

## Peran Kedelai (*Glycine max L.*) dalam Pencegahan Apoptosis pada Cedera Jaringan Hati

Maya Tejasari,<sup>1</sup> Nurhalim Shahib,<sup>2</sup> Djanuarsih Iwan,<sup>2</sup> Herri S Sastramihardja<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung, <sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung

### Abstrak

Pada *liver injury* akibat berbagai sebab, terjadi apoptosis sel yang sangat banyak yang dapat memengaruhi fungsi metabolik hati. Isoflavon kedelai (*Glycine max L.*) telah diketahui dapat mencegah apoptosis sel pada folikel ovarium dan osteoblas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kedelai pada pencegahan apoptosis sel pada jaringan hati mencit yang diinduksi CCl<sub>4</sub>. Penelitian dilakukan menggunakan 30 ekor mencit jantan galur DDY berumur 8–10 minggu yang dibagi dalam 6 kelompok perlakuan. Kelompok 1 merupakan kontrol positif yang hanya diberi makanan pelet standar selama 3 minggu kemudian diberi 0,2 mL larutan CCl<sub>4</sub> per oral selama 4 hari. Kelompok 2 merupakan kontrol negatif yang hanya diberi makanan pelet standar dan tidak diberi CCl<sub>4</sub>, sedangkan kelompok 3–6 merupakan kelompok uji yang selain diberi makanan pelet standar juga diberi kedelai dengan kadar berturut-turut 145,6 mg/hari, 218,4 mg/hari, 291,2 mg/hari, dan 364 mg/hari selama 3 minggu kemudian diberi 0,2 mL larutan CCl<sub>4</sub> per oral selama 4 hari. Seluruh kelompok kemudian dikorbankan dan diambil organ hatinya untuk dilakukan pemeriksaan histokimia *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick end labeling* (TUNEL). Parameter yang diukur adalah jumlah apoptosis sel pada sayatan jaringan hati mencit menggunakan mikroskop cahaya. Data disajikan dan dianalisis secara statistik menggunakan uji *analysis of variance* (ANOVA) untuk menganalisis perbedaan antarkelompok. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa hasil pemeriksaan imunohistokimia TUNEL tampak jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kelompok yang diberi kedelai lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi kedelai. Analisis uji ANOVA antara kelompok tersebut menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Simpulan, pemberian kedelai dapat mencegah apoptosis sel pada jaringan hati mencit yang diinduksi CCl<sub>4</sub>.

**Kata kunci:** Apoptosis, CCl<sub>4</sub>, isoflavon, kedelai, *liver injury*, TUNEL

## Soy (*Glycine max L.*) Prevent Apoptotic Cells in Liver Tissue Injury

### Abstract

In the state of liver injury by any cause there are numerous apoptotic cells influencing metabolic function of the liver. Soy isoflavone (*Glycine max L.*) known to have effect that inhibit apoptotic cells in follicle and osteoblast. The aim of this study was to evaluate whether soy has anti apoptotic effect of CCl<sub>4</sub> induced liver injury in mice. This study used 30 male DDY mice 8–10 weeks old, divided into 6 groups. Group I acted as positive control, received standard pellet for 3 weeks and induced by 0.2 mL CCl<sub>4</sub> per oral. Group II, the negative control, received only standard pellet. Group 3–6 received standard pellet and treated by soybean extract 145.6 mg, 218.4 mg, 291.2 mg and 364 mg per day respectively administrated orally for 3 weeks and then induced by 0.2 mL CCl<sub>4</sub> per oral. After 4 days of CCl<sub>4</sub> induced, the effect of soybean extract was evaluated using histo-chemistry evaluation terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). The identification and quantification of the apoptotic cells in mice liver tissue were done using light microscopy and showed that the TUNEL immunohistochemical examination. The results showed that the number of cells undergoing apoptosis in the group treated by soybean extract were less than the group that was not treated. The results enhanced by analysis of variance (ANOVA) between the groups showed a significant difference with  $p < 0.05$ . In conclusion, soy administrated orally could prevent apoptotic cells in liver tissue.

**Key words:** Apoptotic, CCl<sub>4</sub>, isoflavone, liver injury, soybean, TUNEL

## Pendahuluan

Pada penyakit hati baik akut maupun kronik, terjadi proses apoptosis dalam jumlah sangat banyak, misalnya seperti pada hepatitis viral atau autoimun, penyakit kolestatik, gangguan hati akibat alkohol/keracunan obat serta kerusakan hati akibat transplantasi, termasuk pula akibat *ischemic reperfusion injury* dan *graft rejection*. Hampir semua gangguan pada organ hati dapat menyebabkan destruksi hepatosit. Gagal hati terjadi bila terdapat penurunan fungsi hepatosit yang tinggi sehingga organ hati tidak mampu lagi untuk memenuhi fungsi metabolik dan sintesis.<sup>1-3</sup> Induksi *liver injury* dengan pemberian  $\text{CCl}_4$  menghasilkan perubahan yang serupa dengan perubahan yang terjadi pada jaringan hati itu akibat berbagai kelainan hati.<sup>4-7</sup>

Penelitian yang telah dilakukan terdahulu, disimpulkan bahwa pada *acute liver injury* akibat pemberian  $\text{CCl}_4$  pada tikus, ditemukan banyak hepatosit yang mengalami apoptosis. Apoptosis pada hepatosit dapat diidentifikasi dan dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya/elektron, *in situ immunohistochemical labeling of nuclear DNA fragmentation*, *flow cytometry*, dan *DNA gel electrophoresis*.<sup>4-11</sup>

Kedelai dan produknya sangat kaya akan fitoestrogen yakni isoflavon genistein, daidzein, dan glisitein. Laporan dari hasil-hasil penelitian *National Soybean Research Laboratory* dalam *The Soy/Swine Nutrition Research Programme* sepanjang tahun 1998–1999 di *University of Illinois*, diperoleh simpulan bahwa daidzein dan genistein yang termasuk jenis fitoestrogen yang terkandung dalam kedelai, mampu menurunkan apoptosis, dengan kemampuan daidzein sepuluh kali lebih besar daripada genistein. Keduanya potensial meningkatkan *follicle survival* yang mengarah pada peningkatan ukuran folikel.<sup>12-14</sup>

Penelitian yang dilakukan oleh Suh dkk.<sup>15</sup> pada tahun 2003 juga menyimpulkan bahwa isoflavon kedelai terbukti mampu menghambat apoptosis pada sel osteoblas, namun belum didapatkan informasi tentang pengaruh kedelai pada apoptosis sel hati pada cedera hati (*liver injury*), yang dapat dijadikan sebagai indikator *hepatocytes survival*.

Pada penelitian ini dilakukan pemberian ekstrak kedelai terhadap hewan coba untuk mengetahui pengaruhnya terhadap kerusakan jaringan hati yang disebabkan oleh pemberian  $\text{CCl}_4$ . Parameter yang akan diukur yaitu jumlah

sel apoptosis untuk menilai pengaruh pemberian kedelai tersebut terhadap pencegahan apoptosis pada jaringan hati. Diperkirakan bahwa pada kelompok perlakuan yang diberi kedelai, jumlah apoptosis sel lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi kedelai

## Metode

Subjek penelitian adalah mencit jantan galur DDY berumur 8–10 minggu. Mencit diadaptasi sebelumnya di lingkungan laboratorium selama 7 (tujuh) hari, kemudian mencit dibagi menjadi 6 (enam) kelompok perlakuan. Pada kelompok 1 tidak diberi kedelai, hanya diberi makan pelet 4 g/hari per oral dan minuman air serta diberi  $\text{CCl}_4$  0,2 mL, kelompok 2 tidak diberi kedelai, hanya diberi makan pelet 4 gram/hari per oral dan minuman air serta tidak diberi  $\text{CCl}_4$  0,2 mL, sedangkan kelompok 3 sampai kelompok 6 berturut-turut diberi kedelai 145,6 mg/hari, 218,4 mg/hari, 291,2 mg/hari, dan 364 mg/hari secara per oral, selain diberi makan pelet 4 g/hari dan minuman air serta diberi  $\text{CCl}_4$  0,2 mL.

Setelah pemberian kedelai selama 3 minggu, mencit diberikan 0,2 mL larutan  $\text{CCl}_4$  secara per oral selama 4 (empat) hari. Mencit kemudian dikorbankan dan diambil organ hatinya. Dari organ hati tersebut kemudian dibuat preparat jaringan hati, setelah itu dilakukan pemeriksaan imunohistokimia *transferase-mediated dUTP nick end labeling* (TUNEL) pada preparat jaringan hati tersebut menggunakan mikroskop cahaya untuk menghitung jumlah apoptosis sel. Pengolahan kacang kedelai dilaksanakan di laboratorium, direbus terlebih dahulu selama 15 menit kemudian dikeringkan di dalam pemanas 40 °C selama 2 (dua) hari untuk mengurangi kadar airnya tanpa merusak komposisi zat-zat gizi yang terkandung di dalamnya; selanjutnya kacang kedelai tadi yang telah kering dihaluskan sehingga berbentuk seperti tepung. Tepung kacang kedelai tersebut kemudian dilarutkan dalam air dengan perbandingan volume air dan tepung kedelai disesuaikan dengan kelompok perlakuan.

Kadar minimal kedelai yang efektif sebagai makanan tambahan pada manusia adalah 0,8 g/kgBB/hr, jadi kebutuhan orang dewasa dengan berat badan 70 kg adalah  $0,8 \times 70 = 56$  g/hr yang sebanding dengan 0,05% kebutuhan total kalori. Pada mencit dikonversi sesuai tabel konversi

dari Paget & Barnes menjadi  $0,0026 \times 56 = 0,1456$  g/hr atau 145,6 mg/hr. Kadar minimal efektif ini dijadikan kadar I. Kadar II adalah  $1,5 \times 145,6$  mg = 218,4 mg/hr. Kadar III adalah  $2 \times 145,6$  mg = 291,2 mg/hr. Kadar IV adalah  $2,5 \times 145,6$  mg = 364 mg/hr.

Dosis *carbon tetrachloride* ( $\text{CCl}_4$ ) yang dipakai oleh Oka dan Nyoman<sup>16</sup> untuk terjadi perubahan di tingkat jaringan adalah 0,2 mL (setara dengan 16,47 mg larutan  $\text{CCl}_4$ ) yang diberikan secara per oral.

Metode untuk mendeteksi sel yang mengalami apoptosis dapat dilaksanakan berdasarkan pada karakteristik apoptosis, yaitu yang salah satunya terjadi fragmentasi DNA. Metode yang umum digunakan untuk dapat mendeteksi fragmentasi DNA secara enzimatik dengan menggunakan metode *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling* (TUNEL). Reagen TUNEL terdiri atas enzim terminal transferase yang dapat mengenali ujung-ujung 3'OH yang dihasilkan oleh fragmentasi DNA dan fluoresein-dUTP untuk memvisualisasikan ujung 3'OH tersebut yang diamati menggunakan mikroskop fluoresensi, *flow cytometry*, ataupun mikroskop cahaya.

Pada penelitian ini pengamatan dilakukan mempergunakan mikroskop cahaya, sedangkan untuk visualisasi perbandingan sel-sel apoptosis dengan sel nonapoptosis dalam satu lapangan pandang pengamatan, digunakan metode *double staining* memakai reagen TUNEL dan Giemsa. Dengan metode TUNEL hanya mendeteksi sel apoptosis yang memberikan warna coklat, sedangkan Giemsa mendeteksi sel nonapoptosis dan memberikan warna biru keunguan.

Prosedurnya sebagai berikut: *polylysine slide* berisi sayatan jaringan ditempatkan dalam oven 56–60 °C selama 15 menit, lalu deparafinasi preparat dengan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit. Rehidrasi preparat dengan menggunakan etanol 100%, etanol 95%, dan etanol 70%. Rehidrasi preparat dengan akuades steril, inaktivasi POD endogen dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$  : air (1:9) selama 5–10 menit. Cuci preparat dengan PBS lalu ditambahkan protease lalu inkubasi (30 menit 37 °C) dan tutup dengan kertas timah. Cuci preparat dengan PBS. Lakukan sayatan (2 menit dalam es). Tetesi preparat dengan 50 µL TUNEL *labeling mix* (terdiri atas 5 µL enzim *terminal deoxynucleotidyl transferase* dan 45 µL fluoresein-dUTP) dan inkubasi (60 menit 37 °C). Cuci preparat dengan PBS. Tambahkan anti-fluoresein-POD dan inkubasi (30 menit,

37 °C). Cuci preparat dengan PBS. Tambahkan substrat DAB dan inkubasi (5–20 menit, RT). Cuci dengan PBS lalu cuci dengan air. Berikan *counter stain*. Cuci dengan air lalu dikeringkan. Sesudah itu celupkan ke dalam alkohol absolut untuk menjernihkan, kemudian dikeringkan. Tutup preparat tersebut dengan entelan dan *silicone cover sli*. Amati dan hitung sel apoptosis (yang berwarna coklat) menggunakan mikroskop cahaya. Untuk analisis data dilakukan dengan menggunakan uji parametrik yaitu *analysis of varians* (ANOVA).

## Hasil

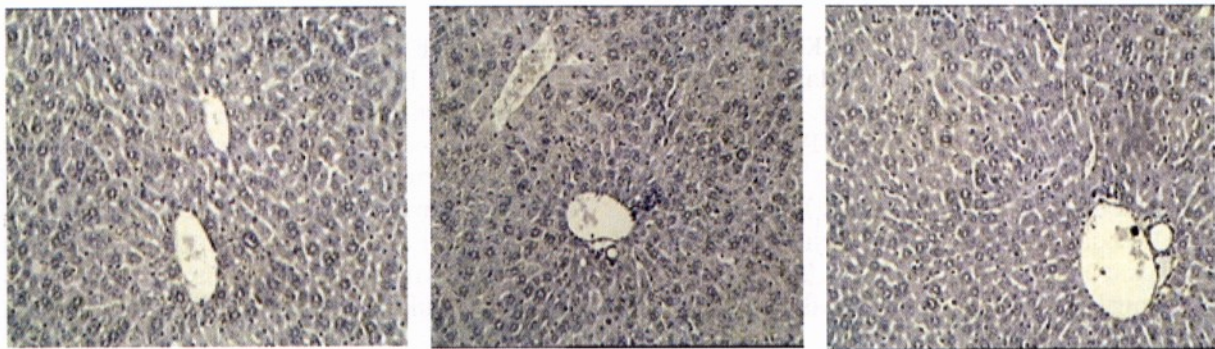
Pemeriksaan imunohistokimia TUNEL:

Hasil pengamatan histopatologis kelompok 3–6 yang diberi kedelai dengan 4 variasi kadar pemberian yaitu 145,6 mg/hari, 218,4 mg/hari, 291,2 mg/hari, dan 364 mg/hari dan diinduksi dengan pemberian  $\text{CCl}_4$ , memperlihatkan gambaran mikroskopik yang hampir sama dengan kelompok 2 yang merupakan jaringan hati mencit normal tanpa perlakuan (Gambar 1). Secara umum pada kelompok 3–6 ini, pengamatan preparat dengan perbesaran 40x tidak terlihat titik-titik coklat tanda apoptosis pada pewarnaan imunohistokimia (Gambar 2). Pada pembesaran 400x baru terlihat apoptosis dengan jumlah sangat sedikit (Gambar 3).

Hasil pemeriksaan imunohistokimia TUNEL kelompok 3–6, tampak sama dengan kelompok 2 yang tidak memperlihatkan area coklat tanda apoptosis (Gambar 2).

Hasil uji statistik menggunakan ANOVA pada derajat kepercayaan 95% menunjukkan bahwa jumlah apoptosis sel pada kelompok yang diberi kedelai lebih sedikit dibandingkan dengan yang tidak diberi kedelai, pada jaringan hati mencit yang diinduksi  $\text{CCl}_4$  dengan nilai  $p < 0,001$  (nilai  $p < 0,05$ ). Hasil ini membuktikan bahwa pemberian kedelai mampu mencegah apoptosis sel pada jaringan hati mencit yang diinduksi  $\text{CCl}_4$ .

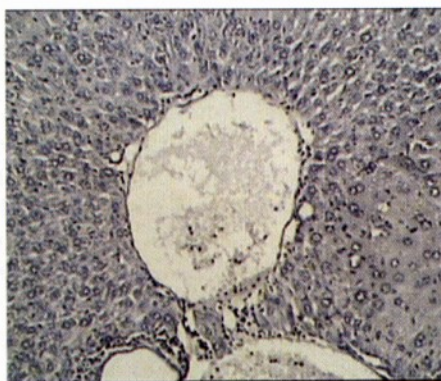
Pada penelitian ini baik dari hasil pengamatan histopatologis maupun analisis statistik dapat terbukti bahwa pemberian kedelai pada kadar pemberian tertentu, dapat mencegah apoptosis sel hati pada jaringan hati mencit yang diinduksi  $\text{CCl}_4$ . Hal ini dapat diartikan bahwa pemberian kedelai dapat memberikan proteksi terhadap organ hati dengan kemampuannya mencegah apoptosis sel pada keadaan *liver injury*. Hal ini sesuai dengan hasil-hasil penelitian sebelumnya



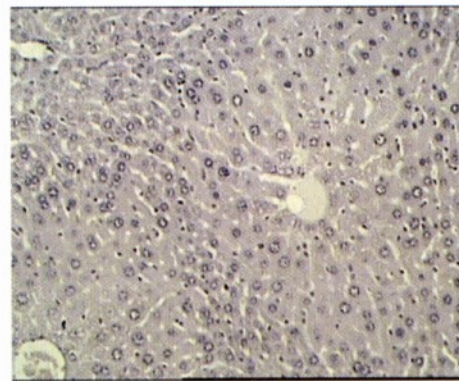
**Gambar 1 Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia TUNEL Kelompok 2 (Kontrol Negatif Apoptosis). Tidak Terlihat Area Coklat Tanda Apoptosis**

yang menyatakan bahwa kandungan isoflavon dalam kedelai dapat mengurangi kadar stres oksidatif, juga meningkatkan produksi *nitrit oxide* (NO) sebagai antiapoptosis dengan cara meningkatkan ekspresi *nitrit oxide synthase* (NOS) dan juga menghambat produksi TNF- $\alpha$ ,

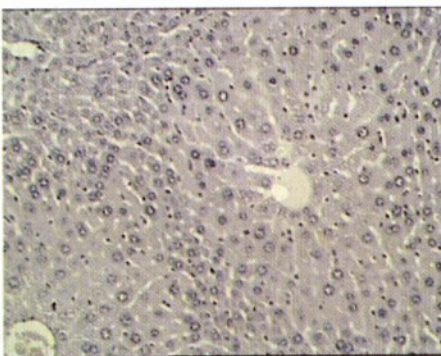
sehingga terjadi penghambatan inisiasi proses apoptosis melalui jalur ekstrinsik.<sup>3,17</sup> Selain itu, sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa kandungan fitoestrogen pada kedelai dapat pula menstimulasi produksi antiapoptosis dari golongan protein Bcl-2,



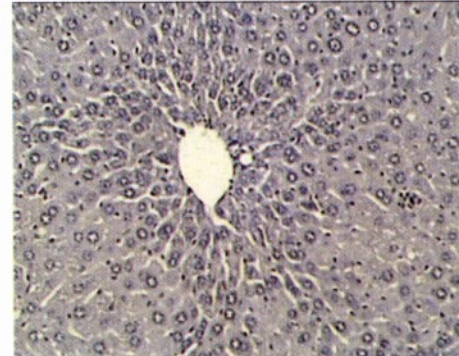
**Kelompok 3**



**Kelompok 4**

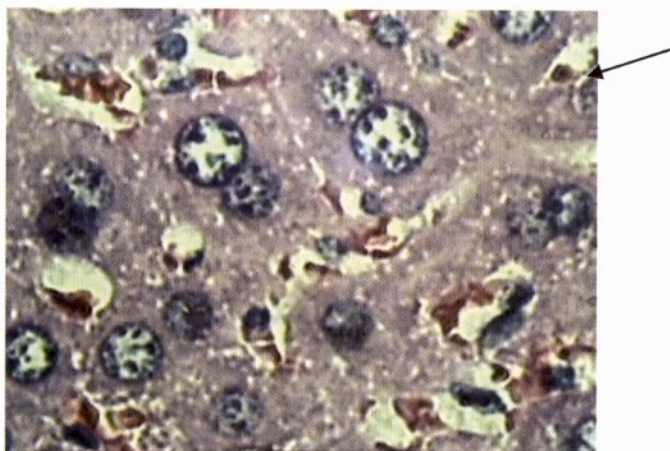


**Kelompok 5**



**Kelompok 6**

**Gambar 2 Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia TUNEL Kelompok 3–6, Tampak Sama dengan Kelompok 2 yang Tidak Memerlihatkan Area Coklat Tanda Apoptosis**



**Gambar 3 Jaringan Hati dengan Pemeriksaan Imunohistokimia TUNEL Kelompok Perlakuan dengan Perbesaran 400x, Tampak Hanya Ada Satu Sel yang Mengalami Apoptosis**

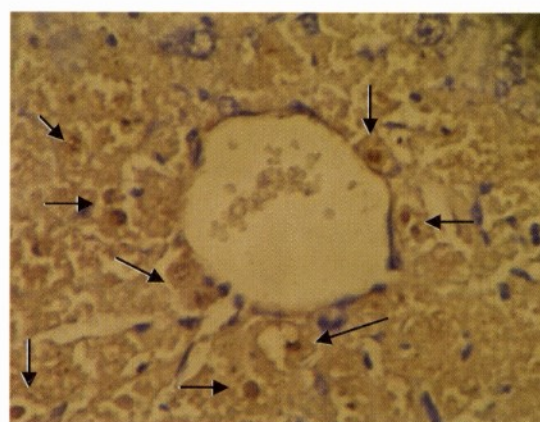
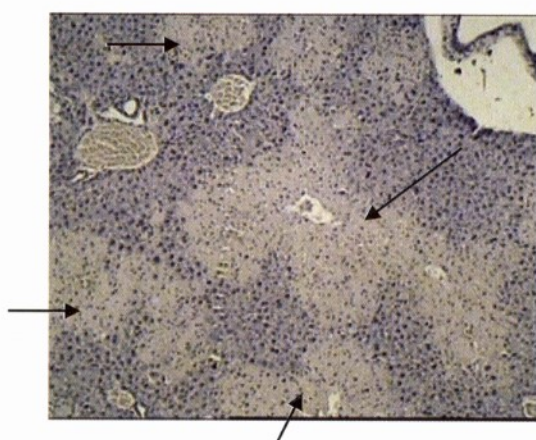
sehingga dapat pula terjadi penghambatan inisiasi proses apoptosis melalui jalur intrinsik (jalur mitokondria).<sup>17</sup> Kemampuan kedelai untuk menghambat inisiasi proses apoptosis dari kedua jalur baik ekstrinsik maupun instrinsik pada hepatosit inilah yang akhirnya dapat berperan dalam meningkatkan *hepatocytes survival* pada kondisi *liver injury*.

**Pembahasan**

Hasil ini jauh berbeda dengan pengamatan histopatologis kelompok 1 yang diinduksi CCl<sub>4</sub> tanpa pemberian kedelai, pada perbesaran

40x telah terlihat pada preparat dengan pewarnaan imunohistokimia TUNEL tampak banyak terdapat titik-titik coklat di daerah perisentralis yang menandakan banyaknya sel yang mengalami apoptosis (Gambar 4).

Dari gambaran histopatologis yang sama antara kelompok perlakuan (kelompok 3–6) dan kelompok 2 yang merupakan kontrol negatif apoptosis (jaringan hati normal tanpa perlakuan) serta perbedaan nyata dengan gambaran histopatologis kelompok 1 yang merupakan kontrol positif apoptosis, maka dapat diartikan bahwa pemberian kedelai dapat mencegah apoptosis sel pada jaringan hati



**Gambar 4 Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia TUNEL Kelompok 1 yang Merupakan Kontrol Positif Apoptosis, Tampak Area Kecoklatan Tanda Banyaknya Sel yang Mengalami Apoptosis**

mencit yang diinduksi dengan pemberian CCl<sub>4</sub>.

### Simpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pada kelompok yang diberi ekstrak kedelai, jumlah apoptosis sel lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi kedelai, pada jaringan hati mencit yang diinduksi CCl<sub>4</sub>. Hasil ini membuktikan bahwa pemberian kedelai pada rentang kadar pemberian seperti tersebut di atas, mampu mencegah apoptosis sel pada jaringan hati mencit yang diinduksi CCl<sub>4</sub>.

### Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dapat terlaksana berkat dukungan penuh dari Prof. Dr. Nurhalim Shahib, dr., Prof. Dr. Herri S Sastramihardja, dr., SpFK(K) dan Djanuarsih Iwan, dr., MS, dukungan dari Program Pascasarjana *Combined Degree* Fak. Kedokteran Unpad dan Fak. Kedokteran UNISBA, serta kerjasama dengan Lab. Pusat Ilmu Hayati ITB, Lab. Parasitologi Bagian Kedokteran Tropis UGM dan Lab. Biomedis Fak. Kedokteran UNISBA.

### Daftar Pustaka

- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Pathologic basic of disease. Edisi ke-7. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.
- Williams G, Iatropoulos M. Alteration in liver function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity, *Toxicol Pathol.* 200;41-53.
- Luedde T, Trautwein C. Intracellular survival pathways in the liver. *Liver International.* 2006;26 issue 10:1163-74.
- Shi Jialan, Aisaki K, Ikawa Y, Wake K. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *AMJ Pathol.* 1998 August;153(2):515-25.
- Lim KT, Chae HS, Yoon SH, Kim SS, Kim KY, Lee WB. Apoptosis in rat liver development: tTG and TGF beta1 expression related to apoptotic mechanism. *Korean J Anat.* 1999 Aug;32(4):543-52.
- Tang X, Gao J, Chen J, Xu L, Tang Y, Dou H, dkk. Expression of VDAC regulated by extracts of limonium sinense ktze root against CCl<sub>4</sub>-induced liver damage. *Int J Mol Sci.* 2007;8:204-13.
- Dalton SR, Lee SML, King RN, Nanji AA, Kharbanda KK, Casey CA, dkk. Carbon tetrachloride-induced liver damage in a receptor-deficient mice. *Biochem Pharmacol J.* 2009;77:1283-90.
- Kim SH, Chu HJ, Kang DH, Song GA, Cho M, Yang US. NF-κB binding activity and cyclooxygenase-2 expression in persistent CCl<sub>4</sub>-treated rat liver injury.
- Etuk EU, Agaie BM, Ladan MJ, Garba I. The modulatory effect of cochlospermum tinctorium a rich aqueous root extract on liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. *African J Pharmacy Pharmacol.* 2009;3(4):151-7.
- Girish C, Koner BC, Rao R, Jayanthi S, Rajesh B, Pradhan SC. Hepatoprotective activity of six polyherbal formulations in CCl<sub>4</sub>-induced toxicity in mice. *Indian J Exp Biol.* 2009;27(4):257-63.
- Hepatoprotective activity of capparispinosa root bark against CCl<sub>4</sub> induced hepatic damage in mice. *Iranian J Pharmaceutical Research.* 2007;6(4):285-90.
- National Soybean Research Laboratory at the University of Illinois. Research Reports from the soy/swine. Nutrition Research Program 1998-1999. University of Illinois; 2000.
- World Initiative for Soy in Human Health. Composition of soy. 2009. Tersedia dari: <http://www.wishh.org>
- United Soybean Board. Soy Nutritional Composition. 2009 [diunduh 21 Jul 2009]. Tersedia dari: <http://www.soyconnection.com>
- Suh KS, Koh G, Park CY, Woo JT, Kim SW, Kim JW, dkk. Soybean isoflavones inhibit tumor necrosis factor-α-induced apoptosis and the production of interleukin-6 and prostaglandin E<sub>2</sub> in osteoblastic cells. *J Phytochemistry.* 2003;63 issue 2:209-15.
- Oka IBW, I Nyoman S. Perubahan morfologi hati dan ginjal mencit yang diinduksi karbondetraklorida (CCl<sub>4</sub>). *J Veteriner Fakultas Kedokteran Udayana.* 2005;6(1).
- Blake A, Jones, Gregory, Gores. Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1997;273 Issue 6:G1174-88.