari selama 10 hari (hari ke-11 sampai hari ke-20).

Pengamatan gejala klinis tentang kondisi fisik dan berat badan tikus dilakukan setiap 2 hari sekali selama 20 hari berturut-turut. Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke-21. Darah diambil melalui vena orbitalis di *canthus medialis* mata dan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf yang sudah diisi dengan NaEDTA 1%.

Penanaman kalus pada media perlakuan

Kalus yang diperoleh pada media inisiasi kalus dipindahkan (subkultur) ke dalam media perlakuan dengan menggunakan pinset steril (pemindahan dilakukan pada hari ke-31). Botol kultur ditutup dengan kertas *aluminium foil* dan diletakkan pada rak kultur. Botol kultur diinkubasi pada suhu kamar (25-27°C) dan diberi cahaya berupa lampu neon 10 watt di dalam ruang kultur.

Penghitungan kadar metil merkuri dalam darah dengan spektrometri serapan atom uap dingin sistem batch

Larutan induk merkuri dibuat dengan cara menimbang 1,3539 g HgCl₂ anhidrat, lalu dilarutkan dalam HCl 1 M dan diencerkan hingga volume 1 liter. Larutan standar dibuat dengan cara larutan induk merkuri diencerkan dengan air bebas mineral menjadi larutan standar 10 ppb, 25 ppb, 50 ppb, 100 ppb dan 150 ppb. Pembuatan larutan reduktor dilakukan dengan melarutkan natrium borohidrid (NaBH₄) 0,75 g dalam NaOH 1% (b/v), lalu diencerkan hingga 100 ml dengan NaOH 1% (b/v).

Destruksi sampel dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut. Sampel darah NaEDTA diambil sebanyak 0,2 ml dan dimasukkan ke dalam cangkir porselen yang sudah ditimbang terlebih dahulu, lalu dikeringkan dalam oven sampai benar-benar kering dengan metode kering beku (*dry ice*). Sampel kering yang berbentuk serbuk ditimbang sebanyak 5 g, dimasukkan ke dalam labu leher tiga. Sampel ditambah dengan HNO₃ p.a. 65% dan H₂SO₄ p.a. 96% masing-masing sebanyak 5 ml. Sampel dalam labu alas bulat dihubungkan dengan alat Gorsuch termodifikasi, kemudian dipanaskan pada suhu 60°C selama 30 menit, setelah itu ditambah dengan HNO₃ 5 ml ke dalam sampel. Suhu dinaikkan menjadi 120°C lalu 150°C, pemanasan dilakukan dalam mantel pemanas yang dilengkapi termometer. Jika sampel berubah warna menjadi hitam maka ditambahkan H₂O₂ p.a. 30% tetes demi tetes sampai sampel berwarna jernih. Setelah dingin, sampel disaring dengan kertas saring, lalu diencerkan sampai volume 50 ml dengan air bebas mineral.

Analisis merkuri dilakukan dengan tahap-tahap sebagai berikut. Setelah *Atomic Absorption Spectrofotometri* (AAS) dihidupkan, larutan-larutan standar yang telah disiapkan dengan konsentrasi yang bervariasi, masing-masing diambil 5 ml dan ditambah dengan 5 tetes HNO₃ 1,5% (v/v) dan KMNO₄ 45%, lalu dimasukkan ke dalam botol reaksi pada alat MHS-10 yang terhubung pada AAS Perkin Elmer 3110, lalu diukur absorbansinya dengan 4 kali pengulangan. Untuk larutan sampel dengan cara yang sama seperti pada larutan standar dan diukur absorbansinya.

Pengukuran kadar hemoglobin

Pengukuran kadar hemoglobin dilakukan dengan metode sianmethemoglobin. Sampel darah NaEDTA diambil sebanyak 20 µl, dimasukkan ke dalam larutan Drabkin 5 ml menggunakan mikropipet, dicampur dengan cara dibalik beberapa kali agar hemoglobin lepas, lalu setiap bentuk hemoglobin diubah menjadi bentuk stabil. Setelah 3 menit, absorbansi larutan darah diukur pada gelombang 540 nm, sebagai blanko digunakan larutan Drabkin. Kadar hemoglobin ditentukan dari perbandingan absorbansinya dengan absorbansi standar sianmethemoglobin yaitu: Kadar hemoglobin = absorbansi yang teramati x 36,8 Hb/dl (Gandasoebrata 1992; Tjokronegoro 2000).

Penghitungan jumlah eritrosit

Sampel darah NaEDTA diisap dengan pipet eritrosit sampai tanda garis 1,0 dan larutan pengencer sampai tanda garis 101. Larutan pengencer yang digunakan adalah

larutan Hayem dengan perbandingan 1:200. Sampel darah dicampur selama 1 menit dan dibiarkan selama 3 menit agar eritrosit mengendap. Eritrosit dihitung di dalam kamar hitung *Double Improve Neubauer* pada kelima bidang berukuran sedang yang masing-masing dibagi menjadi 16 bidang kecil, sehingga didapatkan faktor jumlah eritrosit per µl darah menjadi 5000E (E adalah jumlah eritrosit) (Gandasoebrata 1992; Tjokronegoro 2000). Eritrosit diamati dengan mikroskop pada perbesaran 100x.

Pengukuran kadar hematokrit/Packed Cell Volume

Sampel darah NaEDTA diisap menggunakan pipa hematokrit. Tabung ditutup dengan bahan penutup jika volume darah mencapai $\frac{3}{4}$ bagian pipa. Pipa kapiler berisi darah disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Pengukuran dilakukan dengan membandingkan bagian darah yang mengendap dengan seluruh bagian darah yang berada di tabung mikrohematokrit (Benjamin 1987).

Pembuatan preparat apus darah tikus uji

Pembuatan sediaan preparat apus darah dilakukan di atas kaca objek yang telah dibersihkan dengan sedikit metanol, sehingga bebas lemak dan kotoran. Darah ditetaskan pada jarak kurang lebih 2-3 mm dari ujung kaca objek, kemudian dibuat film apusan darah tipis dan rata dengan cara menggeser kaca penghapus secepat mungkin. Kaca penghapus sebelumnya telah diletakkan di depan tetesan darah dengan sudut 30-45°. Pewarnaan dilakukan dengan menggunakan cat warna Giemsa tanpa melakukan fiksasi terlebih dahulu, karena zat warna Giemsa sudah mengandung metanol. Zat warna ditetaskan pada sediaan sebanyak 20 tetes dan dibiarkan 5-12 menit. Zat warna yang berlebihan dibersihkan dengan air suling secara perlahan-lahan, kemudian dikeringkan dalam posisi vertikal.

Analisis data

Analisis yang digunakan berupa analisis kuantitatif dan kualitatif menggunakan program SPSS 12. Analisis kuantitatif digunakan dalam pengamatan data primer, yaitu kadar metil merkuri dan kadar hemoglobin dalam darah, hematokrit/*Packed Cell Volume*, serta jumlah eritrosit. Hasil percobaan dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) dan apabila terdapat beda nyata antar perlakuan maka dilanjutkan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf signifikansi 5%. Data yang diperoleh dari pengamatan preparat apus darah tikus uji dianalisis secara deskriptif. Data kualitatif yang lainnya berupa kondisi fisik dan berat badan tikus uji dijadikan sebagai data pendukung.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metil merkuri sejak lama telah dimanfaatkan dalam berbagai bidang, di antaranya industri pertanian memanfaatkan senyawa merkuri organik untuk perlindungan benih (Katzung 1997) dan pestisida tanaman (Estes et al. 1973), industri pulp dan kertas menggunakan senyawa fenil merkuri asetat untuk mencegah pembentukan kapur pada pulp dan kertas basah selama proses

penyimpanan, sebagai desinfektan benda mati (Clarke et al. 1981), antiseptik (Modell et al. 1976), dan untuk penelitian di laboratorium (Hunter 1969). Penggunaan secara berlebihan dan terus-menerus dapat menyebabkan akumulasi metil merkuri di alam dan masuk ke rantai makanan. Metil merkuri merupakan bahan berbahaya jika masuk ke dalam tubuh. Efek toksiknya tidak hanya didasarkan pada suatu mekanisme reaksi saja, tetapi juga dapat terjadi di berbagai tempat kerja.

Suatu jenis zat kimia dapat menimbulkan efek berbahaya jika kadarnya dalam jumlah cukup besar bersentuhan dengan mekanisme biologi tertentu. Faktor penting yang mempengaruhi potensi aman tidaknya suatu zat kimia adalah hubungan antara dosis (kadar) zat kimia dengan efek yang ditimbulkan (Loomis 1978). Sifat toksik zat kimia tersebut dapat ditunjukkan dengan adanya perubahan fungsional, biokimiawi, atau struktural. Zat kimia dapat masuk ke dalam tubuh melalui berbagai cara. Pada penelitian ini, metil merkuri klorida diberikan pada tikus uji per oral, sehingga zat tersebut akan melalui saluran cerna, masuk ke sistem sirkulasi darah, kemudian ke dalam sel. Dalam kondisi normal, tubuh mampu mengeliminasi xenobiotik melalui proses detoksifikasi, namun jika dosis xenobiotik tersebut melampaui ambang batas maka tubuh tidak dapat melakukan detoksifikasi, sehingga terjadi toksisitas dari xenobiotik tersebut (Schunack et al. 1990; Murray et al. 1999).

Kadar metil merkuri dalam darah

Secara kuantitatif, kadar metil merkuri dapat ditentukan dengan menginterpolasi nilai absorbansi sampel ke dalam kurva larutan standar merkuri atau dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan garis regresi linier dari kurva larutan standar merkuri ($y = 0,0018x + 0,0897$). Rata-rata kadar metil merkuri dalam darah tikus putih setelah 20 hari diberi perlakuan berkadar lebih tinggi dibandingkan tikus kontrol. Kelompok plasebo memiliki rata-rata kadar metil merkuri darah 0 ppm.

Kelompok perlakuan yang hanya diberi metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB menunjukkan kenaikan kadar metil merkuri yang berarti sebesar 1,923 ppm (Tabel 1). Kenaikan kadar metil merkuri dalam darah disebabkan adanya absorpsi metil merkuri klorida di saluran pencernaan yang kemudian ditransportasikan ke eritrosit dan protein plasma. Metil merkuri klorida bersifat lipofil, dapat dengan mudah menembus membran sel tubuh dan terdistribusi di dalam tubuh dengan konsentrasi tertinggi di sistem saraf pusat (lebih dari 10% dari total dosis), yaitu berada dalam bentuk senyawa organik, tetapi di jaringan tubuh yang lain metil merkuri akan diubah dan disimpan dalam bentuk merkuri anorganik dengan konsentrasi tertinggi di hati dan ginjal (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry* 1997). Dengan reaksi oksidasi-reduksi, bentuk merkuri anorganik akan memasuki eritrosit, paru-paru, dan hati dalam bentuk kation divalen (Hg^{2+}). Pemberian metil merkuri klorida selama 10 hari menyebabkan akumulasi metil merkuri dalam tubuh karena adanya pengikatan metil merkuri klorida dengan protein, polisakarida, dan asam amino. Selain itu, metil merkuri klorida mempunyai waktu paruh yang lama sekitar 70 hari

dan sangat sedikit diekskresikan (Berlin 1973; Fujiki 1973).

Kelompok perlakuan yang dilanjutkan dengan pemberian L-sistein 5,4 mg/kg BB menunjukkan penurunan kadar metil merkuri yang berarti yaitu sebesar 1,015 ppm. Dari hasil uji DMRT 5% dapat diketahui bahwa kelompok perlakuan tersebut berbeda nyata dengan kelompok perlakuan II (Tabel 2). L-sistein merupakan asam amino yang mempunyai gugus karboksil dan amino yang digunakan untuk mengatasi keracunan merkuri organik (Mutshler 1991). Prinsip kerja L-sistein dengan cara berinteraksi langsung dengan ion logam Hg^{2+} dalam darah serta jaringan dan mereaktivasi enzim selular yang mengandung gugus sulfidril (Katzung 1997). Senyawa ini mengandung lebih dari 2 gugus elektronegatif yang dapat membentuk ikatan kovalen-koordinat stabil dengan atom logam kation. Kompleks yang terbentuk akan diekskresikan oleh tubuh (Ariens et al. 1994; Katzung 1997). Adapun kompleks yang terbentuk dari reaksi antara L-sistein dengan ion Hg^{2+} dapat dilihat pada Gambar 1.

Kelompok perlakuan yang dilanjutkan dengan pemberian ekstrak daun sambung nyawa dosis 1,945; 3,889; dan 5,834 mg/kg BB memiliki rata-rata kadar metil merkuri berturut-turut sebesar 1,301; 1,136; dan 1,027 ppm. Pemberian ekstrak daun sambung nyawa selama 10 hari menunjukkan penurunan kadar metil merkuri yang berarti (Tabel 2).

Dari hasil uji DMRT 5% diketahui bahwa kelompok perlakuan tersebut berbeda nyata dengan kelompok perlakuan II (kontrol negatif) yang hanya dipapari dengan metil merkuri klorida tanpa dilanjutkan dengan pemberian

Tabel 1. Kelompok perlakuan pada hewan uji

Perlakuan hari ke-	Kelompok Perlakuan					
	I	II	III	IV	V	VI
1	x	v	v	v	v	v
2	x	v	v	v	v	v
3	x	v	v	v	v	v
4	x	v	v	v	v	v
5	x	v	v	v	v	v
6	x	v	v	v	v	v
7	x	v	v	v	v	v
8	x	v	v	v	v	v
9	x	v	v	v	v	v
10	x	v	v	v	v	v
11	x	-	●	*	**	***
12	x	-	●	*	**	***
13	x	-	●	*	**	***
14	x	-	●	*	**	***
15	x	-	●	*	**	***
16	x	-	●	*	**	***
17	x	-	●	*	**	***
18	x	-	●	*	**	***
19	x	-	●	*	**	***
20	x	-	●	*	**	***

Keterangan: x = Pemberian akuades 2,5 ml, v = pemberian metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB dalam 2,5 ml akuades, ● = pemberian L-sistein 5,4 mg/kg BB dalam 2,5 ml akuades, * = pemberian ekstrak daun sambung nyawa 1,945 g/kg BB dalam 2,5 ml akuades, ** = pemberian ekstrak daun sambung nyawa 3,889 g/kg BB dalam 2,5 ml akuades, *** = pemberian ekstrak daun sambung nyawa 5,834 g/kg BB dalam 2,5 ml akuades.

Tabel 2. Rata-rata kadar metil merkuri, nilai hematokrit, hemoglobin dan jumlah eritrosit dalam darah tikus putih (*R. norvegicus*) setelah pemberian perlakuan.

Kelompok Perlakuan	Kadar Metil Merkuri Darah (ppm)	Nilai Hematokrit (%)	Kadar Hg (g/dl)	Jumlah Eritrosit ($10^6/\text{mm}^3$ darah)
I	0 ^a	45,50 ^a	13,128 ^a	8,480 ^a
II	1,923 ^b	41,67 ^a	8,123 ^b	4,230 ^b
III	1,015 ^c	44,50 ^a	10,763 ^c	6,067 ^c
IV	1,301 ^c	43,00 ^a	8,770 ^d	5,720 ^c
V	1,136 ^c	43,00 ^a	9,320 ^e	6,080 ^c
VI	1,027 ^c	43,50 ^a	10,195 ^f	6,697 ^c

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak berbeda nyata antar perlakuan. I = Pemberian akuades 2,5 ml, II = pemberian metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB dalam 2,5 ml akuades, III = pemberian L-sistein 5,4 mg/kg BB dalam 2,5 ml akuades, IV = pemberian ekstrak daun sambung nyawa 1,945 g/kg BB dalam 2,5 ml akuades, V = pemberian ekstrak daun sambung nyawa 3,889 g/kg BB dalam 2,5 ml akuades, VI = pemberian ekstrak daun sambung nyawa 5,834 g/kg BB dalam 2,5 ml akuades.

suatu antidotum, sehingga kadar metal merkuri dalam darah jauh lebih besar karena tidak ada senyawa aktif penurun kadar metil merkuri dalam darah, namun tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan III (kontrol positif) yang dilanjutkan dengan pemberian L-sistein yang merupakan senyawa aktif penurun kadar metil merkuri, sehingga terjadi penurunan kadar metil merkuri yang hampir sama dengan kelompok perlakuan yang dilanjutkan dengan pemberian ekstrak daun sambung nyawa. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak daun sambung nyawa mempunyai kemampuan hampir sama dengan L-sistein. Dosis paling efektif untuk menurunkan kadar metil merkuri dalam darah adalah 5,834 g/kg BB. Dosis ekstrak daun sambung nyawa yang semakin besar mengandung senyawa aktif penurun kadar metil merkuri yang semakin besar juga.

Dari hasil isolasi flavonoid ekstrak daun sambung nyawa, Sudarto (1990) melaporkan keberadaan 2 macam senyawa flavonoid, yaitu kaempferol (suatu flavonol), flavonol, dan auron. Kemampuan ekstrak daun sambung nyawa dalam menurunkan kadar metil merkuri darah karena keberadaan flavonoid-flavonoid di dalamnya. Flavonoid-flavonoid tersebut mengandung gugus fungsi hidroksil sebagai donor elektron, sedangkan ion Hg^{2+} merupakan penerima elektron yang kuat. Adanya cincin aromatik yang sangat elektronegatif pada flavonoid akan menarik ion logam Hg^{2+} yang sangat elektropositif, sehingga ikatan antara ion logam Hg^{2+} dengan flavonoid dapat berupa ikatan kovalen yang disebut dengan kelat. Terbentuknya kelat stabil menyebabkan reaksi kimia biasa sebagai ion logam akan hilang dan dapat menurunkan kadar ion logam toksik dalam jaringan dengan mengikatnya sebagai kelat yang larut dan mudah diekskresikan oleh ginjal. Gugus -OH flavonoid bertindak sebagai ligan yang cenderung akan berikatan koordinasi dengan ion logam membentuk senyawa kompleks kelat, dalam hal ini ligan mempunyai pasangan elektron bebas. Menurut Pauling, atom O mempunyai tingkat

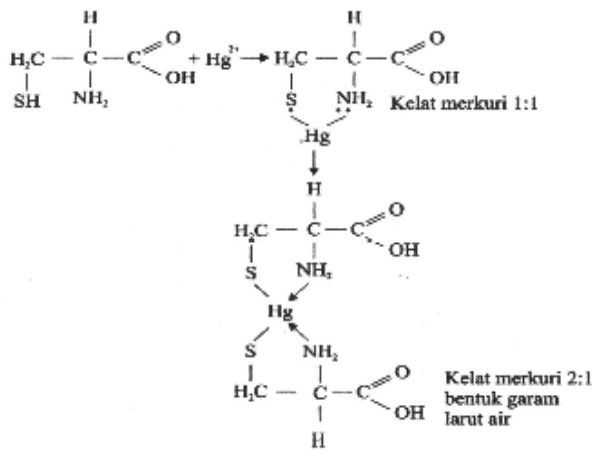
keelektronegatifan yang tinggi, yaitu 3,5. Sebaliknya, ion logam Hg^{2+} merupakan penerima elektron yang sangat kuat, karena termasuk dalam kelompok ion logam yang mempunyai subkulit -d yang terisi penuh dan untuk mencapai susunan elektron gas mulia berikutnya harus menerima 4 pasang elektron (s^2p^2) (Rivai 1995). Akibatnya, ikatan antara ion logam Hg^{2+} dengan ligan dalam flavonoid dapat berupa ikatan kovalen seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2-4.

Penelitian Szymusiak dan Zielinski (2000) yang didukung oleh Afana's et al. (1989) dan Bors et al. (2000) melaporkan bahwa flavonoid jenis quercetin mempunyai kemampuan mengkelat ion logam berikatan divalen, antara lain Mg^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , dan Cu^{2+} . Middleton et al. (2000) menyatakan bahwa flavonoid juga mempunyai kemampuan mengaktifkan dan menginduksi sintesis enzim mula-mula yang terlibat dalam metabolisme berbagai macam xenobiotik yang bersifat lipofil. Lu (1995) mengatakan bahwa metil merkuri bersifat lipofilik sehingga mudah melintasi membran sel yang terdiri atas lapisan biomolekuler yang dibentuk oleh molekul lipid dengan molekul protein. Jika suatu logam telah terikat pada suatu protein maka senyawa tersebut akan diserap secara endositosis dan mendenaturasi protein. Chadhq (1995) menambahkan bahwa metil merkuri akan mengganggu secara seluler dengan cara membuat gugus -SH dalam tubuh menjadi inaktif.

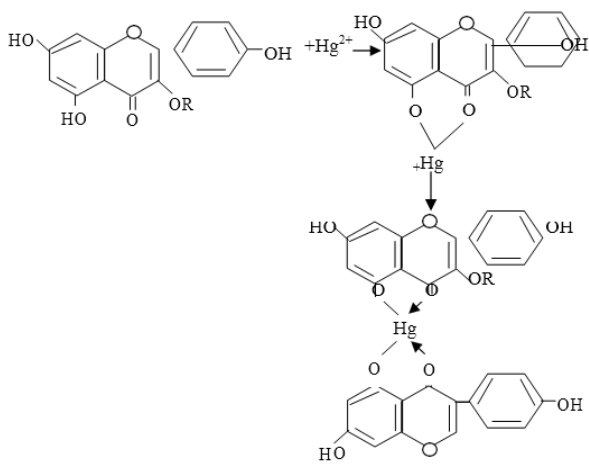
Cook dan Saaman (1996) menyatakan bahwa flavonoid merupakan antioksidan yang potensial mengikat radikal bebas. Cadenas dan Lester dalam Harun dan Syahri (2002) menambahkan bahwa aktivitas antioksidan flavonoid dilakukan dengan mereduksi radikal hidroksil, superoksida, dan radikal peroksil. Yang et al. (2001) telah melakukan penelitian dan menyimpulkan bahwa aktivitas antioksidan flavonoid tergantung pada potensial oksidasi senyawa tersebut dan struktur kimia flavonoid yang berperan dalam aktivitas antioksidan, yaitu struktur O⁻ dihidroksi pada cincin B, ikatan rangkap pada C₂ dan C₃ yang terkonjugasi dengan gugus okso dan adanya gugus hidroksil.

Berdasarkan hasil penelitian ini, kadar metil merkuri dalam darah menurun setelah pemberian ekstrak daun sambung nyawa dalam berbagai variasi dosis. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun sambung nyawa mempunyai kemampuan mengkelat ion logam Hg^{2+} dan menangkap radikal bebas yang dipicu oleh pemberian metil merkuri klorida. Seperti telah diketahui bahwa radikal bebas dalam tubuh mampu berikatan dengan komponen seluler tubuh, sehingga dapat menimbulkan kerusakan pada sel darah merah.

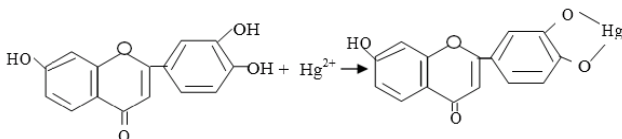
Metil merkuri bersifat menghambat kerja enzim mikrosom dalam retikulum endoplasma (RE) dan mengacaukan struktur RE tersebut (Goering et al. 1987; Lu 1995). Membran RE agranuler (REA) merupakan tempat enzim-enzim yang berperan dalam sintesis lipoprotein dan juga enzim-enzim yang berperan dalam proses detoksifikasi yang sebagian besar adalah sitokrom P-450. Senyawa yang bersifat racun dan berbahaya akan diubah menjadi tidak berbahaya. Di dalam membran REA, toksikan yang bersifat lipofilik akan dibuat inaktif oleh serangkaian reaksi yang umumnya oksidasi menggunakan O₂



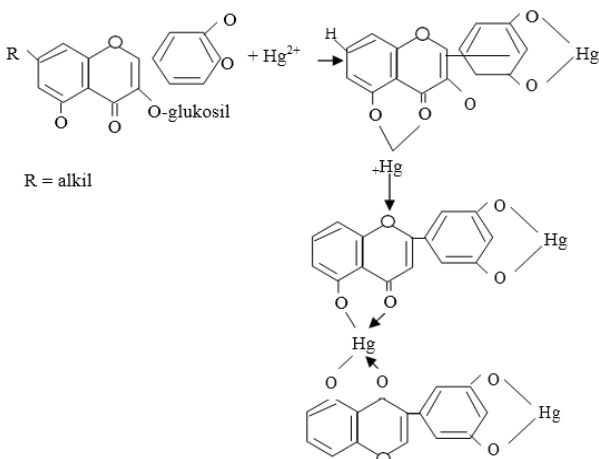
Gambar 1. Reaksi L-sistein dengan ion Hg^{2+} .



Gambar 2. Reaksi kaempferol dengan ion Hg^{2+} .



Gambar 3. Reaksi flavonol dengan ion Hg^{2+} .



Gambar 4. Reaksi auron dengan ion Hg^{2+} .

dan NADPH dengan bantuan katalisator NADPH-sitokrom P-450 reduktase dan sitokrom P-450. Hasil reaksi ini merupakan senyawa yang mudah larut dalam air. Flavonoid mempunyai kemampuan untuk mengaktifkan dan menginduksi sintesis enzim mula-mula yang terlibat dalam metabolisme bermacam-macam xenobiotik yang lipofil (Middleton et al. 2000). Flavonoid alami maupun flavonoid sintetik telah dilaporkan mempunyai efek pada sistem P-450-monooksigenase (Sato dan Omura 1978) yang meliputi induksi sintesis dan aktivasi P-450 spesifik (Wood et al. 1982).

Nilai hematokrit atau *Packed Cell Volume*

Hematokrit adalah perbandingan sel-sel darah merah dalam suatu volume darah tertentu, atau dengan kata lain hematokrit menunjukkan persentase eritrosit dari sejumlah darah. Nilai hematokrit diperoleh dengan prinsip bahwa setelah dilakukan sentrifugasi akan terjadi pengendapan eritrosit yang memisahkannya dari cairan plasma di bagian atas, dengan skala khusus hematokrit dapat diketahui persentase yang ditempati eritrosit (Wulangi 1993). Menurut Benjamin (1987), nilai hematokrit dapat digunakan untuk mengetahui abnormalitas darah dan merupakan cara yang sangat sederhana untuk dilakukan. Nilai ini umumnya sama manfaatnya dengan jumlah eritrosit total.

Nilai hematokrit tikus uji setelah 20 hari diberi perlakuan percobaan bernilai lebih rendah dibandingkan tikus kontrol. Nilai hematokrit tikus putih normal adalah 45-47% (Smith dan Mangkoewidjojo 1988). Dari uji Anava dan DMRT pada taraf signifikansi 5% diketahui bahwa masing-masing kelompok perlakuan tidak berbeda nyata.

Pada pemberian metil merkuri klorida dosis 2,99 mg/kg BB terjadi penurunan nilai hematokrit dibandingkan tikus kontrol (Tabel 2), hal ini menunjukkan adanya kecenderungan tikus untuk mengalami anemia yang ditandai dengan menurunnya konsentrasi eritrosit, dimana anemia yang terjadi masih bersifat regeneratif. Penurunan nilai hematokrit ini terjadi karena pemberian metil merkuri klorida dosis tinggi dapat mempengaruhi kestabilan membran eritrosit. Kerusakan membran sel dapat terjadi setelah pemaparan suatu toksikan. Metil merkuri klorida yang bersifat lipofilik mudah terabsorpsi ke dalam eritrosit melalui membran eritrosit.

Membran eritrosit yang selalu berhubungan dengan metil merkuri klorida akan terganggu kestabilannya akibat perubahan tekanan osmolaritas antara cairan sel dengan plasma, sehingga jumlah eritrosit yang stabil dalam darah hanya sebagian kecil saja, hal ini dapat diketahui dari menurunnya jumlah eritrosit. Pemberian metil merkuri klorida selama 10 hari mampu merusak membran eritrosit dan menyebabkan terjadinya hemolisis pada eritrosit. Membran eritrosit merupakan membran yang berhubungan dengan O_2 . Membran yang berhubungan dengan O_2 sering mengalami proses oksidasi. Radikal bebas yang terbentuk dari metil merkuri klorida yang merusak membran akan berinteraksi dengan O_2 membentuk radikal peroksida, sehingga membran menjadi lemah dan akibatnya persentase eritrosit yang bertahan dalam darah akan menurun. Hal ini didukung oleh penelitian Hariono et al.

(1994) bahwa pemberian metil merkuri pada mencit bunting dan keturunannya menyebabkan penurunan nilai hematokrit pada minggu ke-9.

Pemberian L-sistein selama 10 hari (kelompok III) mampu memperbaiki nilai hematokrit pada tikus uji setelah dipapari metil merkuri klorida selama 10 hari (Tabel 2). Hal ini berarti L-sistein mampu memperbaiki kestabilan membran eritrosit yang semula terganggu akibat pemberian metil merkuri klorida. L-sistein bekerja pada tingkat seluler dan memisahkan unsur ion Hg^{2+} dari radikal -SH dalam enzim jaringan tubuh lalu membawa unsur tersebut ke cairan jaringan, masuk ke plasma, dan akhirnya diekskresikan menuju urine dalam bentuk kompleks yang larut dalam air dan bersifat non toksik. Katzung (1997) menambahkan bahwa zat ini berinteraksi langsung dengan ion logam Hg^{2+} dalam darah dan cairan jaringan serta mereaktivasi enzim seluler yang mengandung gugus -SH.

Pemberian ekstrak daun sambung nyawa selama 10 hari (kelompok IV dan V) mampu memperbaiki nilai hematokrit pada tikus uji setelah terpapar metil merkuri klorida selama 10 hari (Tabel 2). Hal ini berarti ekstrak daun sambung nyawa juga mampu memperbaiki kestabilan membran eritrosit yang semula terganggu akibat pemberian metil merkuri klorida dengan nilai hematokrit tertinggi terdapat pada pemberian ekstrak daun sambung nyawa dengan dosis tertinggi yaitu 5,834 g/kg BB. Hal ini karena kerja flavonoid dalam ekstrak daun sambung nyawa yang mampu mengikat ion logam Hg^{2+} dalam darah menjadi senyawa kompleks non toksik dan dapat dengan mudah diekskresikan dari tubuh melalui urine. Akumulasi metil merkuri yang semula ada dalam tubuh dapat dengan cepat diekskresikan, sehingga tubuh dapat melakukan proses fisiologi yang normal kembali. Hal ini didukung oleh penelitian Gultom (2003) yang mengatakan bahwa flavonoid mampu meningkatkan jumlah hematokrit, hemoglobin, dan eritrosit pada tikus yang diinduksi CCl_4 .

Kadar hemoglobin (Hb)

Hemoglobin adalah komponen eritrosit yang terdiri dari protein globin yang berkombinasi dengan heme, berfungsi sebagai alat transportasi O_2 dan CO_2 . Penetapan kadar tersebut sering dilakukan sebagai pemeriksaan terhadap adanya anemia (Tahono et al. 2000).

Anemia dapat terjadi karena adanya gangguan pada sintesis Hb. Sintesis Hb dimulai dalam eritoblast dan terus berlangsung sampai tingkat retikulosit, dimulai dengan pembentukan senyawa pirol, lalu 4 senyawa pirol bersatu membentuk senyawa protoporfirin yang kemudian berikatan dengan besi membentuk molekul heme. Akhirnya, 4 molekul heme berikatan dengan 1 molekul globin yang merupakan suatu globulin yang disintesis dalam ribosom RE membentuk Hb (Guyton 1991).

Berdasarkan data yang diperoleh, terlihat bahwa rata-rata kadar Hb darah tikus uji setelah 20 hari diberi masing-masing perlakuan lebih rendah dibandingkan tikus kontrol. Dari hasil uji Anava dan DMRT pada taraf signifikansi 5%, diketahui bahwa masing-masing kelompok perlakuan terdapat perbedaan yang signifikan (Tabel 2). Kelompok kontrol memiliki rata-rata kadar Hb darah paling tinggi

sebesar 13,128 g/dl. Kadar Hb pada tikus putih normal adalah 13 g/dl (Smith dan Mangkoewidjojo 1988).

Kelompok perlakuan yang diberi metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB memiliki rata-rata kadar Hb darah paling rendah sebesar 8,123 g/dl. Penurunan kadar Hb darah ini terjadi akibat keluarnya Hb dari eritrosit menuju cairan di sekelilingnya karena dirusak oleh xenobiotik metil merkuri klorida. Selain itu, kondisi tersebut juga disebabkan oleh inaktivasi enzim δ -Amino Levulinic Acid Dehydratase (δ -ALAD). Inaktivasi enzim δ -ALAD tersebut berhubungan dengan peran Fe dalam sintesis Hb, yaitu terletak pada heme. Heme merupakan komponen Hb yang berikatan dengan globin dan merupakan porfirin tipe III (protoporfirin) yang mengandung Fe (Guthrie 1980; Lehninger 1982). Inaktivasi enzim δ -ALAD oleh metil merkuri klorida menyebabkan pembentukan porfobilinogen, uroporfirinogen, dan protoporfirin menjadi terhambat, sehingga heme tidak dapat dihasilkan karena tidak adanya protoporfirin yang mengikat Fe. Metil merkuri klorida merupakan zat lipofilik yang dapat menumpuk di membran sel dan mengganggu transpor O_2 dan glukosa ke dalam sel (Darmono 1995). Pengikatan, pengangkutan, dan pelepasan O_2 oleh Hb tidak tergantung pada eritrosit, tetapi eritrosit memerlukan energi yang diperoleh dari metabolisme anaerobik glukosa. Terganggunya transpor O_2 dan glukosa menyebabkan eritrosit tidak dapat mempertahankan gradien elektrolit normal pada membran plasma, mempertahankan atom Fe dari Hb dalam bentuk divalen, dan mempertahankan gugus -SH dari enzim sel merah dan Hb dalam bentuk aktif. Hal ini didukung oleh penelitian Hariono et al. (1994) yang menyatakan bahwa terjadi penurunan kadar Hb pada mencit yang dipapari metil merkuri karena terjadi inaktivasi enzim δ -ALAD darah melalui pembentukan ikatan kation metil merkuri terhadap gugus -SH.

Kelompok perlakuan yang diberi L-sistein 5,4 mg/kg BB selama 10 hari mampu memperbaiki kadar Hb dalam darah tikus putih setelah dipapari metil merkuri klorida selama 10 hari (Tabel 2). L-sistein mempunyai 2 gugus reaktif terhadap ion logam Hg^{2+} , yaitu gugus sulfhidril (-SH) dan gugus amina (-NH₂) yang dapat membentuk molekul kelat yang mudah diekskresikan.

Pemberian ekstrak daun sambung nyawa selama 10 hari mampu memperbaiki kadar Hb darah tikus putih yang terpapar metil merkuri klorida selama 10 hari. Perlakuan ekstrak daun sambung nyawa pada berbagai dosis menunjukkan peningkatan kadar Hb darah yang sebanding dengan kenaikan dosis ekstrak daun sambung nyawa. Semakin besar dosis ekstrak daun sambung nyawa yang diberikan, kadar Hb darah semakin meningkat. Dosis yang paling efektif meningkatkan kadar Hb darah adalah 5,834 g/kg BB. Perlakuan ini memiliki rata-rata kadar Hb darah yang berbeda nyata satu sama lain (Tabel 2). Dosis ekstrak daun sambung nyawa yang semakin besar terjadi karena mengandung senyawa aktif yang juga semakin besar. Perbaikan kadar Hb belum sampai mendekati kadar Hb pada tikus putih normal, karena eritrosit yang ada baru terbentuk, sehingga Hb yang ada pada eritrosit belum mencapai kadar yang optimal. Jumlah Hb yang belum

stabil menyebabkan kemampuan Hb untuk mengikat O₂ juga belum optimal.

Jumlah eritrosit

Jumlah eritrosit merupakan salah satu parameter penting untuk menilai kesehatan, mengingat perannya yang sangat besar dalam mengangkut O₂ ke seluruh tubuh (Loomis 1978). Berdasarkan data yang diperoleh, terlihat bahwa rata-rata jumlah eritrosit pada tikus putih setelah 20 hari diberi perlakuan lebih rendah dibandingkan tikus kontrol. Jumlah eritrosit pada tikus putih normal adalah $(7,2-9,6) \times 10^6$ sel/mm³ darah (Smith dan Mangkoewidjojo 1988). Kelompok perlakuan yang diberi metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB menunjukkan penurunan jumlah eritrosit yang berarti. Dari hasil uji DMRT 5%, diketahui bahwa kelompok perlakuan ini berbeda nyata dengan kelompok I. Kondisi ini menyebabkan kecenderungan tikus mengalami anemia, karena jumlah eritrosit berada di bawah kisaran normal. Penurunan jumlah eritrosit ini terjadi karena adanya kematian sel induk dan terjadinya perpanjangan interfase antara mitosis yang satu dengan mitosis berikutnya, terutama pada sumsum tulang. Eritrosit mengandung bermacam-macam enzim, di antaranya glutathion tripeptid yang merupakan γ -glutamilsisteinilglisin. Konsentrasi glutathion dalam darah sekitar 1 mmol/L, sebagian besar terdapat dalam eritrosit. Glutathion dapat disintesis dari komponen asam amino dalam eritrosit. Glutathion merupakan pereduksi alami karena mengandung gugus -SH. Eritrosit mengandung reduktase glutathion yang mengkatalisis reduksi glutathion teroksidasi. Substrat kedua untuk enzim ini adalah NADPH. Dalam eritrosit juga terdapat reduktase dehidroaskorbat yang memberi hubungan langsung antara glutathion dan hemoglobin. Metil merkuri klorida akan mengikat secara bolak-balik gugus -SH dalam eritrosit. Reaksi pengikatan ini akan mempengaruhi pembentukan sel-sel darah dalam sumsum tulang dan menghambat pembentukan hemoglobin.

Kelompok perlakuan yang dilanjutkan dengan pemberian L-sistein 5,4 mg/kg BB selama 10 hari menunjukkan kenaikan jumlah eritrosit yang berarti. Dari hasil uji DMRT 5%, diketahui bahwa kelompok perlakuan ini berbeda nyata dengan kelompok II, namun tidak berbeda nyata dengan kelompok IV, V, dan VI (Tabel 2). Peningkatan jumlah eritrosit ini terjadi karena L-sistein mampu mengekskresikan metil merkuri klorida yang terakumulasi dalam tubuh, khususnya dalam eritrosit, sehingga fungsi-fungsi fisiologis dalam tubuh dapat berjalan normal kembali. Penurunan jumlah eritrosit terjadi karena toksisitas ini mempengaruhi terbentuknya eritropoietin dan merangsang terjadinya eritropoiesis dalam sumsum tulang belakang.

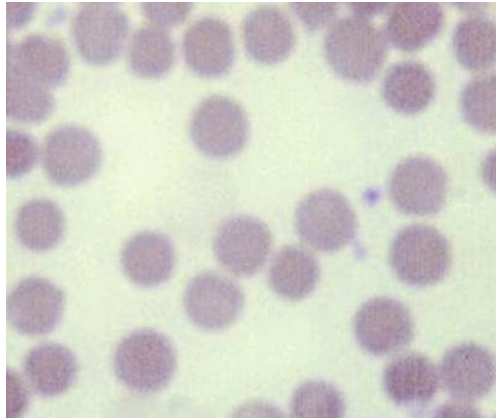
Kelompok perlakuan yang dilanjutkan dengan pemberian ekstrak daun sambung nyawa selama 10 hari menunjukkan kenaikan jumlah eritrosit yang berarti. Dari hasil uji DMRT 5%, diketahui bahwa kelompok perlakuan ini berbeda nyata dengan kelompok II (kontrol negatif) yang hanya dipapari metil merkuri klorida tanpa dilanjutkan dengan pemberian suatu antidotum, sehingga jumlah eritrosit jauh lebih rendah karena tidak ada senyawa aktif yang mampu memperbaiki jumlah eritrosit, namun

tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan III (kontrol positif) yang dilanjutkan dengan pemberian L-sistein yang merupakan senyawa aktif penurun kadar metil merkuri darah, sehingga terjadi perbaikan jumlah eritrosit yang hampir sama dengan kelompok perlakuan yang dilanjutkan dengan pemberian ekstrak daun sambung nyawa. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak daun sambung nyawa mempunyai kemampuan hampir sama dengan L-sistein (Tabel 2). Perlakuan ekstrak daun sambung nyawa dalam berbagai dosis menunjukkan peningkatan jumlah eritrosit sebanding dengan peningkatan dosis ekstrak daun sambung nyawa yang diberikan, sehingga jumlah eritrosit semakin meningkat. Dosis yang paling efektif meningkatkan jumlah eritrosit tikus putih yang terpapar metil merkuri klorida adalah dosis 5,834 g/kg BB. Dosis ekstrak daun sambung nyawa yang semakin besar karena mengandung senyawa aktif yang juga semakin besar untuk memperbaiki jumlah eritrosit. Telah diketahui sebelumnya bahwa tikus yang terpapar metil merkuri klorida selama 10 hari mempunyai kadar hemoglobin dan jumlah eritrosit yang sangat rendah jauh dari normal. Penurunan jumlah eritrosit dapat mempengaruhi terbentuknya eritropoietin dan merangsang terjadinya eritropoiesis. Penurunan kadar hemoglobin darah menyebabkan jumlah O₂ yang ditranspor ke jaringan akan berkurang dan biasanya akan meningkatkan kecepatan pembentukan eritrosit. Hal ini disebabkan jumlah O₂ yang menurun akan mengakibatkan hati melepaskan lebih banyak globulin dan ginjal memproduksi lebih banyak faktor eritropoietik ginjal. Di dalam darah, globulin dan faktor eritropoietik ginjal akan saling mengadakan interaksi membentuk eritropoietin yang kemudian merangsang terjadinya eritropoiesis. Kemampuan flavonoid pada ekstrak daun sambung nyawa dalam memperbaiki jumlah eritrosit pada tikus putih yang terpapar metil merkuri klorida disebabkan oleh kemampuannya dalam mengaktifkan dan menginduksi sintesis enzim mula-mula yang terlibat dalam metabolisme metil merkuri klorida yang merupakan xenobiotik lipofil, seperti yang telah dikemukakan oleh Middleton et al. (2000).

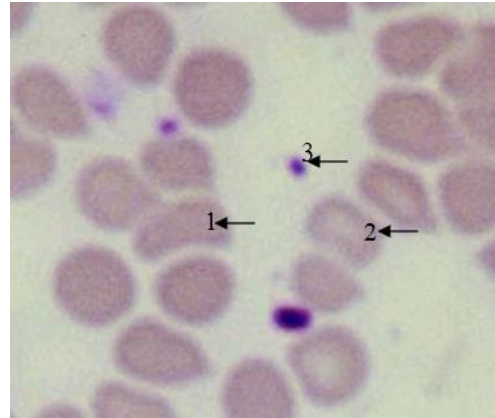
Perubahan morfologi eritrosit

Gambaran morfologi eritrosit merupakan salah satu indikator dari berbagai perubahan patologis dalam tubuh (Leeson et al. 1996). Secara morfologi, eritrosit berbentuk cakram bikonkaf dan jika dilihat pada bidang datar berbentuk bulat. Pada penyakit-penyakit tertentu ditemukan eritrosit-eritrosit yang telah berubah bentuk di dalam peredaran darah. Eritrosit bersifat elastis dan mampu berubah bentuk (Smith dan Mangkoewidjojo 1988).

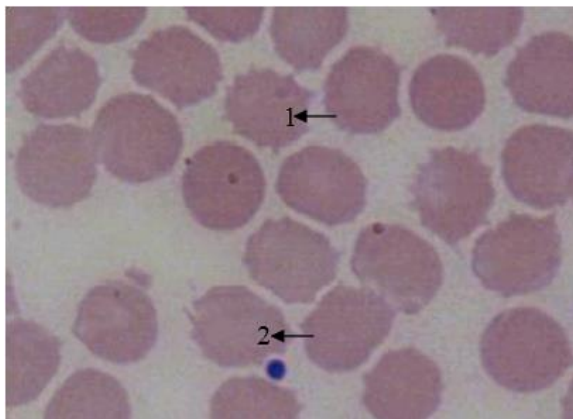
Secara morfologi, setelah 20 hari diberi perlakuan, semua kelompok mengalami perubahan morfologi eritrosit, antara lain terdapat eritrosit berbentuk topi, paku payung, poikilositosis (bentuk bervariasi), dan anulositosis (eritrosit tanpa inti) seperti yang terlihat pada **Gambar 5-10**, kecuali pada kelompok I (plasebo).



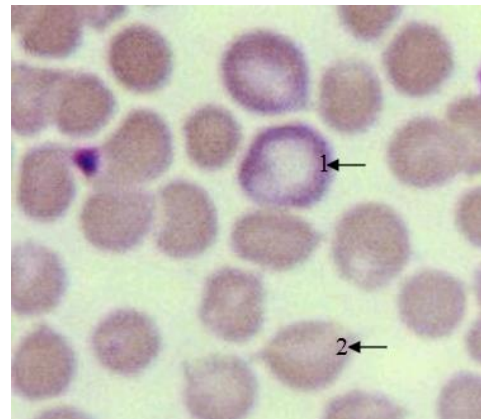
Gambar 5. Morfologi eritrosit tikus putih (*R. norvegicus*) kontrol. Perbesaran: 1000x, Pewarnaan: Giemsa



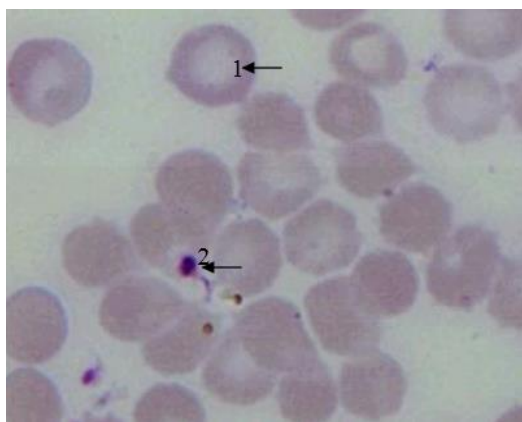
Gambar 8. Morfologi eritrosit tikus putih (*R. norvegicus*) setelah pemberian metil merkuri klorida 2,99 mg/kg dilanjutkan dengan ekstrak daun sambung nyawa 1,945 g/kg. 1 = Eritrosit berbentuk topi, 2 = poikilositosis, 3 = trombosit. Perbesaran: 1000x, Pewarnaan: Giemsa



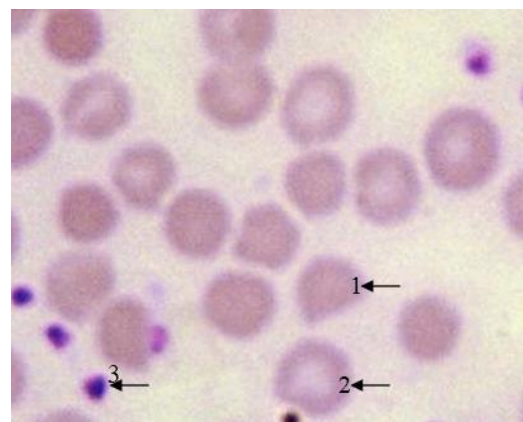
Gambar 6. Morfologi eritrosit tikus putih (*R. norvegicus*) setelah pemberian metil merkuri klorida 2,99 mg/kg. 1 = Eritrosit berbentuk paku payung, 2 = poikilositosis. Perbesaran: 1000x, Pewarnaan: Giemsa



Gambar 9. Morfologi eritrosit tikus putih (*R. norvegicus*) setelah pemberian metil merkuri klorida 2,99 mg/kg dilanjutkan dengan ekstrak daun sambung nyawa 3,889 g/kg. 1 = Anulosisitosis, 2 = eritrosit berbentuk topi. Perbesaran: 1000x, Pewarnaan: Giemsa



Gambar 7. Morfologi eritrosit tikus putih (*R. norvegicus*) setelah pemberian metil merkuri klorida 2,99 mg/kg dilanjutkan dengan L-sistein 5,4 mg/kg. 1 = Anulosisitosis, 2 = trombosit. Perbesaran: 1000x, Pewarnaan: Giemsa



Gambar 10. Morfologi eritrosit tikus putih (*R. norvegicus*) setelah pemberian metil merkuri klorida 2,99 mg/kg dilanjutkan dengan ekstrak daun sambung nyawa 5,834 g/kg. 1 = Eritrosit berbentuk topi, 2 = anulosisitosis, 3 = trombosit. Perbesaran: 1000x, Pewarnaan: Giemsa

Perubahan morfologi eritrosit terjadi karena hemolisis membran eritrosit yang merupakan salah satu membran yang berhubungan dengan O₂ dan sering mengalami oksidasi. Radikal bebas dari metil merkuri klorida bergabung dengan O₂ yang diikat Hb membentuk ikatan radikal peroksida yang kemudian menyerang membran eritrosit, sehingga menyebabkan tidak stabilnya struktur membran tersebut. Metil merkuri klorida yang bersifat lipofilik dapat menumpuk pada membran sel dan mengganggu transport O₂ dan glukosa ke dalam sel. Ion Hg²⁺ akan membentuk kompleks dengan basa-basa fosfolipid dan memperluas permukaan membran, sehingga fungsi membran berubah. Hal ini menyebabkan hilangnya fungsi Hb sebagai pembawa O₂. Selain itu, tanpa adanya glukosa, eritrosit tidak dapat mengganti enzim dan protein membran yang telah usang, sehingga kemampuan memompa ion Na⁺ keluar sel dan menarik air akan menurun, sehingga sel tidak lagi berbentuk bulat.

Pada kelompok perlakuan III, masih terdapat kelainan morfologi pada eritrosit, tetapi lebih sedikit dibanding kelompok perlakuan II, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7 dengan adanya eritrosit yang cenderung berbentuk elips (tidak bulat). Hal ini menunjukkan bahwa L-sistein belum efektif menstabilkan morfologi eritrosit. Ketidakstabilan morfologi eritrosit tersebut disebabkan adanya penyerangan radikal bebas pada membran eritrosit oleh akumulasi metil merkuri klorida. Ikatan radikal bebas-oksigen yang terbentuk dapat menimbulkan stres oksidatif dalam membran sel yang ditunjukkan dengan terbentuknya sel-sel yang tidak normal.

Berdasarkan hasil pengamatan pada Gambar 8-10, terlihat bahwa dengan pemberian ekstrak daun sambung nyawa pada tikus uji pasca pemaparan metil merkuri klorida terdapat sedikit perbaikan pada morfologi eritrosit, dimana kelompok perlakuan VI mempunyai kelainan morfologi eritrosit paling sedikit. Hal ini berarti bahwa perbaikan morfologi eritrosit dengan pemberian ekstrak daun sambung nyawa meningkat seiring dengan meningkatnya variasi dosis. Namun demikian, perbaikan yang dihasilkan belum mendekati normal. Hal ini diduga disebabkan oleh dosis ekstrak daun sambung nyawa yang diberikan belum mampu mengembalikan fungsi normal sel, sehingga struktur sel belum kembali dalam keadaan normal.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa: (i) Pemberian ekstrak daun sambung nyawa dosis 1,945; 3,889; dan 5,834 g/kg BB dapat menurunkan kadar metil merkuri dalam darah dan memperbaiki karakteristik eritrosit tikus putih yang meliputi kadar hemoglobin, jumlah eritrosit, dan morfologi eritrosit; (ii) Dosis ekstrak daun sambung nyawa yang paling efektif menurunkan kadar metil merkuri dalam darah dan memperbaiki karakteristik eritrosit tikus putih yang terpapar metil merkuri klorida adalah 5,834 g/kg BB; serta (iii) Ekstrak daun sambung nyawa dapat digunakan

sebagai alternatif antidotum alami untuk memperbaiki efek negatif yang ditimbulkan oleh metil merkuri klorida.

DAFTAR PUSTAKA

- Afana's ev IB, Dorozkho AI, Brodsk AV et al. 1989. Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 38: 1763-1769.
- Ariens EJ, Mutschler E, Simonis AM. 1994. Toksikologi umum. Alih bahasa: Wattimena YR, Mathilda B, Widiyanto et al. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1997. Toxicological profile for mercury. Draft for Public Comment (UPDATE). Prepared by Research Triangle Institute Under Contract No. 205-93-0606. Department of Health and Human Services, Public Health Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, USA.
- Athana, Tugaswati AT, Sukar. 1992. Kandungan logam berat (Hg, Cl, dan Pb) dalam air tanah pada perumahan tipe kecil di Jabotabek. *Buletin Penelitian Kesehatan* 24(4): 18-27.
- Beayens W. 1992. Speciation of mercury in different compartment of the environment. *Trends Anal Chem* 11: 245-254.
- Beim AM, Groshva EI. 1991. Ecological chemistry of mercury contained in bleached kraft pulp mill effluents. Institute of Ecotoxicology, USSR, Baikalsk.
- Benjamin SS. 1987. Outline of veterinary clinical pathology. 3rd edition. The Iowa State University Press, Iowa.
- Berlin M, Nordberg G, Hellberg J. 1973. The uptake and distribution of methyl mercury in the brain of samiri sciureus in relation behavioral and morphological changes. In: Miller M, Clarkson T (eds). *Mercury, Mercurials, and Mercaptan*. Springfield.
- Bors W, Michel C, Stettmaier K. 2000. Flavonoids and their free radical reaction. Oxygen. Society Education Program. The Virtual Free Radical School, Germany.
- Buck WB, Osweiler GD. 1976. Clinical and diagnostic veterinary toxicology. 2nd edition. In: Van Gelder GA. Kendall/Hunt Publishing Company.
- Chadhq PV. 1995. Catatan kuliah ilmu forensik dan toksikologi. In: Kartini A (ed). *Handbook of Forensic Medicine and Toxicology Medical Jurisprudence*. Alih Bahasa: Hutauruk J. Widya Medica, Jakarta.
- Clarke ML, Harvey DG, Humphreys DJ. 1981. *Veterinary toxicology*. 2nd edition. The English Language Book Society and Baillie, Tindall.
- Cook NY, Saaman S. 1996. Review: Flavonoid, chemistry, metabolism, cardioprotective, effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem* 7: 66-67.
- Darmansjah I. 1995. *Dasar toksikologi*. Edisi ke-4. Gaya Baru, Jakarta.
- Darmono. 1995. *Logam dalam sistem biologi makhluk hidup*. Indonesia University Press, Jakarta.
- Estes GO, Knoop WE, Houghton FD. 1973. Soil plant response to surface-applied mercury. *J Environ Qual* 2: 451-452.
- Eva F, Sabu EP, Sudarso. 1993. Penelitian toksisitas akut ekstrak etanol daun beluntas china (*Gynura procumbens* Backer) pada mencit putih. *Risalah Simposium Penelitian Tumbuhan Obat VII*. Jurusan Farmasi Fakultas MIPA, UNHAS, Makasar.
- Fujiki M. 1973. The transitional condition of minamata bay and neighbouring sea polluted by factory waste water containing mercury. *Advances in Water Pollution Research. Proceeding of the 6th International Conference*. Pergamon Press, Oxford.
- Gandasoebrata R. 1992. *Penuntun laboratorium klinik*. Dian Rakyat, Jakarta.
- Goering PL, Mistry P, Fowler BA. 1987. Mechanism of metal toxicity. In: Haley TJ, Berndt WO (eds). *Handbook of Toxicology*. Hemisphere, New York.
- Gultom MLR. 2003. Pengaruh Flavonoid terhadap Jumlah Eritrosit, Hemoglobin, PCV Tikus yang Diinduksi Karbon Tetra Klorida. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Guthrie FE. 1980. Absorption and distribution. In: Hodgson E, Guthrie FE (eds). *Introduction to Biochemical Toxicology*. Elsevier, New York.
- Guyton CA. 1991. *Fisiologi manusia dan mekanisme penyakit*. EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Harun N, Syahri W. 2002. Aktivitas antioksidan ekstrak daun *Gynura procumbens* (Lour) Merr. dalam menghambat sifat hepatotoksik

- halotan dengan dosis subanestesi pada mencit. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi* 2(7): 63-70.
- Hariono B, Santosa EB, Soesanto M. 1994. Pengaruh senyawa metil merkuri terhadap kadar enzim δ -Amino Levulinic Acid Dehydratase, gambaran darah, dan histopatologi ginjal, hati, dan otak mencit bunting dan keturunannya. Laporan Penelitian. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Hodgson E, Levi PE. 2000. *Textbook of Modern Toxicology*. 2nd edition. The Mc. Graw-Hill Companies, Inc., Singapore.
- Hunter D. 1969. *The Disease of Occupation*. Little Brown, London.
- Katzung BG. 1997. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Edisi ke-6. In: Agoes HA (ed). EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Lourence DR, Bacharach AL. 1964. *Evaluation of drug activities*. Academic Press, London.
- Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. 1996. *Buku ajar histologi*. EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Lehninger AL. 1982. *Dasar-dasar biokimia*. Erlangga, Jakarta.
- Loomis TA. 1978. *Toksikologi dasar*. Edisi ke-3. IKIP Press, Semarang.
- Lu FC. 1995. *Toksikologi dasar: Asas, organ sasaran, dan penilaian resiko*. Edisi ke-2. IU Press, Jakarta.
- Middleton EJr, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev* 52(4): 673-751.
- Modell W, Schild HO, Wilson A. 1976. *Applied Pharmacology*. American Ed., Saunders, Philadelphia.
- Murray TRK, Granner DK, Mayes PA et al. 1999. *Biokimia Harper*. EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Mutschler E. 1991. *Dinamika obat*. Buku Ajar Farmakologi dan Toksikologi. Institut Teknologi Bandung Press, Bandung.
- Oda EE, Ingle JD. 1981. Continuous flow cold vapor atomic absorption determination of mercury. *Anal Chem* 53: 2030-2031.
- Rivai H. 1995. *Asas pemeriksaan kimia*. IU Press, Jakarta.
- Sato R, Omura T. 1978. *Cytochrome P-450*. Academic Press, New York.
- Schunack W, Mayer K, Haake M. 1990. *Senyawa obat*. Buku Pelajaran Kimia Farmasi. Edisi II. In: Padmawinata K (ed). Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Smith JB, Mangkoewidjojo S. 1988. *Pemeliharaan pembiakan dan penggunaan hewan percobaan di daerah tropis*. Indonesia University Press, Jakarta.
- Sudarto B. 1990. *Studi Farmakognosi Tumbuhan Gynura procumbens (Lour) Merr.* [Tesis]. Fakultas Pasca Sarjana UGM, Yogyakarta.
- Sugiyanto, Soegihardjo CJ, Meiyanto E. 1994. Uji anti karsinogenik rutin, flavonol dan sari etanol daun *Gynura procumbens* dengan metode *new born mice*. Laporan Penelitian. Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.
- Szymusiak H, Zielinski R. 2000. Structure and binding sites of most stable chelates of neutral, mono- and di-deprotonated forms of quercetin with divalent metal cations. Department of Technology and Environmental Protection, Faculty of Commodity, Poznan, Poland.
- Tahono, Hadiwidodo, Yuwono et al. 2000. *Patologi klinik I*. Pengantar Analisa Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran. UNS Press, Surakarta.
- Taras MJ, Greedberg AE, Hoak RD et al. 1971. *Standard methods for eximination of waste water*. Thirtieth edition. American Public Health Association, Washington.
- Tjokronegoro A. 2000. *Pemeriksaan laboratorium sederhana*. Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.
- US PHS [US Public Health Service]. 1988. *Draft toxicological profile for mercury*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. US Public Health Service, GA EPA, Atlanta.
- Wood AJ. 1982. *Drug receptor interactions*. Drug Anesthesia. In: Ood M, Wood AJJ. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Wulangi KS. 1993. *Prinsip-prinsip fisiologi hewan*. Proyek Pembinaan Tenaga Kependidikan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktur Jenderal Perguruan Tinggi, Jakarta.
- Yang B, Kotani A, Kusu F. 2001. Estimation of the antioxidant of flavonoids from their oxidation potentials. *Anal Sci* 17: 599- 604.