

Profil Darah Tikus Putih Wistar pada Kondisi Subkronis Pemberian Natrium Nitrit

Blood Profiles of Wistar RatS due to Subchronic Condition Caused by Sodium Nitrite

Dyah Ayu Widyastuti¹

¹Program Studi Biologi Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
Email: dyah.ayu@mail.ugm.ac.id

Abstract

Nowadays, chemicals used as food additives are increasing. One of the chemicals commonly used is sodium nitrite (NaNO_2). Sodium nitrite is found in sausage and another meat product. Sodium nitrite is used as food preservative agent. But, the presence of NaNO_2 can influence blood cells ability to carry oxygen. It causes anemia and forms nitrosamines, carcinogenic agents. This research is purposed to know blood profiles of Wistar rats on subchronic condition caused by NaNO_2 . The research was done for 3 months as subchronic time. Twenty seven Wistar rats were divided into 3 groups, control group (K), first group (P1) treated by NaNO_2 with dose of 11,25 mg/kg bodyweight/day, and second group (P2) treated by NaNO_2 with dose of 22,50 mg/kg bodyweight/day. Blood samples were collected from orbital sinus and tested once a week for hematological parameters, including white blood cells (WBC), red blood cells (RBC), hemoglobin (Hb), hematocrit (HCT), lymphocyte level, and neutrophil level. The data were analyzed with ANOVA using SPSS 16 program for Windows and the blood profiles alteration were seen. The results from this study showed there were no significant differences among the blood profiles of Wistar rats treated by NaNO_2 with dose of 11,25 mg/kg bodyweight/day and dose of 22,50 mg/kg bodyweight/day compared to that of the control group, except WBC values at subchronic condition at dose of 22,50 mg/kg bodyweight/day which decreased 23,46%. The NaNO_2 could not influence the blood profiles of rats treated by NaNO_2 subchronically.

Key words: sodium nitrite (NaNO_2), blood profiles, subchronic, Wistar rats, orbital sinus

Abstrak

Penggunaan bahan kimia sebagai bahan tambahan pangan semakin berkembang. Salah satu yang umum digunakan adalah natrium nitrit (NaNO_2) pada sosis dan produk olahan daging lain. Natrium nitrit berfungsi sebagai pengawet makanan, tetapi NaNO_2 dapat mempengaruhi kemampuan eritrosit membawa O_2 , menyebabkan anemia dan membentuk nitrosamin yang karsinogenik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil darah tikus putih Wistar pada kondisi subkronis akibat pemberian NaNO_2 . Penelitian ini dilakukan selama 3 bulan pada kondisi subkronis, digunakan 27 ekor tikus putih Wistar. Perlakuan yang diberikan meliputi kontrol (K), perlakuan 1 (P1) dengan dosis NaNO_2 11,25 mg/kgBB/hari, dan perlakuan 2 (P2) dengan dosis 22,50 mg/kgBB/hari. Pengambilan sampel darah dilakukan setiap minggu melalui sinus orbitalis dan diuji leukosit total (WBC), eritrosit total (RBC), kadar hemoglobin (HGB), persentase hematokrit (HCT), persentase limfosit, dan persentase neutrofil. Data dianalisis dengan ANOVA menggunakan program SPSS 16 *for Windows* dan diamati perubahan profil darahnya. Hasil penelitian menunjukkan tidak ada beda nyata antara profil darah tikus putih Wistar kelompok Kontrol, dosis NaNO_2 11,25 mg/kgBB, dan dosis NaNO_2 22,50 mg/kgBB, kecuali pada penurunan WBC pada kelompok dosis 22,50 mg/kgBB pada kondisi subkronis, yaitu sebesar 23,46%. Pemberian NaNO_2 pada kondisi sub kronis belum berpengaruh pada profil darah tikus putih uji.

Kata Kunci: natrium nitrit (NaNO_2), profil darah, sub kronis, tikus putih Wistar, sinus orbitalis

Pendahuluan

Penggunaan bahan kimia sebagai bahan tambahan makanan (*food additive*, saat ini, banyak sekali ditemui pada makanan maupun minuman. Natrium nitrit (NaNO_2) merupakan salah satu pengawet yang banyak digunakan, terutama untuk produk-produk olahan daging (Stanojevic *et al.*, 2009). Bahan pengawet dapat mempengaruhi kemampuan eritrosit untuk membawa oksigen, menyebabkan anemia, dan membentuk nitrosamin yang bersifat karsinogenik (Husni dkk., 2007). Selain itu, menurut Bara *et al.* (2011), NaNO_2 juga dapat membentuk N-nitrosamin jika terjadi interaksi antara nitrit dengan amin.

Sel darah, khususnya eritrosit memiliki fungsi salah satunya untuk mengangkut oksigen yang dibutuhkan dalam proses metabolisme tubuh. Menurut Yuningsih (2007), dengan adanya nitrit yang masuk ke dalam tubuh dapat mempengaruhi kemampuan eritrosit dalam membawa oksigen, menyebabkan kesulitan bernapas, sakit kepala,

anemia, muntah, dan radang ginjal. Berkurangnya kemampuan eritrosit untuk membawa oksigen terjadi karena hemoglobin dalam eritrosit berikatan dengan NO dari NaNO_2 membentuk nitrosohemoglobin sehingga kadar hemoglobin dalam eritrosit menjadi berkurang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil darah tikus putih Wistar pada kondisi subkronis akibat pemberian natrium nitrit (NaNO_2).

Materi dan Metode

Pada penelitian ini digunakan hewan percobaan berupa 27 ekor tikus putih betina Wistar. Tikus putih tersebut dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu kontrol (K), perlakuan 1 dengan dosis NaNO_2 11,25 mg/kgBB (P1), dan perlakuan 2 dengan dosis 22,50 mg/kgBB (P2).

Natrium nitrit dibuat larutan stok dengan perbandingan untuk masing-masing dosis adalah 0,1125 g dan 0,225 g dilarutkan dalam 100 ml aquades. Pada tikus putih uji dengan berat 100 g,

diberikan 1 ml larutan stok *per oral*. Perlakuan *per oral* dilakukan setiap hari selama 90 hari. Volume larutan stok yang diberikan pada tikus putih uji disesuaikan dengan berat badan harian. Pengukuran berat badan dilakukan setiap hari selama perlakuan. Berat badan yang diperoleh kemudian digunakan untuk menentukan volume larutan stok NaNO₂ yang harus diberikan pada masing-masing tikus putih uji. Pakan diberikan setiap hari *ad libitum* yang ditempatkan pada kandang individu sehingga sisa pakan dapat ditimbang. Setiap hari diberikan pakan 25 g pada masing-masing tikus putih uji. Penimbangan sisa pakan dilakukan pada saat pergantian pakan baru. Sisa pakan yang terukur digunakan untuk menghitung konsumsi pakan harian.

Pengambilan darah dilakukan melalui sinus orbitalis sebanyak ±1 ml seminggu sekali pada hari ke-7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, dan 90. Sampel darah yang diambil ditempatkan pada tabung Eppendorf 1,5 ml yang telah berisi anti koagulan *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA). Selanjutnya, sampel darah diuji profil darah lengkap di LPPT Unit I Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dengan alat *hematology analyzer sysmax*. Parameter yang diamati adalah jumlah leukosit total, jumlah eritrosit total, kadar hemoglobin, persentase hematokrit, persentase limfosit, dan persentase neutrofil.

Data yang didapatkan dianalisis dengan ANOVA menggunakan program *spss 16 for Windows*. Berat badan, suhu tubuh, dan perilaku digunakan sebagai data parameter pendukung adanya pengaruh pemberian NaNO₂ dengan berbagai dosis dan lama perlakuan pada tikus putih uji.

Hasil dan Pembahasan

Penggunaan NaNO₂ dipilih karena kemampuannya untuk mencegah pembusukan daging oleh mikroorganisme, seperti *Clostridium botulinum* dan *Clostridium perfringens* (Sindelar and Milkowski, 2011). Natrium nitrit yang masuk ke dalam tubuh akan terurai menjadi nitrit yang bersifat toksik karena senyawa nitrit merupakan senyawa racun yang dapat terurai menjadi NO dan O. Nitroksida (NO) akan berikatan dengan darah membentuk nitrosohemoglobin yang mengakibatkan eritrosit kehilangan kemampuan mengikat oksigen (Yuningsih, 2007).

Pada penelitian ini digunakan NaNO₂ dengan dosis 11,25 mg/kgBB pada P1 dan 22,50 mg/kgBB pada P2. Konsentrasi NaNO₂ tersebut didasarkan pada nilai NaNO₂ yang terkandung per kg daging olahan, yaitu: 125 mg/kg daging (Cahyadi, 2006). Perlakuan dilakukan selama 90 hari untuk melihat efek subkronis pemberian NaNO₂ pada tikus putih uji. Masuknya NaNO₂ ke dalam tubuh sebenarnya tidak berpengaruh secara langsung pada leukosit karena NO yang berasal dari penguraian NaNO₂ lebih banyak berikatan dengan komponen eritrosit. Namun, dalam pengukuran profil darah ini tetap diukur jumlah leukosit total, persentase limfosit dan persentase neutrofil untuk melihat respon kekebalan tubuh yang ditunjukkan oleh respon sel-sel darah.

Jumlah leukosit total

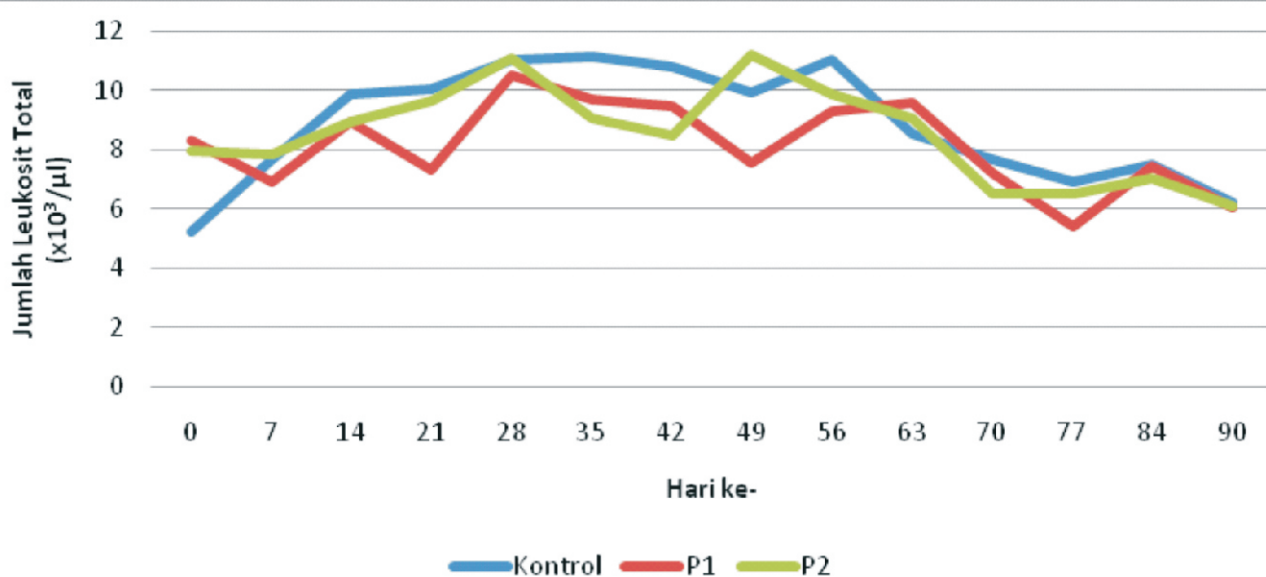
Hasil pengukuran jumlah leukosit total menunjukkan, bahwa jumlah leukosit total tikus putih uji yang diberikan perlakuan NaNO₂ secara oral masih berada pada kisaran normal menurut

Smith dan Mangkoewidjojo (1988), yaitu: $5,0-13,0 \times 10^3$ per mm^3 .

Pada Gambar 1, secara umum terlihat pada tiap kelompok perlakuan, jumlah leukosit total cenderung meningkat dan kemudian menurun setelah hari ke-56. Jumlah leukosit total yang terukur berkisar antara $5,27-11,23 \times 10^3/\mu\text{l}$. Pada perlakuan dosis NaNO_2 11,25 mg/kgBB dan 22,50 mg/kgBB, fluktuasi jumlah leukosit dari hari ke hari lebih terlihat dari pada kontrol, meskipun jumlah leukosit

total masih dapat dikatakan dalam kisaran normal.

Penurunan jumlah leukosit total terukur yang terjadi pada kondisi subkronis pada perlakuan dosis 11,25 dan 22,50 mg/kgBB (Tabel 1) dapat disebabkan oleh migrasi leukosit dari darah perifer ke jaringan. Migrasi tersebut dapat disebabkan karena adanya toleransi tubuh terhadap NaNO_2 yang diberikan. Selain itu, usia hewan coba juga dapat mempengaruhi produksi leukosit.



Gambar 1. Jumlah leukosit total (WBC) tikus putih betina Wistar selama 90 hari dengan perlakuan NaNO_2 . Keterangan: P1= perlakuan dosis NaNO_2 11,25 mg/kgBB; P2= perlakuan dosis NaNO_2 22,50 mg/kgBB.

Tabel 1. Persentase kenaikan dan penurunan jumlah leukosit total pada kondisi akut dan sub kronis dibandingkan dengan *base line*

Perlakuan	H-0	H-14	H-90
Kontrol	100%	87,28%	17,65%
P1	100%	7,68%	-27,61%
P2	100%	12,55%	23,46%

Keterangan: H-0= *base-line* (dianggap 100% jumlah leukosit total normal); H-14= akut; H-90= sub kronis; Tanda “-“= menunjukkan penurunan jumlah leukosit.

Menurut Dharma dkk. (2010), pada usia yang lebih tua, kemampuan tubuh untuk memproduksi leukosit lebih rendah daripada usia yang lebih muda karena sistem imun tubuh yang melibatkan leukosit lebih baik perkembangannya saat usia muda.

Peningkatan jumlah leukosit total pada kondisi akut (hari ke-14) tidak berbeda nyata pada semua perlakuan. Pada kondisi subkronis (hari ke-90), seperti yang terlihat pada Tabel 1, hanya tikus putih kontrol yang mengalami kenaikan jumlah leukosit jika dibandingkan dengan *base-line* (hari ke-0).

Sedangkan, perlakuan dosis 11,25 maupun 22,50 mg/kgBB mengalami penurunan jumlah leukosit totalnya. Penurunan jumlah leukosit pada kondisi sub kronis hanya berbeda nyata pada kelompok perlakuan NaNO₂ 22,50 mg/kgBB, yaitu mengalami penurunan sebesar 23,46%. Namun penurunan tersebut masih berada pada kisaran normal jumlah leukosit total (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

Leukosit berperan dalam respon imun tubuh. Apabila terdapat adanya benda asing yang masuk ke dalam tubuh, umumnya akan terjadi peningkatan jumlah leukosit total. Peningkatan tersebut merupakan respon untuk mengatasi maupun menghancurkan benda asing yang masuk yang mungkin dapat mengganggu fungsi tubuh (Kataranovski *et al.*, 2009). Hasil penelitian yang menunjukkan perubahan jumlah leukosit total yang relatif tidak signifikan tersebut mengindikasikan, bahwa NaNO₂ yang masuk masih dapat ditoleransi tubuh. Hal tersebut juga dapat terjadi karena masa perlakuan yang terlalu pendek karena umumnya bahan pengawet makanan akan

menunjukkan efek buruk setelah konsumsi bertahun-tahun.

Jumlah eritrosit total

Eritrosit merupakan jenis sel darah yang paling banyak jumlahnya di dalam peredaran darah normal. Fungsi utama eritrosit di dalam tubuh adalah membawa oksigen dan sari makanan untuk diedarkan ke seluruh tubuh (Yakubu and Afolayan, 2009). Eritrosit bersirkulasi hanya selama 3-4 bulan sebelum kemudian dirombak kembali (Campbell *et al.*, 2004). Jumlah eritrosit total pada tikus putih berkisar antara 7,2-9,6 juta per mm³ darah (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

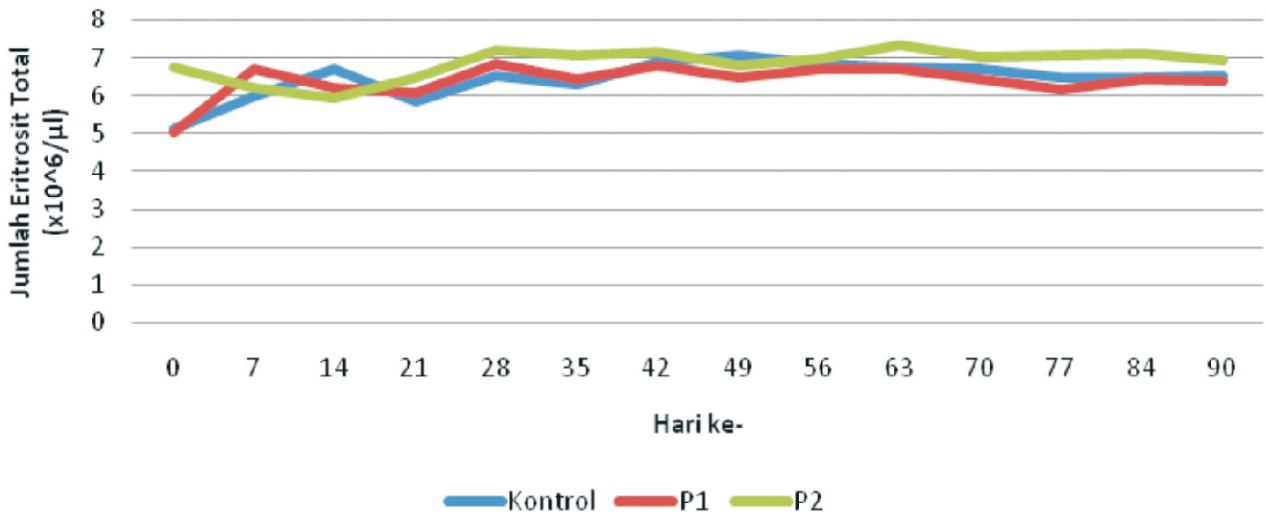
Pada hasil penelitian ini (Gambar 2), jumlah eritrosit total berkisar antara 5,04-7,33x10³/μl darah. Nilai tersebut sedikit di bawah jumlah eritrosit total pada kondisi normal (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Pada perlakuan NaNO₂ 22,50 mg/kgBB, jumlah eritrosit total cenderung lebih tinggi daripada kontrol maupun perlakuan NaNO₂ 11,25 mg/kgBB. Hal ini disebabkan oleh dosis NaNO₂ 22,50 mg/kgBB merupakan dua kali dosis aman 11,25 mg/kgBB. Dengan demikian, dimungkinkan terjadinya pengaruh yang lebih besar terhadap jumlah eritrosit total yang terukur.

Pada kondisi akut, jumlah eritrosit total pada perlakuan NaNO₂ 22,50 mg/kgBB menurun, tidak sesuai dengan kontrol yang mengalami kenaikan. Penurunan tersebut dapat diakibatkan oleh waktu edar eritrosit pada sirkulasi yang hanya ±120 hari. Pada kondisi akut dimungkinkan usia eritrosit yang sudah tua dan mulai didestruksi di hati maupun limpa, dan produksi eritrosit baru belum sempurna

sehingga jumlah eritrosit pada sirkulasi menurun. Menurut Preet and Prakash (2011), jumlah eritrosit total juga memiliki korelasi dengan persentase hemoglobin yang terukur.

Pada kondisi subkronis, pada kontrol, perlakuan dosis NaNO₂ 11,25 maupun 22,50

mg/kgBB, terjadi peningkatan jumlah eritrosit jika dibandingkan dengan *base-line* (Tabel 2). Penurunan jumlah eritrosit dibandingkan *base-line* hanya terjadi pada kondisi akut (hari ke-14) pada kelompok perlakuan dosis NaNO₂ 22,50 mg/kgBB.



Gambar 2. Jumlah eritrosit total (RBC) tikus putih betina Wistar selama 90 hari dengan perlakuan NaNO₂. Keterangan: P1= perlakuan dosis NaNO₂ 11,25 mg/kgBB; P2= perlakuan dosis NaNO₂ 22,50 mg/kgBB

Tabel 2. Kenaikan dan penurunan jumlah eritrosit total pada kondisi akut dan sub kronis dibandingkan dengan *base-line*

Perlakuan	H 0	H 14	H 90
Kontrol	100%	30,68%	27,18%
P1	100%	23,21%	26,59%
P2	100%	-12,00%	2,96%

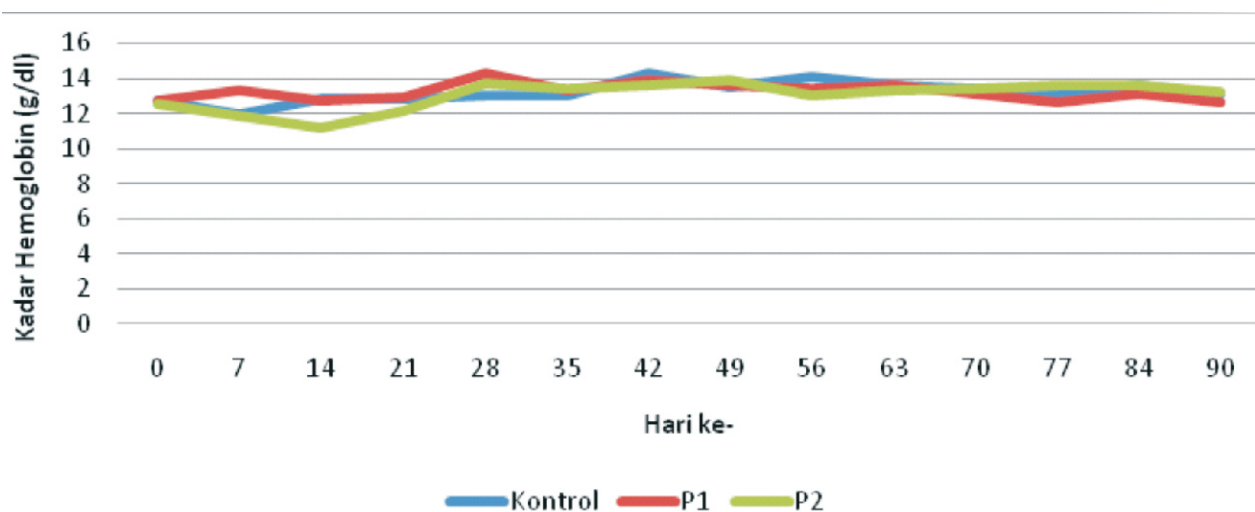
Keterangan : H-0= *base-line* (dianggap 100% jumlah eritrosit total normal); H-14 = akut; H-90= sub kronis; Tanda “-“= menunjukkan penurunan jumlah eritrosit total

Adanya reaksi antara NO dari NaNO₂ dengan komponen eritrosit, yaitu hemoglobin membentuk nitrosohemoglobin yang mengakibatkan kompetisi pengikatan O₂ oleh hemoglobin dengan NO dan methemoglobin yang tidak memiliki kemampuan untuk mengikat O₂ sehingga O₂ yang terikat lebih rendah dan mengaktifkan hormon eritropoietin yang memicu eritropoiesis. Peningkatan maupun penurunan jumlah eritrosit total yang terjadi, baik pada kondisi akut maupun subkronis tidak menunjukkan beda nyata antar perlakuan. Hal tersebut berarti bahwa pemberian NaNO₂ pada tikus putih uji dengan dosis 11,25 mg/kgBB maupun dosis tinggi 22,50 mg/kgBB tidak memberikan pengaruh yang nyata pada jumlah eritrosit total tikus putih uji pada kondisi subkronis (90 hari). Jumlah eritrosit normal

yang terukur normal mengindikasikan pula kondisi tikus putih uji dengan perlakuan NaNO₂ dalam kondisi subkronis masih dapat mentoleransi adanya bahan pengawet tersebut.

Kadar hemoglobin

Hemoglobin adalah substansi utama penyusun eritrosit yang terdiri dari protein (globin) dan bagian non-protein (heme). Hemoglobin dapat mengikat oksigen pada bagian heme membentuk oksihemoglobin. Menurut Kumar *et al.* (2011), kadar hemoglobin merupakan salah satu parameter untuk mengetahui terjadinya anemia. Kadar hemoglobin yang terukur pada penelitian menunjukkan hasil yang cenderung konstan dan berada pada kisaran normal (Gambar 3).



Gambar 3. Kadar hemoglobin tikus putih betina Wistar selama 90 hari dengan perlakuan NaNO₂. Keterangan: P1 = perlakuan dosis NaNO₂ 11,25 mg/kgBB; P2 = perlakuan dosis NaNO₂ 22,50 mg/kgBB.

Afinitas hemoglobin terhadap oksigen dipengaruhi oleh pH, suhu dan konsentrasi hemoglobin di dalam eritrosit. Kemampuan hemoglobin berikatan dengan oksigen bersifat reversibel dan terjadi secara bebas (Ganong, 1992). Menurut Mitruka and Rawnsly (1981), kadar hemoglobin normal pada tikus putih antara 11,1-18 g/dl. Pada penelitian ini, kadar hemoglobin yang terukur antara 11,2-14,3 g/dl. Menurut Mitruka and Rawnsly (1981), hasil tersebut masih berada dalam kisaran normal. Pemberian NaNO₂ pada tikus putih uji dengan dosis 11,25 mg/kgBB maupun dosis 22,50 mg/kgBB tidak mengakibatkan perubahan kadar hemoglobin yang ekstrim.

Pada perlakuan dosis 11,25 mg/kgBB saat kondisi akut dan subkronis, kadar hemoglobin menurun jika dibandingkan dengan *base-line*. Sedangkan, pada kelompok perlakuan dosis 22,50 mg/kgBB, kadar hemoglobin mengalami peningkatan pada kondisi akut maupun subkronis jika dibandingkan dengan *base-line* (Tabel 3).

Peningkatan kadar hemoglobin pada kelompok perlakuan 22,50 mg/kgBB NaNO₂ dapat disebabkan adanya peningkatan kebutuhan O₂ untuk metabolisme tubuh. Tingginya dosis NaNO₂ yang digunakan mengakibatkan semakin tingginya kompetisi O₂ dan NO untuk berikatan dengan hemoglobin serta pembentukan methemoglobin juga meningkat.

Kebutuhan O₂ meningkat karena O₂ yang dapat berikatan dengan hemoglobin berkurang. Kebutuhan O₂ tersebut direspon dengan meningkatnya kadar hemoglobin pada kondisi subkronis pemberian NaNO₂ dengan dosis 22,50 mg/kgBB.

Kenaikan maupun penurunan kadar hemoglobin pada kondisi akut maupun subkronis tidak berbeda nyata antar perlakuan. Keadaan tersebut menunjukkan pemberian NaNO₂ pada dosis 11,25 mg/kgBB maupun 22,50 mg/kgBB tidak berpengaruh secara nyata terhadap kadar hemoglobin tikus putih uji pada kondisi sub kronis.

Tabel 3. Kenaikan dan penurunan kadar hemoglobin pada kondisi akut dan sub kronis dibandingkan dengan *base line*

Perlakuan	H-0	H-14	H-90
Kontrol	100%	0,79%	3,14%
P1	100%	- 0,39%	-0,63%
P2	100%	11,2%	-10,61%

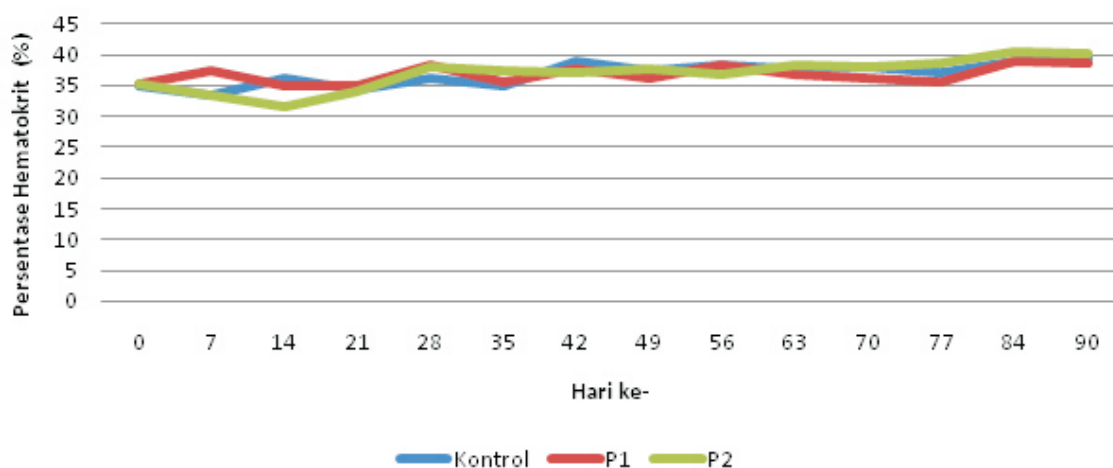
Keterangan: H-0= *base-line* (dianggap 100% kadar hemoglobin normal); H-14= akut; H-90= sub kronis; tanda “-“= menunjukkan penurunan kadar hemoglobin

Persentase hematokrit

Persentase hematokrit adalah perbandingan eritrosit terhadap volume darah total. Menurut Smith dan Mangkoewidjojo (1988), persentase hematokrit tikus putih antara 45-47 %. Kisaran persentase hematokrit hasil penelitian adalah 35-41 %. Hasil tersebut berada di bawah persentase hematokrit normal. Hasil pengukuran persentase hematokrit penelitian (Gambar 4) sebanding dengan jumlah eritrosit total yang terukur yang juga berada di bawah kisaran jumlah eritrosit normal (Gambar 2). Persentase hematokrit pada hari ke-0 sampai hari ke-14 tidak stabil dan masih menunjukkan adanya

penurunan. Hal tersebut disebabkan oleh produksi eritrosit yang belum konstan. Namun, setelah hari ke-21, persentase hematokrit sudah mulai stabil, meskipun kisarannya berada dibawah kisaran persentase hematokrit normal.

Persentase hematokrit kelompok kontrol meningkat pada kondisi akut dan subkronis. Namun, persentase hematokrit pada kelompok perlakuan dosis NaNO₂ 11,25 menurun pada kondisi akut dan meningkat pada kondisi sub kronis. Begitu pula dengan kelompok perlakuan dosis 22,50 mg/kgBB, pada kondisi akut, persentase hematokrit menurun dan meningkat pada kondisi sub kronis (Tabel 4).



Gambar 4. Persentase hematokrit tikus putih betina Wistar selama 90 hari dengan perlakuan NaNO₂. Keterangan: P1= perlakuan dosis NaNO₂ 11,25 mg/kgBB; P2= perlakuan dosis NaNO₂ 22,50 mg/kgBB

Tabel 4. Kenaikan dan penurunan persentase hematokrit pada kondisi akut dan sub kronis dibandingkan dengan *base-line*

Perlakuan	H-0	H-14	H-90
Kontrol	100%	3,34%	13,14%
P1	100%	- 0,51%	9,82%
P2	100%	-10,49%	12,11%

Keterangan: H-0= *base-line* (dianggap 100% persentase hematokrit normal); H-14= akut; H-90= sub kronis; tanda “-“= menunjukkan penurunan persentase hematokrit

Penurunan persentase hematokrit tersebut dapat disebabkan adanya proses destruksi eritrosit yang sudah tua. Eritrosit bertahan dalam sirkulasi selama ± 120 hari. Eritrosit yang sudah tua akan dikeluarkan dari sirkulasi terutama oleh makrofag limpa dan sumsum tulang. Sedangkan, kenaikan persentase hematokrit pada kondisi sub kronis dapat disebabkan oleh adanya respon eritropoiesis akibat berkurangnya O_2 yang dapat diikat oleh darah (Junqueira and Carneiro, 2004).

Besarnya persentase hematokrit tergantung pada jumlah eritrosit total dan jumlah kebutuhan oksigen bagi metabolisme tubuh. Persentase hematokrit yang rendah juga dapat disebabkan oleh darah yang terlalu encer karena jumlah eritrositnya rendah (Dharma dkk., 2010). Penurunan persentase hematokrit pada kondisi akut tidak berbeda nyata dengan *base-line*. Begitu juga dengan peningkatannya pada kondisi subkronis kelompok perlakuan dosis 11,25 dan 22,50 mg/kgBB. Tidak adanya beda nyata tersebut menunjukkan, bahwa $NaNO_2$ yang diberikan pada dosis 11,25 mg/kgBB maupun dosis 22,50 mg/kgBB tidak berpengaruh secara nyata pada persentase hematokrit pada kondisi subkronis. Hasil ini sesuai juga dengan pengaruh $NaNO_2$ pada jumlah eritrosit total yang juga tidak berbeda nyata.

Persentase limfosit

Limfosit merupakan jenis leukosit agranulosit yang memiliki berbagai peran fungsional berhubungan dengan reaksi imun terhadap serangan mikroorganisme, makromolekul asing, maupun sel-sel kanker (Junqueira dan Carneiro, 2004). Persentase limfosit di bawah kisaran normal dapat

disebabkan oleh banyaknya limfosit yang sudah berada di jaringan. Menurut Martini and Welch (2001), persentase limfosit dapat meningkat akibat leukimia limfatik, infeksi mononukleus, maupun infeksi virus. Sedangkan persentasenya dapat menurun karena radiasi.

Gambar 5 menunjukkan persentase limfosit pada kontrol meningkat pada hari ke-7, tetapi mengalami penurunan pada kondisi akut. Sedangkan, pada perlakuan dosis 11,25 mg/kgBB persentase limfosit menurun pada hari ke-7 kemudian meningkat di kondisi akut. Penurunan persentase limfosit tersebut disebabkan oleh banyaknya limfosit yang telah terdistribusi ke jaringan. Pada perlakuan dosis 22,50 mg/kgBB, persentase limfosit justru menurun sampai pada hari ke-14.

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 respon untuk destruksi sel-sel yang mengalami kerusakan atau apoptosis. Menurut Kane *et al.* (2012), persentase limfosit juga dapat dipengaruhi oleh jenis kelamin tikus yang diujikan sehingga parameter yang terukur dapat bervariasi antara jantan dan betina. Peningkatan maupun penurunan persentase limfosit tidak menunjukkan adanya beda nyata saat kondisi akut maupun pada kondisi subkronis di masing-masing perlakuan. Peningkatan maupun penurunan persentase limfosit yang terjadi tidak berpengaruh nyata pada tikus putih uji pada dosis $NaNO_2$ 11,25 mg/kgBB maupun pada dosis 22,50 mg/kgBB dalam kondisi subkronis (Tabel 5). Pada kondisi subkronis,

terjadi penurunan persentase limfosit pada semua kelompok perlakuan jika dibandingkan dengan *base-line*.

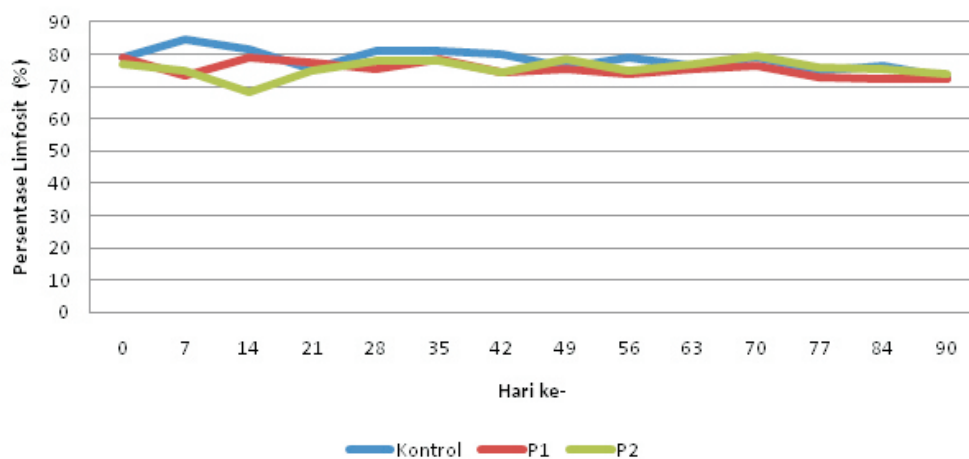
Persentase neutrofil

Neutrofil merupakan jenis leukosit yang dapat bersifat fagositik terhadap mikroorganisme yang masuk ke dalam tubuh, berumur pendek dengan waktu paruh antara 6-7 jam dalam darah, dan memiliki jangka hidup selama 1-4 hari dalam jaringan ikat. Neutrofil aktif dalam fagositosis terhadap bakteri dan partikel kecil lain (Junquiera and Carneiro, 2004).

Hasil penelitian ini menunjukkan persentase neutrofil terukur pada kontrol, perlakuan NaNO₂ 11,25 mg/kgBB, maupun 22,50 mg/kgBB sangat

fluktuatif dari awal hingga akhir penelitian (Gambar 6). Namun, secara keseluruhan persentase neutrofil pada kontrol lebih rendah daripada perlakuan 11,25 mg/kgBB maupun 22,50 mg/kgBB NaNO₂. Fluktuasi persentase neutrofil sangat terlihat pada kondisi akut (hari ke-14).

Secara keseluruhan, persentase neutrofil yang terukur antara 21-27 %. Persentase neutrofil normal pada tikus putih adalah 7-25 %, tergantung pada ada/tidaknya partikel asing yang masuk ke dalam tubuh dan perlu/tidaknya untuk difagositosis (Farris and Griffith, 1971). Peningkatan dan penurunan persentase neutrofil dapat disebabkan oleh waktu edar neutrofil dalam sirkulasi darah yang pendek.

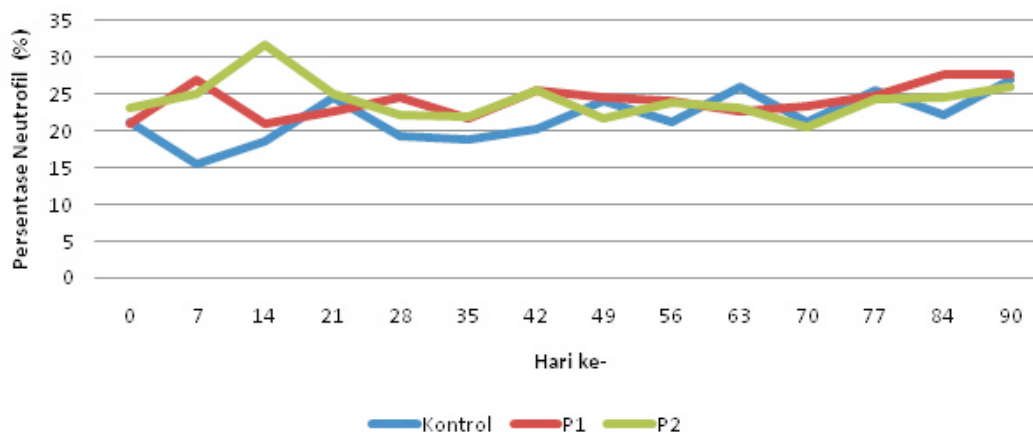


Gambar 5. Persentase limfosit tikus putih betina Wistar selama 90 hari dengan perlakuan NaNO₂. Keterangan: P1= perlakuan dosis NaNO₂ 11,25 mg/kgBB; P2= perlakuan dosis NaNO₂ 22,50 mg/kgBB

Tabel 5. Kenaikan dan penurunan persentase limfosit pada kondisi akut dan sub kronis dibandingkan dengan *base-line*

Perlakuan	H-0	H-14	H-90
Kontrol	100%	3,39%	-7,31%
P1	100%	-0,08%	-8,40%
P2	100%	-11,43%	-3,99%

Keterangan: H-0= *base-line* (dianggap 100% kondisi normal persentase limfosit); H-14= akut; H-90= sub kronis; tanda “-“= menunjukkan penurunan persentase limfosit



Gambar 6. Persentase neutrofil tikus putih betina Wistar selama 90 hari dengan perlakuan NaNO₂. Keterangan: P1= perlakuan dosis NaNO₂ 11,25 mg/kgBB; P2= perlakuan dosis NaNO₂ 22,50 mg/kgBB

Peningkatan persentase neutrofil pada kondisi akut perlakuan dosis NaNO₂ 11,25 dan 22,50 mg/kgBB dapat disebabkan adanya respon terjadinya kerusakan organ di tempat akumulasi NaNO₂. Sedangkan, penurunan neutrofil yang terjadi pada penelitian dimungkinkan karena waktu edar neutrofil dalam sirkulasi darah yang hanya 6-7 jam, sehingga memungkinkan persentasenya menurun dalam sirkulasi darah akibat terdistribusi ke jaringan. Secara keseluruhan terjadi peningkatan persentase neutrofil pada semua kelompok perlakuan jika dibandingkan dengan *base-line*, kecuali pada kelompok kontrol di kondisi akut (Tabel 6). Penurunan tersebut sebesar 12,61%.

Peningkatan maupun penurunan persentase neutrofil yang terjadi tidak berbeda secara nyata pada masing-masing perlakuan saat kondisi akut maupun pada kondisi sub kronis. Pemberian NaNO₂ dengan dosis 11,25 mg/kgBB maupun dosis 22,50 mg/kgBB tidak berpengaruh secara nyata pada persentase neutrofil tikus uji pada kondisi akut maupun sub kronis. Hasil penelitian secara umum setelah dilakukan uji statistik dengan ANOVA dan SPSS 16 *for Windows* menunjukkan, bahwa pemberian NaNO₂ pada kondisi akut maupun sub kronis tidak berpengaruh secara nyata pada profil darah tikus putih uji, baik jumlah leukosit total, jumlah eritrosit total, kadar hemoglobin, persentase

Tabel 6. Kenaikan dan penurunan persentase neutrofil pada kondisi akut dan sub kronis dibandingkan dengan *base-line*

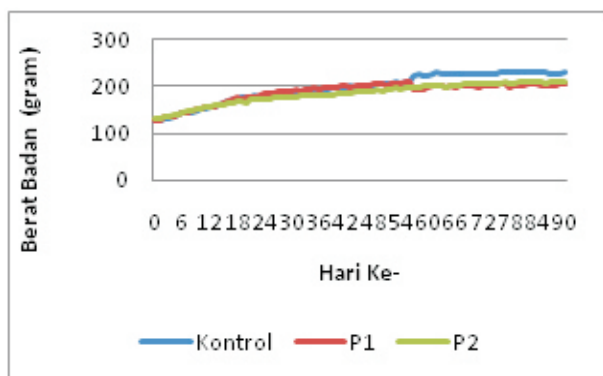
Perlakuan	H-0	H-14	H-90
Kontrol	100%	-12,61%	27,21%
P1	100%	0,29%	31,60%
P2	100%	38,21%	13,33%

Keterangan: H-0= *base-line* (dianggap 100% kondisi persentase neutrofil normal); H-14= akut; H-90 = sub kronis; tanda “-“ = menunjukkan penurunan persentase neutrofil.

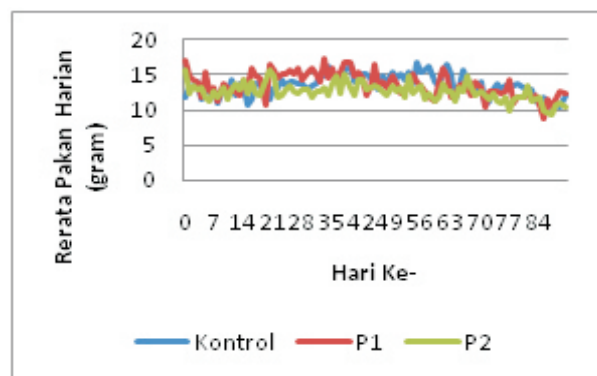
hematokrit, persentase limfosit, maupun persentase neutrofil. Pengaruh yang nyata hanya terjadi pada penurunan jumlah leukosit total di kondisi sub kronis kelompok perlakuan dosis NaNO_2 22,50 mg/kgBB.

Parameter yang juga diukur untuk mendukung hasil pengukuran profil darah adalah berupa berat

badan (Gambar 7a) dan rata-rata konsumsi pakan harian (Gambar 7b) tikus putih uji. Kedua parameter pendukung tersebut digunakan untuk mendukung kemungkinan adanya pengaruh perlakuan NaNO_2 terhadap kondisi harian tikus putih uji.



(a)



(b)

Gambar 7. (a) Rata-rata berat badan (gram) dan (b) Rata-rata konsumsi pakan harian (gram) tikus putih betina Wistar kelompok Kontrol, P1, dan P2 pada hari ke-0 sampai hari ke-90. Keterangan: P1= perlakuan dosis NaNO_2 11,25 mg/kgBB; P2= perlakuan dosis NaNO_2 22,50 mg/kgBB

Berat badan yang terukur selama 90 hari perlakuan dengan pemberian NaNO_2 menunjukkan peningkatan dari hari ke hari. Peningkatan berat badan tersebut berkaitan dengan pertumbuhan dan perkembangan yang terjadi pada tikus putih uji. Tikus putih uji yang digunakan sedang dalam masa pertumbuhan sehingga berat badannya semakin meningkat sejalan dengan penambahan umurnya.

Pada hasil pengukuran diketahui, bahwa berat badan pada tikus putih uji kelompok perlakuan dosis 22,50 mg/kgBB paling rendah daripada kelompok kontrol maupun perlakuan 11,25 mg/kgBB. Pemberian dosis NaNO_2 yang lebih tinggi tersebut diindikasikan sebagai penyebab terhambatnya penyerapan sari makanan oleh tubuh karena adanya gangguan metabolisme tubuh. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai gangguan

metabolisme yang mungkin terjadi.

Rata-rata konsumsi pakan harian tikus putih uji menunjukkan hasil pengukuran yang sangat fluktuatif dari hari ke hari berkisar antara 9-17 gram setiap harinya. Konsumsi rata-rata pakan harian tersebut dapat berpengaruh terhadap berat badan harian yang terukur. Namun, secara keseluruhan meskipun konsumsi rata-rata pakan harian cenderung fluktuatif, berat badan harian yang terukur relatif meningkat dari hari ke hari sesuai dengan pertumbuhan tikus putih uji. Dari penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan, bahwa perlakuan NaNO_2 pada kondisi sub kronis selama 90 hari pada konsentrasi 11,25 mg/kgBB maupun 22,50 mg/kgBB tidak berpengaruh secara nyata pada profil darah tikus putih betina Wistar.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada teknisi LPPT Unit Praktek Universitas Gadjah Mada untuk bantuannya mengurus tikus yang digunakan sebagai hewan uji. Serta pihak-pihak terkait yang tidak dapat disebutkan satu per satu atas bantuannya demi kelancaran penelitian yang dilakukan, termasuk laboran Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada.

Daftar Pustaka

- Bara, V., Camelia, B. and Bara, L. (2011) *Nitrosamines occurrence in some food products*. University of Oradea. Romania.
- Cahyadi, W. (2006). *Analisis dan Aspek Kesehatan: Bahan Tambahan Pangan*. PT Bumi Aksara. Jakarta: 4-16.
- Campbell, N. A., Reece, J. B. and Mitchell, L. G. (2004). *Biologi* Jilid III Edisi Kelima. Penerbit Erlangga. Jakarta: 53 – 56.
- Dharma, R., Immanuel, S. dan Wirawan, R. (2010) *Penilaian Hasil Pemeriksaan Hematologi Rutin*. <http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/10PenilaianHasilPemeriksaan.pdf>. Diakses Pada 24 Mei 2011 Pukul 13.45 WIB.
- Farris, E. J. and Griffith, J. Q. (1971) *The Rat in Laboratory Investigation*. Hafner Publishing Company. New York: 408-411.
- Fox, J. G., Cohen, B. J. and Loew, F. M. (1984) *Laboratory Animal Medicine*. Academic Press, Inc. Florida, USA: 95.
- Ganong, W. F. (1992) *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran (Review of Medical Physiology)*. Penerbit EGC. Jakarta: 486-510.
- Husni, E., Samah, A. dan Ariati, R. (2007). *Analisa Zat Pengawet dan Protein dalam Makanan Siap Saji Sosis*. *J. Sains Tekno.i Farm*. 12: 108 – 111.
- Junqueira, L. C. and Carneiro, J. (2004) *Histologi Dasar: Teks dan Atlas* Edisi Kesepuluh. EGC Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta: 220 – 233.
- Kane, J. D., Steinbach, T. J., Sturdivant, R. X. and Burks, R. E. (2012) Sex-associated effects on hematologic and serum chemistry analytes in sand rats (*Psammomys obesus*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 51: 769-774.
- Kataranovski, M. V., Radovic, D.L., Zolotarevski, L.D., Popov, A.D. and Kataranovski, D.S. (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: 213-223, 2009.
- Kumar, A., Sriwastwa, V. M. S. and Lata, S. (2011) Impact of Black T Supra on haematology of Albino rats. *Indian J. Sci. Res.* 2: 21-27.
- Martini, E. H. and Weltch, K. (2001) *Fundamentals of Anatomy and Physiology* 5th ed. Prentice Hall. New Jersey: 110-112.
- Mitruka, B. M. and Rawnsly, H. M. (1981) *Clinical, Biochemical, and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals and Normal Humans* 2nd ed. Year Book Medical Publishers, Inc. Chicago, USA: 3.
- Preet, S. and Prakash, S. (2011) Haematological profile in *Rattus norvegicus* during experimental cysticercosis. *J. Par. Dis.* 35: 144-147.
- Sindelar, J. J. and Milkowski, A. L. (2011) Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: A review of curing and examining the risk/benefit of its use. *American Meat Science Association White Paper Series*: 3.
- Smith, J. B. dan Mangkoewidjojo, S. (1988) *Pemeliharaan, Pembiakan, dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Penerbit UI. Jakarta: 34-40.

- Stanojevic, D., Comic, L., Stefanovic, O. and Solujic-Sukdolak, S. I. (2009) Antimicrobial effects of sodium benzoate, sodium nitrite and potassium sorbate and their synergistic action in vitro. *Bulgarian J. Agricul. Scie.* 15: 307-311.
- Yakubu, M. T. and Afolayan, A. J. (2009) Effect of aqueous extract of *Bulbine natalensis* Baker stem on haematological and serum lipid profile of male Wistar rats. *Indian J. Exp. Biol.* 47: 283-288.
- Yuningsih. (2007) *Keracunan Nitrat-nitrit pada Hewan Ternak Ruminansia dan Upaya Pencegahannya. J. Litbang Pertanian* 26 (4) Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor, Bogor.