

## Fluktuasi Profil Hematologi Tikus Putih Hewan Model Fibrosarkoma yang Diinduksi Benzo(a)piren

(*FLUCTUATIONS IN THE HEMATOLOGICAL PROFILE OF THE WHITE RAT  
ANIMAL MODEL OF BENZO(A)PYRENE-INDUCED FIBROSARCOMA*)

I Gusti Ayu Mirah Afsari Dewi<sup>1</sup>,  
Anak Agung Ayu Mirah Adi<sup>2</sup>, Ni Luh Eka Setiasih<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Sarjana Pendidikan Dokter Hewan,

<sup>2</sup>Laboratorium Patologi Veteriner,

<sup>3</sup>Laboratorium Histologi Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,

Jl. Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesia, 80234,

Telp/Fax: (0361) 223791,

Email: mirahafsari200@gmail.com

### ABSTRAK

Benzo(a)piren merupakan salah satu golongan bahan kimia yang memiliki sifat karsinogen sehingga mampu memicu pertumbuhan kanker dan seringkali digunakan untuk menginduksi tumor fibrosarkoma pada jaringan lunak hewan percobaan. Pemeriksaan hematologi merupakan indikator penting pada proses karsinogenesis atau tumorigenesis pada induksi senyawa benzo(a)piren. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil hematologi dari tikus putih sebagai hewan model fibrosarkoma yang diinduksi dengan senyawa karsinogen benzo(a)piren. Penelitian ini menggunakan 12 ekor tikus putih dengan dua perlakuan yaitu perlakuan 0 (P0) sebagai kontrol dan perlakuan 1 (P1) sebagai kontrol positif diinduksi dengan senyawa benzo(a)piren 0,3% yang dilarutkan dalam *oleum olivarum* 0,1 mL. Pengambilan sampel darah dilakukan tiga kali pada minggu ke-2, minggu ke-5 dan minggu ke-20 melalui sinus orbitalis dan diuji dengan pemeriksaan darah lengkap serta pembuatan preparat ulas darah. Hasil penelitian dari minggu ke-2, minggu ke-5 dan minggu ke-20 menunjukkan kisaran rerata pada total eritrosit  $(4,07-8,38) \times 10^6 \mu\text{L}$ , hemoglobin 8,03-14,8 g/dL, hematokrit 20,67-40%, total leukosit  $(3,67-12,4) \times 10^3 \mu\text{L}$ , neutrofil 16-48%, eosinofil 0-1,33%, basofil 0%, monosit 6-21,67%, dan limfosit 46-64%. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa induksi senyawa karsinogen benzo(a)piren pada tikus putih penderita fibrosarkoma menunjukkan adanya fluktuasi pada profil hematologi.

Kata-kata kunci: benzo(a)piren; fibrosarkoma; hematologi; tikus putih

### ABSTRACT

Benzo(a)pyrene is a chemical group that has carcinogenic properties so that it can trigger cancer growth and is often used to induce fibrosarcoma tumors in the soft tissue of experimental animals. Hematological examination is an important indicator of the process of carcinogenesis or tumorigenesis in the induction of benzo(a)pyrene compounds. This study aims to determine the hematological profile of white rats as an animal model of fibrosarcoma induced with benzo(a)pyrene. This study used 12 white rats with two treatments, namely treatment 0 (P0) as a control and treatment 1 (P1) as a positive control induced by 0.3% benzo(a)pyrene compound dissolved in 0.1 mL *oleum olivarum*. Blood samples were taken three times at 2<sup>nd</sup> week, 5<sup>th</sup> week and 20<sup>th</sup> week through the orbital sinus and tested by a complete blood count and making blood smear preparations. The results of the study from the 2<sup>nd</sup> week, 5<sup>th</sup> week and 20<sup>th</sup> week showed the average range in total erythrocytes  $(4.07-8.38) \times 10^6 \mu\text{L}$ , hemoglobin 8.03-14.8 g/dL, hematocrit 20.67-40%, leukocytes total  $(3.67-12.4) \times 10^3 \mu\text{L}$ , neutrophils 16-48%, eosinophils 0-1.33%, basophils 0%,

monocytes 6-21.67%, and lymphocytes 46-64%. Based on the results of the study, it can be concluded that the induction of the carcinogen benzo(a)pyrene in white rats with fibrosarcoma showed fluctuations in the hematological profile.

Keywords: benzo(a)pyrene; fibrosarcoma; hematology; white rat

## PENDAHULUAN

Terdapat berbagai jenis zat yang dapat digolongkan ke dalam zat karsinogen di lingkungan. Zat karsinogen dapat menyebabkan perubahan terhadap struktur dan fungsi sel tubuh. Tiga jenis golongan karsinogen yaitu bahan kimia, radiasi, dan agen biologi. Salah satu golongan bahan kimia yang memiliki sifat karsinogen yaitu senyawa benzo(a)piren. Sel-sel yang terpapar benzo(a)piren akan mengalami perubahan pada DNA sehingga sel-sel tersebut tumbuh secara tidak terkendali (Kartawiguna, 2001). Secara *in vivo*, benzo(a)piren telah terbukti menyebabkan tumor pada setiap hewan percobaan, baik melalui jalur makanan, pernafasan, maupun kontak pada permukaan kulit. Inisiasi proses karsinogenik dari benzo(a)piren bahkan dapat terjadi pada bagian jaringan yang jauh dari titik asal paparannya (Marlinda *et al.*, 2016). Pada penelitian tentang tumor, zat kimia benzo(a)piren sering digunakan untuk menginduksi tumor fibrosarkoma pada jaringan lunak hewan percobaan (Vander, 2000). Pemeriksaan hematologi pada hewan coba mencit yang diinduksi dengan senyawa polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) mengalami penurunan jumlah eritrosit dan penurunan jumlah hemoglobin yang menyebabkan anemia. Terjadi peningkatan jumlah total leukosit, peningkatan yang tidak signifikan pada jumlah neutrofil, serta penurunan jumlah monosit (Fajar *et al.*, 2019). Pada hewan penderita tumor, pemeriksaan hematologi menunjukkan terjadinya anemia, trombositopenia, dan hipoglikemia (Chauhan, 2010). Penelitian yang dilakukan oleh Gangar *et al.* (2010) melaporkan induksi zat karsinogen benzo(a)piren pada tikus memperlihatkan efek pada bobot badan dan hemotologi yang signifikan dalam menurunkan jumlah eritrosit, hemoglobin, jumlah leukosit, limfosit, monosit dan meningkatkan persentase neutrofil yang merupakan indikator penting pada proses karsinogenesis atau tumorigenesis pada tikus. Dengan demikian hasil penelitian dapat memberikan informasi ilmiah mengenai efek yang ditimbulkan dari induksi benzo(a)piren terhadap profil hematologi serta sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil hematologi tikus putih penderita fibrosarkoma yang diinduksi dengan senyawa karsinogen benzo(a)piren.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini telah disetujui oleh Komite Etik, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana. Pada penelitian ini objek yang digunakan adalah 12 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* jenis kelamin jantan dengan bobot 130-145 g dan umur rata-rata tiga bulan yang dipelihara di Laboratorium Patologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana. Tikus yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana. Desain penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Tikus percobaan dibagi menjadi dua perlakuan yaitu P0 dan P1, setiap perlakuan berisi enam ekor tikus jantan. Sebelum diberikan perlakuan, hewan coba diaklimatisasi selama satu minggu dan diberikan pakan dan air minum *ad libitum* yang sama secara teratur. Pada minggu ke-2 yaitu setelah aklimatisasi, dilakukan pengambilan sampel darah yang pertama pada semua tikus perlakuan.

Tikus perlakuan 0 (P0) sebagai kontrol adalah tikus-tikus yang tidak diinduksi benzo(a)piren. Tikus perlakuan 1 (P1) adalah tikus-tikus yang diinduksi dengan benzo(a)piren 0,3 mg dalam 0,1 mL minyak zaitun (*oleum olivarum*) secara injeksi melalui subkutan pada daerah tengkuk (interskapuler) sebanyak sepuluh kali dengan interval dua hari (Sewoyo *et al.*, 2021a; Sewoyo *et al.*, 2021b). Pada minggu ke-5 yaitu setelah dilakukan induksi tumor dengan benzo(a)piren, dilakukan pengambilan darah yang kedua pada semua perlakuan.

Tikus dipalpasi seminggu dua kali pasca induksi dengan benzo(a)piren. Setelah muncul tumor, dilakukan pengambilan darah yang ketiga di minggu ke-20 pada semua perlakuan. Pengambilan sampel darah dilakukan dengan memilih secara acak tiga ekor tikus tiap perlakuan untuk dilakukan pengambilan sampel darah sehingga total sampel yang dianalisis sebanyak enam sampel. Sebelum dilakukan pengambilan sampel, tikus dianestesi menggunakan ketamin HCL 10% yang diberikan sejumlah 0,2 mL per ekor (dosis normal pada tikus 50 mg/kg BB) secara intramuskuler. Tikus yang telah teranestesi diambil darahnya melalui sinus orbitalis menggunakan hematokrit mikrokapiler kemudian ditampung dalam tabung yang berisi *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid* (EDTA) sebanyak 3 mL. Tabung koleksi tersebut lalu dimasukkan ke dalam kotak pendingin (*cool box*) untuk selanjutnya dibawa ke Balai Besar Veteriner Denpasar untuk dilakukan pemeriksaan sampel menggunakan alat *Auto Hematology Analyzer Rayto RT-7600*<sup>®</sup> (Rayto Ltd., Shenzhen, China) dengan pemeriksaan darah lengkap meliputi eritrosit, hemoglobin,

hematokrit, leukosit, dan diferensial leukosit serta pembuatan preparat ulas darah. Analisis data pada penelitian ini menggunakan analisis *Mixed-effects* model *Restricted Maximum Likelihood* (REML) jika hasilnya berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) maka dilanjutkan dengan uji *post-hoc* Tukey menggunakan perangkat lunak GraphPad Prism 8 *for Windows*.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah normal total eritrosit pada tikus putih berkisar antara  $(7-11) \times 10^6 \mu\text{L}$  (Douglas dan Wardrop, 2010). Rata-rata kisaran total eritrosit hasil penelitian ini adalah  $(4,07-8,38) \times 10^6 \mu\text{L}$ . Pada tikus P0 rata-rata total eritrosit cenderung mengalami peningkatan yaitu  $4,07 \times 10^6 \mu\text{L}$  pada minggu ke-2,  $6,76 \times 10^6 \mu\text{L}$  pada minggu ke-5 dan  $8,38 \times 10^6 \mu\text{L}$  pada minggu ke-20. Pada tikus P1 rata-rata total eritrosit cenderung mengalami penurunan yaitu  $8,27 \times 10^6 \mu\text{L}$  pada minggu ke-2,  $7,59 \times 10^6 \mu\text{L}$  pada minggu ke-5 dan  $5,99 \times 10^6 \mu\text{L}$  pada minggu ke-20 (Gambar 1a).

Tabel 1. Signifikansi perbedaan parameter eritrosit, hemoglobin dan leukosit antar perlakuan berdasarkan uji *post-hoc* Tukey pada tiap minggunya.

Parameter	Perlakuan	Signifikansi					
		Minggu ke-2		Minggu ke-5		Minggu ke-20	
		P0	P1	P0	P1	P0	P1
Eritrosit	P0		0,0441*		0,464		0,344
Hemoglobin	P0		0,0445*		0,891		0,1513
Leukosit	P0		0,0448*		0,3381		0,1849

Keterangan: \*Berbeda nyata ( $P < 0,05$ ). P0 = kontrol; P1 = kontrol positif

Berdasarkan hasil analisis statistika *Restricted Maximum Likelihood* (REML) terhadap total eritrosit, terdapat perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ). Uji *post-hoc* Tukey menunjukkan pada minggu ke-2 tikus P0 berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) dengan tikus P1. Pada minggu ke-5 dan minggu ke-20, total eritrosit antar perlakuan tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) (Tabel 1). Pada tikus P0, di minggu ke-2 menunjukkan total eritrosit yang cenderung rendah dan berada di bawah kisaran normal. Namun kemudian, mengalami peningkatan pada minggu-minggu selanjutnya dan kembali berada pada kisaran normal. Pada tikus P1 terjadi penurunan total eritrosit yang disebabkan oleh proses karsinogenesis atau tumorigenesis yang mengakibatkan beberapa perubahan patologis, termasuk perubahan profil hematologi (Groopman *et al.*, 1994; Anandakumar *et al.*, 2012). Pada kasus kanker paru-paru hasil induksi benzo(a)piren dari studi yang dilaporkan Anandakumar *et al.* (2012) menunjukkan terjadinya penurunan jumlah sel darah merah, yang merupakan indikasi dari

anemia. Terjadinya anemia diakibatkan oleh adanya hipoksia yang terjadi pada semua organ dan hipoksia pada sel tumor (Brown, 1999). Anemia dapat terjadi karena radikal bebas yang dihasilkan dari metabolisme benzo(a)piren yang menyebabkan kerusakan langsung pada hati. Radikal bebas yang dibebaskan dari hati masuk ke sirkulasi kemudian memengaruhi membran eritrositik yang menyebabkan gangguan hematopoiesis, kerusakan eritrosit dan penurunan laju pembentukannya atau peningkatan pembuangan dari sirkulasi (Nithya *et al.*, 2014). Hipoksia yang terjadi terus menerus merupakan pertanda keganasan tumor dan progresi pertumbuhan tumor (Hockel dan Vaupel, 2001). Meskipun pada minggu ke-5 dan minggu ke-20 hasil analisis statistika tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata namun dari pemeriksaan total eritrosit tampak bahwa profil eritrosit tikus P1 setelah induksi benzo(a)piren tidak lebih baik dibandingkan tikus P0.

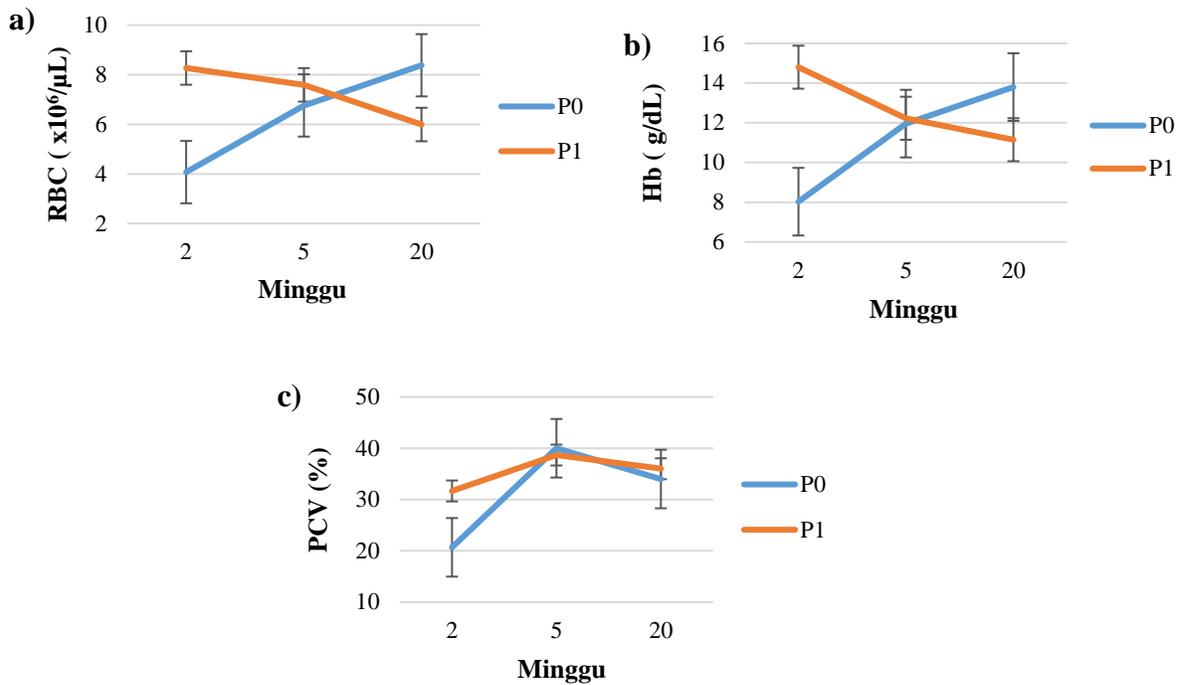
Kadar hemoglobin normal pada tikus putih antara 11,6-16,1 g/dL (Douglas dan Wardrop, 2010). Rata-rata kisaran persentase hemoglobin hasil penelitian ini adalah 8,03-14,8 g/dL. Pada tikus P0 menunjukkan hasil rata-rata kadar hemoglobin di bawah kisaran normal yaitu 8,03 g/dL pada minggu ke-2 namun kemudian cenderung mengalami peningkatan menjadi 11,96 g/dL pada minggu ke-5 dan 13,8 g/dL pada minggu ke-20 sehingga kadar hemoglobin kembali berada pada kisaran normal. Rata-rata kadar hemoglobin pada tikus P1 cenderung mengalami penurunan namun masih berada pada kisaran normal yaitu 14,8 g/dL pada minggu ke-2, 12,23 g/dL pada minggu ke-5 dan 11,15 g/dL pada minggu ke-20 (Gambar 1b).

Hasil analisis statistika *Restricted Maximum Likelihood* (REML) terhadap kadar hemoglobin menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ). Uji *post-hoc* Tukey menunjukkan kadar hemoglobin tikus P0 dan P1 pada minggu ke-2 berbeda nyata ( $P < 0,05$ ). Pada minggu ke-5 dan minggu ke-20, kadar hemoglobin antar perlakuan tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) (Tabel 1). Pada tikus P0, di minggu ke-2 menunjukkan kadar hemoglobin yang lebih rendah dan berada di bawah kisaran normal namun kemudian mengalami peningkatan pada minggu-minggu selanjutnya dan kembali berada pada kisaran normal. Laporan studi Anandakumar *et al.* (2012) menunjukkan terjadinya penurunan kadar hemoglobin, yang merupakan indikasi dari anemia diakibatkan oleh adanya hipoksia. Kemungkinan lain yang mengakibatkan anemia adalah paparan zat benzo(a)piren dapat menyebabkan sel darah merah menjadi rentan mengalami lisis, sehingga timbul anemia (Hegazy *et al.*, 2012). Meskipun pada minggu ke-5 dan minggu ke-20 hasil analisis statistika tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata namun dari pemeriksaan kadar

hemoglobin tampak bahwa kadar hemoglobin tikus P1 setelah induksi benzo(a)piren tidak lebih baik dibandingkan tikus P0.

Persentase hematokrit normal pada tikus putih berkisar antara 37,6-51,0% (Douglas dan Wardrop, 2010). Rata-rata kisaran persentase hematokrit hasil penelitian adalah 20,67-40,00%. Rata-rata persentase hematokrit tikus P0 berfluktuasi yaitu 20,67% pada minggu ke-2 kemudian mengalami peningkatan menjadi 40% pada minggu ke-5 namun kembali mengalami penurunan menjadi 34% pada minggu ke-20. Rata-rata persentase hematokrit tikus P1 juga berfluktuasi yaitu 31,67% pada minggu ke-2 kemudian mengalami peningkatan menjadi 38,67% pada minggu ke-5 dan menurun kembali menjadi 36% pada minggu ke-20 (Gambar 1c). Hasil analisis statistika *Restricted Maximum Likelihood* (REML) terhadap persentase hematokrit menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata ( $P>0,05$ ). Kenaikan maupun penurunan kadar hematokrit pada minggu ke-2 hingga minggu ke-20 tidak berbeda nyata antar perlakuan.

Penurunan persentase hematokrit pada tikus P0 dapat dikaitkan dengan turunnya jumlah sel darah merah pada waktu yang sama. Selain itu, dapat juga disebabkan kehilangan darah akibat pengambilan darah secara berulang (Michealson dan Lin, 1987). Penurunan persentase hematokrit juga dapat disebabkan adanya proses destruksi eritrosit yang sudah tua. Eritrosit bertahan dalam sirkulasi selama  $\pm 120$  hari (Widyastuti, 2013). Eritrosit yang sudah tua akan dikeluarkan dari sirkulasi terutama oleh makrofag limpa dan sumsum tulang. Peningkatan persentase hematokrit tikus P0 cenderung normal namun peningkatan berlebih dapat mengindikasikan adanya dehidrasi, pendarahan, atau edema yang diakibatkan adanya pengeluaran cairan dari pembuluh darah (Wientarsih *et al.*, 2013). Studi De Jong *et al.* (1999) menunjukkan penurunan jumlah eritrosit, hemoglobin, dan hematokrit telah diamati pada hewan laboratorium setelah paparan benzo(a)piren yang diduga akibat toksisitas pada sel darah merah atau prekursor sel darah merah di sumsum tulang. Hal ini tidak sejalan dengan hasil penelitian yang cenderung berfluktuasi. Meningkatnya persentase hematokrit tikus P1 pada minggu ke-5 cenderung normal. Namun, mengalami penurunan pada minggu ke-20 yang diduga akibat adanya anemia yang didukung oleh jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin hasil penelitian yang mengalami penurunan setelah induksi benzo(a)piren.



Gambar 1. Rata-rata a) jumlah total eritrosit, b) kadar hemoglobin, dan c) persentase hematokrit tikus putih yang diberi perlakuan benzo(a)piren pada tiap minggunya. Keterangan: P0 = kontrol; P1 = kontrol positif.

Jumlah normal total leukosit (Gambar 3) pada tikus berkisar antara  $(2-10) \times 10^3 \mu\text{L}$  (Douglas dan Wardrop, 2010). Rata-rata kisaran total leukosit pada hasil penelitian ini yaitu  $(3,67-12,4) \times 10^3 \mu\text{L}$ . Tikus P0 cenderung mengalami peningkatan dengan rata-rata yaitu  $3,67 \times 10^3 \mu\text{L}$  pada minggu ke-2,  $6,96 \times 10^3 \mu\text{L}$  pada minggu ke-5 dan  $12,4 \times 10^3 \mu\text{L}$  pada minggu ke-20 yang berada di atas jumlah kisaran normal. Pada tikus-tikus P1 rata-rata jumlah total leukosit mengalami peningkatan pada minggu ke-5 dan mengalami penurunan pada minggu ke-20. Rata-rata jumlah total leukosit pada tikus P1 yaitu  $10,67 \times 10^3 \mu\text{L}$  pada minggu ke-2,  $7,5 \times 10^3 \mu\text{L}$  pada minggu ke-5 dan  $11,05 \times 10^3 \mu\text{L}$  pada minggu ke-20 yang berada di atas kisaran jumlah normal (Gambar 2a). Hasil analisis statistika *Restricted Maximum Likelihood* (REML) terhadap jumlah total leukosit menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ). Uji *post-hoc* Tukey menunjukkan pada minggu ke-2 tikus P0 berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) dengan tikus P1. Pada minggu ke-5 dan minggu ke-20, jumlah total leukosit antar perlakuan tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) (Tabel 1).

Pada tikus P0, total leukosit di minggu ke-20 berada di atas kisaran jumlah normal. Peningkatan tersebut merupakan respons untuk mengatasi maupun menghancurkan benda asing

yang masuk yang mungkin dapat mengganggu fungsi tubuh (Kataranovski *et al.*, 2009). Bila jumlah keseluruhan leukosit diatas  $10 \times 10^3 \mu\text{L}$ , hal ini menandakan tubuh sedang mengalami serangan benda asing dalam jumlah yang lebih besar dari biasanya. Hal ini dapat dipicu karena adanya infeksi (Pancawati *et al.*, 2015). Penurunan jumlah total leukosit tikus P1 pada minggu ke-5 diakibatkan adanya toksin yang disekresikan oleh tumor ganas selama perkembangannya sehingga dapat mengakibatkan penghancuran leukosit (Uno *et al.*, 2004). Peningkatan total leukosit tikus P1 pada minggu ke-20 kemungkinan diakibatkan oleh proses metabolisme benzo(a)piren yang memengaruhi sel-sel stromal sumsum tulang belakang yang berperan dalam proses hematopoiesis (Galvan *et al.*, 2006; Latif *et al.*, 2010). Tikus yang diinduksi dengan benzo(a)piren selama proses tumorigenesis/pembentukan tumor mengalami peningkatan total leukosit (Anandakumar *et al.*, 2012).

Persentase normal neutrofil pada tikus berkisar antara 12-38% (Douglas dan Wardrop, 2010). Rata-rata kisaran persentase neutrofil pada hasil penelitian ini yaitu 16-48%. Pada tikus-tikus P0 dan P1 rata-rata persentase neutrofil cenderung mengalami peningkatan pada minggu ke-5 dan minggu ke-20. Rata-rata persentase neutrofil pada tikus P0 masih berada pada kisaran normal yaitu 19,67% pada minggu ke-2, 23,33% pada minggu ke-5 dan 30% pada minggu ke-20. Rata-rata persentase neutrofil pada tikus P1 yaitu 16% pada minggu ke-2, 27,33% pada minggu ke-5 dan 48% pada minggu ke-20 yang berada di atas kisaran normal (Gambar 2b). Hasil analisis statistika *Restricted Maximum Likelihood* (REML) terhadap persentase neutrofil menunjukkan bahwa tikus-tikus P0 dan P1 pada minggu ke-2 hingga minggu ke-20 tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) antar perlakuan.

Persentase neutrofil (Gambar 3a) tikus P0 meningkat namun masih berada pada kisaran normal. Peningkatan pada persentase neutrofil dapat diindikasikan adanya infeksi dalam proses mekanisme pertahanan tubuh. Jumlah neutrofil dalam darah yang meningkat menunjukkan adanya aktivitas pertahanan tubuh pertama yang dilakukan oleh neutrofil (Ali *et al.*, 2010). Peningkatan persentase neutrofil tikus P1 setelah induksi benzo(a)piren dapat disebabkan karena senyawa karsinogen mengeluarkan bahan kemotaktik yang dapat menarik neutrofil untuk datang dan merangsang sumsum tulang belakang melepaskan cadangan neutrofil, sehingga produksi neutrofil akan meningkat (Agra *et al.*, 2016).

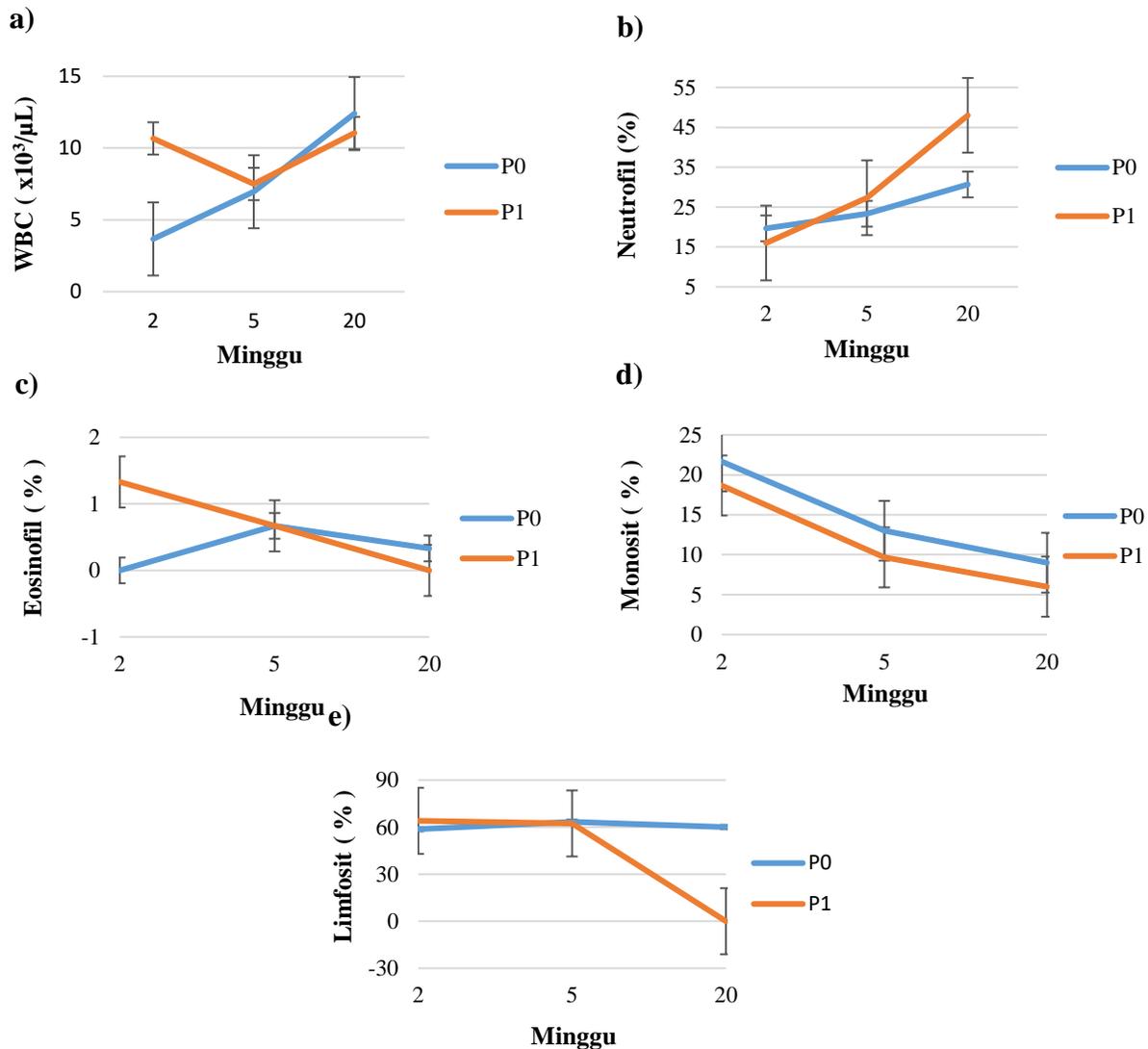
Persentase normal eosinofil (Gambar 3b) pada tikus berkisar antara 0-6% (Delwatta *et al.*, 2018). Rata-rata kisaran persentase eosinofil pada hasil penelitian ini masih berada pada kisaran normal yaitu 0-1,33%. Pada tikus P0 rata-rata persentase eosinofil berfluktuasi yaitu 0% pada minggu ke-2 kemudian mengalami peningkatan menjadi 0,67% pada minggu ke-5 dan mengalami penurunan menjadi 0,33% pada minggu ke-20. Pada tikus P1 rata-rata persentase eosinofil cenderung mengalami penurunan yaitu 1,33% pada minggu ke-2, 0,67% pada minggu ke-5 dan 0% pada minggu ke-20 (Gambar 2c). Hasil analisis statistika *Restricted Maximum Likelihood* (REML) terhadap persentase eosinofil menunjukkan bahwa adanya kenaikan maupun penurunan persentase eosinofil pada minggu ke-2 hingga minggu ke-20 antar perlakuan tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ). Dalam penelitian ini kemungkinan ditemukannya sel eosinofil disebabkan adanya tikus putih yang mengalami infeksi yang berasal dari parasit atau peradangan sehingga tubuh merespons dengan dikeluarkannya sel eosinofil. Namun, infeksi atau peradangan yang terjadi masih dalam kondisi yang normal karena persentase eosinofil berada pada kisaran normal.

Persentase normal basofil pada tikus berkisar antara 0-2% (Delwatta *et al.*, 2018). Pada hasil penelitian ini tidak ditemukan adanya basofil pada semua perlakuan sehingga rata-rata persentase basofil yaitu 0% yang masih berada pada kisaran normal. Hasil analisis statistika *Restricted Maximum Likelihood* (REML) terhadap persentase basofil menunjukkan antar perlakuan tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ). Basofil adalah jenis leukosit yang paling sedikit jumlahnya yaitu kira-kira kurang dari 2% dari jumlah keseluruhan leukosit. Sel basofil berfungsi pada respons penyakit alergi (Muhsin, 2017). Tidak ditemukannya sel basofil pada penelitian ini karena tidak ditemukannya tikus putih yang mengalami reaksi hipersensitivitas atau alergi.

Persentase normal monosit (Gambar 3c) pada tikus berkisar antara 1-6% (Douglas dan Wardrop, 2010). Rata-rata persentase monosit pada hasil penelitian ini yaitu 6,00-21,67% dan pada semua perlakuan cenderung menunjukkan adanya penurunan dari minggu ke-2 hingga minggu ke-20. Rata-rata persentase monosit pada tikus P0 yaitu 21,67% pada minggu ke-2, 13% pada minggu ke-5 dan 9% pada minggu ke-20. Rata-rata persentase monosit pada tikus P1 yaitu 18,67% pada minggu ke-2, 9,67% pada minggu ke-5 dan 6% pada minggu ke-20 (Gambar 2d). Hasil analisis statistika *Restricted Maximum Likelihood* (REML) terhadap persentase monosit menunjukkan bahwa adanya kenaikan maupun penurunan persentase monosit pada minggu ke-2 hingga minggu ke-20 tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ) antar perlakuan.

Sel monosit berfungsi sebagai fagosit terhadap zat asing di dalam pembuluh darah, setelah masuk ke jaringan, sel monosit mengalami proses pematangan menjadi makrofag yang berperan membersihkan tubuh dari sel mati atau debris lainnya (Mayer dan Gustafson, 2008). Rataan jumlah monosit yang berada di atas normal disebabkan monosit berperan dalam mengatur tanggapan kebal dengan mengeluarkan glikoprotein pengatur monokin seperti interferon, interleukin I, dan zat farmakologi aktif seperti prostaglandin dan lipoprotein. Monosit pula mengolah bahan asing sedemikian rupa sehingga bahan asing itu dapat membangkitkan tanggapan kebal. Terjadinya penurunan persentase monosit pada tikus P0 diduga karena tidak terjadi peningkatan aktivitas fagositosis terhadap benda asing dalam perbaikan jaringan yang rusak karena kondisi hewan percobaan yang tergolong dalam kondisi normal (Astuti dan Nurainy, 2011). Sementara penurunan persentase monosit pada tikus P1 diduga akibat depresi pada sumsum tulang yang menyebabkan kerusakan stem sel hematopoetik pluripoten. Sasaran toksisitas benzo(a)piren adalah sel-sel hematopoetik yang berkembang dari sumsum tulang (Schneider *et al.*, 2002). Studi yang dilakukan Gangar *et al.* (2010) menunjukkan tikus yang diinduksi dengan benzo(a)piren selama proses tumorigenesis/pembentukan tumor mengalami penurunan pada persentase monosit.

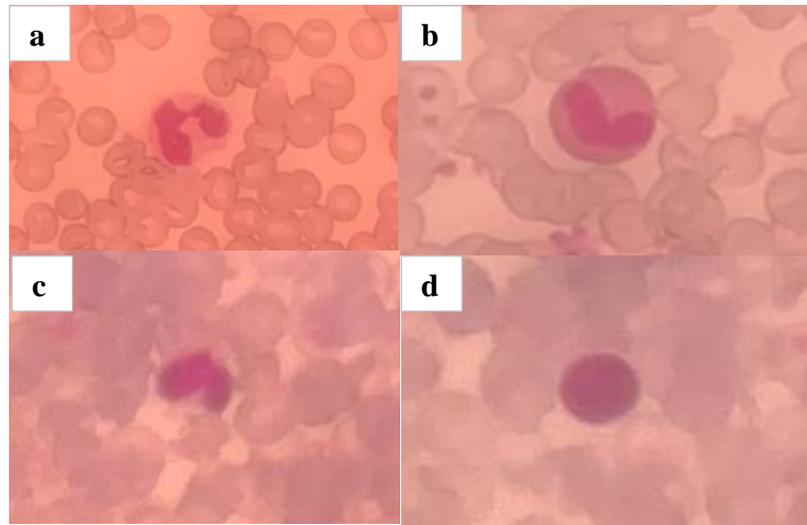
Persentase normal limfosit (Gambar 3d) pada tikus berkisar antara 60-75% (Douglas dan Wardrop, 2010). Rata-rata persentase limfosit pada hasil penelitian ini yaitu 46-64%. Pada tikus P0 rata-rata persentase limfosit berfluktuasi yaitu 58,67% pada minggu ke-2 yang berada di bawah kisaran normal kemudian mengalami peningkatan menjadi 63,33% pada minggu ke-5 dan mengalami penurunan menjadi 60% pada minggu ke-20. Pada tikus P1 rata-rata persentase limfosit cenderung mengalami penurunan yaitu 64% pada minggu ke-2, 62% pada minggu ke-5 dan 46% pada minggu ke-20 yang berada di bawah kisaran normal (Gambar 2e). Hasil analisis statistika *Restricted Maximum Likelihood* (REML) terhadap persentase limfosit menunjukkan bahwa adanya peningkatan maupun penurunan persentase limfosit pada minggu ke-2 hingga minggu ke-20 tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) antar perlakuan.



Gambar 2. Rata-rata persentase a) jumlah total leukosit b) persentase neutrofil c) persentase eosinofil, d) persentase monosit dan e) persentase limfosit tikus putih yang diberi perlakuan benzo(a)piren pada tiap minggunya. Keterangan: P0 = kontrol; P1 = kontrol positif.

Sel limfosit merupakan salah satu sel imun yang teraktivasi jika sel terpapar senyawa asing, antigen atau adanya kerusakan jaringan (Barrett *et al.*, 2003). Penurunan persentase limfosit dapat disebabkan adanya migrasi limfosit dari sirkulasi darah ke jaringan sedangkan, peningkatan persentase limfosit dapat terjadi apabila ada kerusakan sel-sel pada jaringan atau organ tubuh yang mengharuskan adanya respons untuk destruksi sel-sel yang mengalami kerusakan atau apoptosis

(Widyastuti, 2013). Faktor lain yang juga dapat menyebabkan peningkatan persentase limfosit adalah stres (Sarmin *et al.*, 2009).



Gambar 3. Diferensial sel darah putih (leukosit) tikus putih yang diberi perlakuan benzo(a)piren a) neutrofil, b) eosinofil, c) monosit d) limfosit (Perbesaran 400 kali).

Persentase limfosit di bawah kisaran normal dapat disebabkan oleh banyaknya limfosit yang sudah berada di jaringan (Widyastuti, 2013). Selain itu, peningkatan dan penurunan neutrofil berhubungan pula dengan peningkatan dan penurunan jumlah limfosit, apabila jumlah neutrofil meningkat maka diikuti pula dengan menurunnya jumlah limfosit, begitu pula sebaliknya (Astuti *et al.*, 2011). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian dengan rerata persentase neutrofil yang berhubungan dengan hasil rerata persentase limfosit. Penurunan persentase limfosit pada tikus P1 diakibatkan toksin yang disekresikan oleh tumor ganas selama perkembangannya (Uno *et al.*, 2004). Selain bersifat karsinogenik, benzo(a)piren juga bersifat hematotoksik dan imunotoksik (Anandakumar *et al.*, 2012). Studi yang dilakukan Gangar *et al.* (2010) menunjukkan tikus yang diinduksi dengan benzo(a)piren selama proses tumorigenesis/pembentukan tumor mengalami penurunan pada persentase limfosit.

## **SIMPULAN**

Induksi senyawa karsinogen benzo(a)piren pada tikus putih penderita fibrosarkoma menunjukkan adanya fluktuasi pada profil hematologi.

### **SARAN**

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait jumlah dan durasi pemberian senyawa benzo(a)piren, serta jumlah ulangan dalam penelitian untuk memperkaya hasil penilaian hematologi dan menentukan efektivitas karsinogen senyawa benzo(a)piren.

### **UCAPAN TERIMA KASIH**

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak terkait atas bantuan yang diberikan demi kelancaran penelitian yang dilakukan.

### **DAFTAR PUSTAKA**

- Agra MEL, Widiastuti N, Nurcahyani H, Busman. 2016. Uji senyawa taurin sebagai antikanker terhadap jumlah sel-sel leukosit dan sel-sel eritrosit mencit (*mus musculus*) yang diinduksi benzo(a)pyren secara *in vivo*. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan* 16(2): 68-75.
- Ali K, Sutaryo, Purwanto I, Mulatsih S, Supriyadi. 2010. Yogyakarta pediatric cancer registry: an international collaborative project of university gadjah mada, university of saskatchewan, and the saskatchewan cancer agency. *Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention* 11(1): 131-136.
- Anandakumar P, Kamaraj S, Jagan S, Ramakrishnan G, Asokkumar S, Naveenkumar C, Raghunandhakumar S, Devaki T. 2012. Capsaicin inhibits benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in an *in vivo* mouse model. *Inflammation Research* 61(11): 1169-1175.
- Astuti S, Nurainy F. 2011. Profil Darah Tikus Akibat Pemberian Tepung Kedelai Kaya Isoflavon. Seminar Nasional Sains & Teknologi-IV. Lembaga Penelitian Universitas Lampung. Hotel Marcopolo, Bandar Lampung, 29-30 November 2011. Hlm. 14.
- Barrett AJ, Rezvani K, Solomon S, Dickinson AM. 2003. New developments in allotransplant immunology. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 1(1): 350–357.
- Brown JM. 1999. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy. *Cancer Research* 59: 5863-5870.
- Chauhan RS. 2010. *Textbook of Veterinary Pathology*. New Delhi, India. CBS Publisher. Hlm. 146-147.
- De Jong WH, Kroese ED, Vos JG, Van Loveren H. 1999. Detection of immunotoxicity of benzo(a)pyrene in a subacute toxicity study after oral exposure in rats. *Toxicol Sci* 50(2): 14-220.
- Delwatta SL, Gunatilake M, Baumans V, Seneviratne MD, Dissanayaka MLB, Batagoda SS, Udagedara AH, Walpola PB. 2018. Reference values for selected hematological, biochemical and physiological parameters of Sprague-Dawley rats at the Animal House. *Animal Model Exp Med* 1: 250-254.
- Douglas JW, Wardrop KJ. 2010. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th ed. New Jersey, United States. Wiley-Blackwell. Hlm. 852-887.

- Fajar BA, Mardina V, Alitrah NR. 2019. Pemberian ekstrak daun *Sphagneticola trilobata* terhadap profil eritrosit dan leukosit (*Mus musculus*) yang diinduksi 7,12 dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene (DMBA) pada jaringan payudara. *Jurnal Jeumpa* 6(1): 7-10.
- Galvan N, Page TJ, Charles JC, Jefcoate CR. 2006. Benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenzo(a)anthracene differentially affect bone marrow cells of the lymphoid and myeloid lineages. *Toxicology and Applied Pharmacology* 213: 105-116.
- Gangar SC, Sandhir R, Koul A. 2010. Effects of *azadirachta indica* on certain hematological parameters during benzo(a)pyrene induced murine forestomach tumorigenesis. *Medical and Pharmacological Sciences* 14(12): 1055-1072.
- Groopman JD, Wogan GN, Roebuck BD, Kensler TW. 1994. Molecular biomarkers for aflatoxins and their application to human cancer prevention. *Cancer Research* 54(7): 1907s-1911s.
- Hegazy AM, Bakry HH, El-Shawarby RM, Abou-Salem ME, Abd El-Aleem NM, Nasr SM. 2012. Effects of benzo(a)pyrene on blood components, tumor markers, and oxidatie status in mice. *Toxicological and Environmental Chemistry* 94(1): 136-145.
- Hockel M, Vaupel P. 2001. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 93: 266-276.
- Kartawiguna E. 2001. Faktor-faktor yang berperan pada karsinogenesis. *J Kedokteran Trisakti* 20(1): 1-16.
- Kataranovski MV, Radovic DL, Zolotarevski LD, Popov AD, Kataranovski DS. 2009. Immune-related health-relevant changes in natural populations of Norway rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769): White blood cell counts, leukocyte activity, and peripheral organ infiltration. *Arch Biol Sci Belgrade* 61(2): 213-223.
- Latif IK, Karim AJ, Zuki ABZ, Zamri-Saad M, Niu, JP, Noordin MM. 2010. Pulmonary modulation of benzo(a)pyrene-induced hemato and hepatotoxicity in broilers. *Poultry Science* 89: 1379-1388.
- Marlinda H, Widiastuti EL, Susanto GN, Sutyarso. 2016. Pengaruh pemberian senyawa taurin dan ekstrak daun dewa (*Gynura segetum* (Lour) Merr) terhadap eritrosit dan leukosit mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi benzo( $\alpha$ )piren. *Jurnal Natur Indonesia* 17(1): 13–21.
- Mayer A, Gustafson K. 2008. Antitumour and cytotoxic compounds. *European Journal Of Cancer* 44(16): 2357–2387.
- Michealson SM, Lin JC. 1987. *Biological Effects and Health Implications of Radiofrequency Radiation*. New York. Springer Science. Hlm. 498.
- Muhsin. 2017. Peran sel granulosit pada penyakit filariasis. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala* 17(1): 43-53.
- Nithya G, Mani R, Sakthisekaran D. 2014. Oral administration of thymoquinone attenuates benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in male Swiss albino mice. *Int J Pharm Pharm Sci* 6(7): 260-263.
- Pancawati A, Hesti S, Diarti MW. 2015. Profil leukosit tikus putih yang diberi air seduhan kelopak bunga rosela merah (*Hibiscus sabdariffa*). *Jurnal Kesehatan Prima* 9(2): 1534-1545.
- Sarmin PA, Kusumawati A, Airin CM, Maheswari H, Sjahfirdi L. 2009. Comparison level of cortisol and ratio of neutrophil/lymphocytes as accute stress marker to long road transportation of bligon bucks. International seminar on zoonotic and tropical disease. Hlm. 57-60.
- Schneider K, Roller R, Kalberlah F, Schuhmacher-Wolz U. 2002. Cancer risk assessment for oral exposure to PAH mixtures. *J Appl Toxicol* 22(1): 73-83.

- Sewoyo PS, Adi AAAM, Winaya IBO. 2021a. Profil bobot badan dan tingkat mortalitas tikus galur sprague dawley selama pembentukan fibrosarkoma yang dipicu oleh benzo(a)piren. *Indonesia Medicus Veterinus* 10(1): 1-11.
- Sewoyo PS, Adi AAAM, Winaya IBO, Sampurna IP, Bramardipa AAB. 2021b. The Potency of Virulent Newcastle Disease Virus Tabanan-1/ARP/2017 as Virotherapy Agents in Rat Fibrosarcoma Models. *Journal of Advanced Veterinary Research* 11(2): 64-68.
- Uno S, Dalton TP, Derkenne S, Curran CP, Miller ML, Shertzer HG, Nebert DW. 2004. Oral exposure to benzo(a)pyrene in the mouse: Detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation. *Molecular Pharmacology* 65: 1225-1237.
- Vander STJ. 2000. Unusual primary tumors of the heart. *Semin Thorac Cardivasc Surgis* 12(2): 89-100.
- Widyastuti DA. 2013. Profil darah tikus putih wistar pada kondisi subkronis pemberian natrium nitrit. *Jurnal Sain Veteriner* 31(2): 201-215.
- Wientarsih I, Widhyari SD, Aryanti T. 2013. Kombinasi imbuhan herbal kunyit dan zink dalam pakan sebagai alternatif pengobatan kolibasilosis pada ayam pedaging. *Jurnal Veteriner* 14(3): 327-334.