

Pola Distribusi dan Eliminasi Logam Berat Timbal (Pb) dalam Tubuh pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

¹I Ketut Berata

¹Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana
Denpasar- Indonesia
berata_iketut@unud.ac.id

²Ni Nyoman Werdi Susari, ³I Made Kardena

²Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana
Denpasar, Indonesia
nnwsusari@unud.ac.id

³Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana

Denpasar, Indonesia
imadekardena@unud.ac.id

Abstract— Setiap jaringan tubuh hewan memiliki variasi dalam hal daya akumulatif terhadap logam berat timbal (Pb). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pola distribusi dan eliminasi Pb dalam tubuh hewan. Penelitian menggunakan 24 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan yang dibagi atas 4 kelompok perlakuan dengan 6 ulangan. Perlakuan berupa pemberian larutan Pb asetat dalam PBS masing-masing dosis 0,00 ppm sebagai kontrol (T1), dosis 0,50 ppm (T2), dosis 1,00 ppm (T3) dan dosis 2,00 ppm (T4). Semua tikus diberikan pakan dan air minum *ad libitum*. Perlakuan diberikan selama 30 hari. Pada hari 31, diambil 3 ekor dari masing-masing kelompok perlakuan untuk dinekropsi dan diambil jaringan hati, ginjal, limpa, paru-paru, usus, jantung dan otak. Sedangkan 3 ekor dari masing-masing kelompok perlakuan dipelihara terus selama 30 hari tanpa pemberian larutan Pb asetat. Jaringan yang telah diambil selanjutnya dibuat sediaan histopatologi dengan metode pewarnaan hematoxylin-eosin (HE). Demikian pula untuk tikus yang dipelihara selama 30 hari selanjutnya, dilakukan hal yang sama pada hari ke 61. Hasil pemeriksaan histopatologi dibuat skoring sesuai tingkat lesi jaringan berupa degenerasi, peradangan, hemorhagis dan nekrosis. Hasil analisis statistik non parametrik menunjukkan pemberian dosis larutan Pb asetat dosis 2,00 ppm menimbulkan lesi yang signifikan pada hati, ginjal dan limpa dibandingkan dengan kontrol, dosis 0,50 ppm dan 1,00 ppm. Sedangkan pada tikus yang dipelihara berlanjut, diperoleh hasil yang signifikan pada hati. Dapat disimpulkan bahwa distribusi Pb dalam jaringan selama 30 hari, tertinggi pada hati, ginjal dan limpa. Eliminasi Pb dalam jaringan hati terjadi paling lambat dibandingkan jaringan lainnya.

Kata Kunci : distribusi, eliminasi, lesi jaringan, Pb asetat

I. PENDAHULUAN

Logam berat timbal (Pb) semakin meningkat di alam akibat degradasi dari barang-barang elektronik, bahan pewarna dan bahan kimia lainnya. Cemar Pb dapat mengancam kelestarian lingkungan tanah, air maupun udara. Hewan-hewan produksi termasuk sapi banyak dilaporkan terpapar Pb akibat memakan tanaman yang hidup di tanah yang tercemar Pb [1]. Demikian pula ternak sapi yang terpapar Pb, apabila dagingnya dikonsumsi manusia, akan menyebabkan manusia terpapar Pb. Begitulah siklus cemaran Pb akan terjadi secara berantai [2]. Walaupun kadar cemaran masih berada di bawah batas aman dikonsumsi yaitu <1,00 ppm (BSN, 2009), tetapi sifat akumulatif Pb sangat berisiko terhadap kesehatan manusia. Sifat akumulatif tersebut akibat Pb tidak dapat dimetabolisme dalam tubuh [3].

Logam berat Pb sangat membahayakan kesehatan hewan maupun manusia. Keracunan logam berat Pb umumnya dapat menyebabkan degenerasi otak [4], anemia [5], menimbulkan penurunan imunitas terhadap agen infeksius [6], gastroenteritis dan ensefalopati [7]. Karakteristik Pb yaitu dapat mensubstitusi unsur besi (Fe) pada hemoglobin, menyebabkan terjadinya anemia [5]. Paparan kronis Pb pada hewan dapat menyebabkan kerusakan struktur jaringan hati, ginjal, limpa dan paru-paru [8]. Pada jaringan limfoid, cemaran Pb dapat merusak struktur (Tukay, et al., 2015) dan fungsinya [6]. Demikian pula sistem eliminasi logam berat timbal dari dalam tubuh,

kemungkinan juga seperti nutrisi lainnya. Untuk memastikannya, maka diperlukan penelitian tentang pola distribusi dan eliminasi logam berat timbal pada tubuh hewan coba.

II. METODE DAN PROSEDUR

2.1. Sampel dan perlakuan

Penelitian menggunakan 32 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar, dewasa, berat badan 250-300 g. Hewan coba dibagi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol (P0) dan kelompok yang diberikan larutan Pb 2,0 ppm (P1) secara oral, setiap hari selama 30 hari. Pada hari ke 31 (fase I) diambil masing-masing 8 ekor, selanjutnya dinekropsi dan diambil organ hati, ginjal, limpa, paru-paru, usus, otot jantung dan otak. Sisa 8 ekor dari masing-masing kelompok perlakuan, dipelihara secara berlanjut tanpa pemberian larutan Pb. Pada hari ke 61 (Fase II), semua hewan coba dinekropsi dan diambil organ hati, ginjal, limpa, paru-paru, usus, otot jantung dan otak. Setelah organ diambil pada fase I dan fase II, dimasukkan ke dalam larutan neutral duffer formalin 10% (NBF) dan selanjutnya diproses untuk dibuat sediaan histopatologi.

Larutan Pb asetat 2,0 ppm dibuat dari 2 mg Pb asetat dalam 1 liter aquades. Sebelum diberikan pada hewan coba, dikocok terlebih dahulu agar konsentrasinya sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan. Pemberian dilakukan dengan memakai sonde agar sesuai dengan konsentrasi Pb asetat perlakuan.

2.2. Pembuatan sediaan histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi jaringan sesuai dengan metode Kiernan [9]. Jaringan difiksasi dengan merendam organ ke dalam larutan *Buffer Neutral Formalin 10%* dengan perbandingan lebih kurang 1 : 20 (volume organ/volume formalin) selama \pm 48 jam pada suhu kamar. Jaringan yang telah difiksasi kemudian diiris dengan ukuran 1 x 1 x 1 cm agar dapat dimasukkan ke dalam kotak untuk diproses dalam *tissue processor*. Tahap selanjutnya adalah dehidrasi dengan merendam sediaan kedalam alkohol secara berturut-turut dengan konsentrasi alkohol 70%, 80%, 90%, alkohol absolut I, alkohol absolut II, dengan lama waktu masing-masing perendaman selama \pm 2 jam. Selanjutnya dilakukan *clearing* untuk membersihkan sisa alkohol dari jaringan. Setelah di bersihkan, jaringan siap untuk dimasukkan ke dalam blok parafin. Langkah berikutnya adalah *embedding* dan *blocking*. Organ ditanam pada blok parafin yang telah disediakan kemudian disimpan dalam lemari es selama 24 jam. Blok-blok parafin tersebut kemudian dipotong (*cutting*) dilakukan dengan menggunakan *microtome* dengan ketebalan 4-5 μ m. Jaringan yang terpotong selanjutnya diapungkan dalam *water bath* dengan suhu 60°C untuk menghindari terjadi lipatan irisan jaringan setelah pemotongan. Sediaan dipindahkan ke *object glass*. Selanjutnya dikeringkan dalam suhu kamar 26-27°C. Proses selanjutnya adalah pewarnaan sediaan jaringan dengan metode Harris Hematoksilin-Eosin (HE). Prosedur pewarnaan meliputi tahap deparafinasi yaitu merendam preparat diatas gelas objek dalam xylol bertingkat I-III masing-masing selama lima menit. Setelah itu dehidrasi dengan tujuan untuk memberikan air pada jaringan yaitu dengan cara merendam preparat dalam larutan alkohol absolut lalu dipindahkan ke larutan alkohol 95% dengan durasi masing-masing lima menit. Lalu dibilas dengan air mengalir selama 1 menit.

Preparat kemudian direndam dalam larutan Harris hematoksilin selama 15 menit. Celupkan ke dalam aquades selama 1 menit dengan cara mengangkat dan menurunkan, selanjutnya celupkan ke dalam campuran asam-alkohol 1% secara cepat 5-7 celupan. Lalu bilas dalam aquades selama 1 menit dan bilas kembali dengan aquades selama 15 menit. Celup sebanyak 3-5 kali dalam larutan lithium karbonat selama 15-30 detik hingga potongan berwarna biru cerah dan kemudian cuci dengan air mengalir selama 15 menit. Preparat kemudian direndam dalam eosin selama 2-3 menit. Berikutnya dilakukan tahapan dehidrasi dengan memasukkan preparat dalam alkohol bertingkat dari 80%, 90% dan 95% hingga alkohol absolut I-III. Selanjutnya dilakukan *clearing* yaitu dengan memasukkan preparat pada xylol I-II dan dikeringkan. Selanjutnya dilakukan proses *mounting* yaitu penutupan preparat dengan *cover glass* dengan menggunakan *permount* sebagai perekat. Selanjutnya sediaan histopatologi diamati dibawah mikroskop.

2.3. Kategori pemeriksaan Jaringan

Pemeriksaan jaringan hati, ginjal, limpa, paru-paru, usus, otot jantung dan otak didasarkan pada adanya lesi pendarahan, peradangan dan nekrosis. Tingkat keparahan masing-masing lesi tersebut didasarkan pada luasnya area lesi meliputi fokal, multifokal dan difusa. Analisis data hasil pemeriksaan dilakukan secara deskriptif kualitatif.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Tabulasi perubahan histopatologi jaringan akibat pemberian logam berat Pb

Jaringan	Perlakuan	Derajat keparahan Lesi histopatologi						Kategori Keparahan	
		Pendarahan		Peradangan		Nekrosis		Fase I	Fase II
		Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II		
Hati	P0	+	-	+	-	-	-	Normal	Normal
	P1	++	++	+++	++	+	-	Parah	ringan
Ginjal	P0	+	-	+	-	-	-	Normal	Normal
	P1	++	-	+++	+	-	-	Parah	ringan
Limpa	P0	+	-	+	-	-	-	Normal	Normal
	P1	++	+	+++	+	+	-	Parah	ringan
Paru-paru	P0	+	-	+	-	-	-	Normal	Normal
	P1	++	-	++	-	+	-	Ringan	Ringan
Usus	P0	+	-	+	-	-	-	Normal	Normal
	P1	+	-	-	-	-	-	Normal	Normal
Jantung	P0	-	-	-	-	-	-	Normal	Normal
	P1	-	-	-	-	-	-	Normal	Normal
Otak	P0	-	-	-	-	-	-	Normal	Normal
	P1	-	-	-	-	-	-	Normal	Normal

Keterangan : P0= tanpa pemberian Pb; P1=Pemberian Pb 2,0 ppm

Derajat keparahan : N=normal; +=ringan; ++=Sedang; +++= parah

Fase I = perlakuan pemberian Pb selama 30 hari. Fase II = hari ke 31-61

Dampak dari pemberian logam berat Pb yang didasarkan pada tingkat keparahan lesi histopatologi terlihat jaringan hati, ginjal dan limpa paling dominan pada fase I perlakuan. Hasil tersebut sesuai dengan laporan bahwa akumulasi logam berat umum terjadi pada hati dan ginjal [10]. Pada sapi yang dipelihara di tempat pembuangan sampah menunjukkan pada hati dan ginjal terbanyak mengandung logam berat Pb [11]. Hati sebagai organ pusat metabolisme akan selalu berupaya memetabolisme berbagai bahan organik dan anorganik yang masuk tubuh. Sedangkan ginjal merupakan organ yang berperan dalam ekskresi sangat rentan terhadap bahan-bahan beracun termasuk logam berat.

Limpa sebagai organ pembentuk sel darah (eritropoesis) memiliki pola berbeda dari pada hati dan ginjal. Logam berat Pb pada limpa dapat menimbulkan kerusakan struktur jaringan limpa [12]. Partikel logam berat Pb dalam sirkulasi akan menyebabkan peroksidasi atau toksisitas pada setiap jaringan yang dilewati. Akibat toksisitas tersebut menyebabkan terbentuknya radikal bebas dan merusak struktur sel sehingga mengalami pendarahan, peradangan dan nekrosis dalam berbagai tingkat keparahan [7][13]. Toksisitas kronis logam berat Pb pada jaringan limfoid terutama limpa, dapat menyebabkan terjadinya imunotoksitas [6].

Pada paru-paru terjadi pendarahan dan peradangan tingkat sedang pada fase I menunjukkan bahwa ada partikel logam berat Pb yang lewat di sirkulasi paru-paru. Sistem sirkulasi yang sangat kompleks dan intensif, menyebabkan paru-paru sangat peka terhadap kontaminasi bahan-bahan anorganik [2].

Pada usus terdapat perubahan berupa pendarahan dan peradangan ringan, menunjukkan bahwa pada konsentrasi 2,0 ppm logam berat Pb sudah dapat menimbulkan lesi di usus. Logam berat Pb di usus terseleksi, dimana partikel kecil akan diserap dan partikel lainnya diekskresikan [7]. Adanya logam berat Pb kadar tinggi dalam usus dapat menyebabkan perubahan perilaku pada hewan [14].

Jaringan jantung dan otak secara keseluruhan tidak ada lesi pendarahan, peradangan maupun nekrosis. Tampaknya pada pemberian Pb dosis 2,0 ppm belum menimbulkan lesi histopatologi. Kalau pada manusia, perubahan berupa degenerasi otak dapat terjadi akibat kontaminasi yang lama [4].

IV. KESIMPULAN

Distribusi Pb dalam jaringan berdasarkan lesi histopatologi, secara berurutan pada fase I tinggi pada hati, ginjal, limpa dan paru-paru. Sedangkan pada usus, otot jantung dan otak, secara umum normal. Pada fase II ditemukan lesi histopatologi hanya pada hati, menunjukkan bahwa eliminasi Pb dalam jaringan hati paling lambat dari jaringan lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Rektor Universitas Udayana cq Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat (LPPM) Universitas Udayana atas dana PNPB tahun 2021 yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1]. F. Malhat, M. Hagag, A. Saber, and AE. Fayz.. Contamination of cows milk by heavy metal in Egypt. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2012. 88(4): 611-613.
- [2]. C. Abdelbasset, E. Rabia, B. Abdallah, N. Boubker and E. AbdelKhalid. Distribution of trace elements and heavy metals in liver, lung, meat, heart and kidney of cattle, sheep, camel and equine slaughtered in Casablanca city-Morocco. *Int. J. Sci. Engin. Res.* 2014.5(2): 294-303.
- [3] S. Jadoon and A. Malik. DNA damage by heavy metals in animals and human beings: an overview. *Biochem. Pharmacol.* 2017.6(3): 1-8.
- [4]. KJ. Barnham, AI. and Bush. Biological metals and metal-targeting compounds in neurodegenerative diseases. *Chem. Soc. Rev.* 2014.43, 6727–6749.
- [5]. WH. Jang, KM. Lim, K. Keunyoung, JH. Noh, S. Kang, YK. Chang and JH. Chung. Low level of lead can induce phosphatidylserine exposure and erythrophagocytosis: a new mechanism underlying lead-associated anemia. *Toxicol. Sci.* 2011.122(1): 177-184.
- [6]. TE. Miller, IKA. Golemboski, RS. Ha, T. Bunn, FS. Sanders and RR. Dietert. Developmental exposure to lead causes persistent immunotoxicity in fischer 344 rats. *Toxicol. Sci.* 1988.42: 129-135.
- [7]. R. Brochin, S. Leone, D. Phillips, N. Shepard, D. Zisa, and A. Angerio. The cellular effect of lead poisoning and its clinical picture. *The Georgetown Undergraduate J. Health Sci.* 2008. 5(2): 1–8.
- [8]. F. Muselin, A. Trif, D. Brezovan, A. Stancu, and P. Snejana. The consequences of chronic exposure to lead on liver, spleen, lungs and kidney arhitectonics in rats. *Lucrari Știintifice Med. Vet.* 2010. 43(2): 123-127.
- [9]. J.A. Kiernan. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice.* 5th edition, Scion Publishing, 2015, 571 pp
- [10]. MHM. Garcia, DH. Moreno, FS. Rodriguez, AL. Beceiro, LEF. Alvaraez, and MP. Lopez. Sex- and age-dependent accumulation of heavy metals (Cd, Pb and Zn) in liver, kidney and muscle of roe deer (*Capreolus capreolus*) from NW Spain. *J. Environ Sci and Health Part A.* 2011.4(2): 109-116.
- [11]. IK. Berata, NNW. Susari, IM. Kardena, IBO. Winaya, and IBP. Manuaba. Comparison of lead contamination in innards and muscle tissues of Bali cattle reared in Suwung Landfil. *Bali Med. J.* 2017. 6(1): 147-149.
- [12] M. Turkay, H. Turker, and T. Guven. Ultrastructural effects of lead acetate on the spleen of rats. *Turk J. Biol.* 2015. 39: 511-516.
- [13] B. Sharma, S. Singh, and NJ. Siddiqi. Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems: review article. *Bio. Med. Res. Int.* 2014(640754): 1-26.
- [14] S. Roggeman, N. van den Brink, N. der Van Praet, R. Blust, and L. Bervoets. Metal exposure and accumulation patterns in free-range cows (*Bos taurus*) in a contaminated natural area: Influence of spatial and social behavior. *Environ. Pollut.* 2013.72: 186-199.