

**STUDI PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL
KULIT BUAH MANGGIS (*Garcinia mangostana L*)
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA
DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI
BRONKUS PADA TIKUS (*Rattus
norvegicus*) YANG TERPAPAR
ASAP ROKOK**

SKRIPSI

Oleh :
BERLYA PUTRI DWI FIDYA ALVI
105130101111033



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2014

**STUDI PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL
KULIT BUAH MANGGIS (*Garcinia mangostana L*)
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA
DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI
BRONKUS PADA TIKUS (*Rattus
norvegicus*) YANG TERPAPAR
ASAP ROKOK**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :
BERLYA PUTRI DWI FIDYA ALVI
105130101111033



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2014

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**STUDI PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL KULIT BUAH MANGGIS
(*Garcinia mangostana L*) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA DAN
GAMBARAN HISTOPATOLOGI BRONKUS PADA TIKUS
(*Rattus norvegicus*) YANG TERPAPAR ASAP ROKOK**

Oleh:
BERLYA PUTRI DWI FIDYA ALVI
105130101111033

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 21 Februari 2014
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am., drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc
NIP. 19820914 200912 2 004

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan
Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am., drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : BERLYA PUTRI DWI FIDYA ALVI

NIM : 105130101111033

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

STUDI PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL KULIT BUAH MANGGIS (*Garcinia mangostana* L) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI BRONKUS PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG TERPAPAR ASAP ROKOK

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 21 Februari 2014

Yang menyatakan,

(BERLYA PUTRI DWI FIDYA ALVI)

NIM.105130101111033

**STUDI PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL KULIT BUAH MANGGIS
(*Garcinia mangostana L*) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA
DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI BRONKUS PADA TIKUS
(*Rattus norvegicus*) YANG TERPAPAR ASAP ROKOK**

ABSTRAK

Bronkitis merupakan peradangan yang terjadi pada bronkus. Kandungan asap rokok yang tergolong dalam *Radical Oxygen Species* (ROS) dapat menjadi penyebab dari bronkitis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) terhadap kadar malondialdehida (MDA) serta histopatologi bronkus. Tikus yang dipakai dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 3 bulan yang dibagi dalam 5 kelompok. Kelompok 1 adalah tikus sehat (kontrol negatif), kelompok 2 adalah kelompok kontrol positif yang diberikan paparan asap rokok, kelompok 3, 4 dan 5 adalah kelompok tikus yang dipapar asap rokok dan mendapat terapi ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) 200mg/Kg BB, 400mg/Kg BB, dan 600mg/Kg BB. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) berpengaruh signifikan terhadap kadar MDA ($p < 0,05$) dimana menyebabkan penurunan terhadap kadar MDA. Perbaikan silia dan penurunan ukuran otot polos ditunjukkan melalui pemberian ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) dapat menurunkan kadar MDA dan memperbaiki kerusakan jaringan bronkus.

Kata kunci : Bronkitis, Ekstrak etanol kulit buah manggis, Malondialdehida (MDA), dan Histopatologi bronkus.

**THE STUDY OF ETHANOL EXTRACT OF MANGOSTEEN PEEL
(*Garcinia mangostana L*) AGAINST MALONDIALDEHIDA LEVELS AND
BRONCHIAL HISTOPATHOLOGIC PICTURES IN RATS
(*Rattus norvegicus*) EXPOSED TO
CIGARETTE SMOKE**

ABSTRACT

Bronchitis is an inflammation that occurs in bronchi. The content of cigarette smoke which is classified to the *Radical Oxygen Species* (ROS) causes bronchitis. This research aims to determine the impact of giving ethanol extract of mangosteen peel (*Garcinia mangostana L*) therapy against the levels of malondialdehyde (MDA) and bronchial histopathologic pictures. The rats (*Rattus norvegicus*) which were used in this research were 3-year-old male rats divide into 5 groups. Group 1 was the healthy rats (negative control), group 2 was the positive control group which was exposed to cigarette smoke, group 3, group 4, and group 5 were exposed to cigarette smoke and got 200mg/Kg BW, 400mg/Kg BW, and 600mg/Kg BW of therapy. The results show that the ethanol extract of mangosteen peel (*Garcinia mangostana L*) significantly influence the levels of MDA ($p < 0.05$) which led to a decrease in the levels of MDA. Repaired cilia and decreased size smooth muscle are shown by the ethanol extract of mangosteen peel (*Garcinia mangostana L*). In conclusion that the ethanol extract of mangosteen peel (*Garcinia mangostana L*) can decrease the levels of MDA and repair damaged bronchial tissue.

Keywords: Bronchitis, Ethanol extract of mangosteen peel, Malondialdehyde (MDA), and Bronchial histopathology.

KATA PENGANTAR

Puji Syukur atas kehadiran Allah SWT yang melimpahkan segala rahmat dan pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“Studi Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L*) terhadap Kadar Malondialdehida dan Gambaran Histopatologi Bronkus pada Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Terpapar Asap Rokok”**. Penelitian ini merupakan payung penelitian dosen yang diketuai oleh Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES serta menjadi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Program Kedokteran Hewan, Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Universitas Brawijaya.

Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terimakasih kepada segenap pihak secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih terutama kepada :

1. Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES selaku pembimbing I atas segala bantuan, bimbingan, kesabaran, nasihat, waktu, dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
2. Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc sebagai pembimbing II atas segala bimbingan dan arahan yang telah diberikan kepada penulis.
3. drh. Handayu Untari dan drh. Tiara Widyaputri selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu serta memberikan masukan dan saran.
4. Dr. Agung Pramana Warih Mahendra, M.Si selaku Ketua Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
5. Keluarga besar terutama Ibu, Bapak serta Kakak tercinta yang begitu ikhlas menyayangi, memberikan semangat, doa, dan dukungan yang tak terhingga kepada penulis selama belajar di Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang. Terimakasih untuk Bapak yang selalu berusaha memberikan fasilitas yang terbaik, terimakasih yang tak terhingga untuk Ibu tercinta atas segala pengorbanan dan selalu menjadi

Ibu yang terbaik untuk anak-anaknya. Vivi akan selalu mencoba untuk memberikan yang terbaik dan menjadi kebanggaan untuk keluarga.

6. Seluruh staf serta asisten Laboratorium Biokimia dan Biologi Seluler Fakultas MIPA Universitas Brawijaya khususnya Vivi Shofia selaku asisten pendamping, Pak Har yang telah membantu dalam merawat hewan coba.
7. Tim Penelitian khususnya Pak Nabel, Rinta Nur A, Friski Rosandi A, Fitria Ramdhani P, Wisdiani P.P, Yusrina S yang saling membantu satu sama lain.
8. Teman dan sahabat-sahabatku Putri Panggalih, Ameydia Sari, Fitri Erba, Vianty, Devi A, Devi C, Rachmad, Dita, Devi Ika, Arinda, Maya, Rossa, Hariyadi, dan Bustan terima kasih untuk bantuan, semangat dan doanya.
9. Seluruh sahabat PKH angkatan 2010, serta sahabat lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala perhatian, dorongan, dukungan dan doa yang telah diberikan.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan serta ketulusan yang telah diberikan. Semoga Tugas Akhir ini dapat memberikan manfaat dan menambah ilmu pengetahuan bukan hanya untuk penulis namun untuk pembaca yang lain.

Malang, 17 Februari 2014

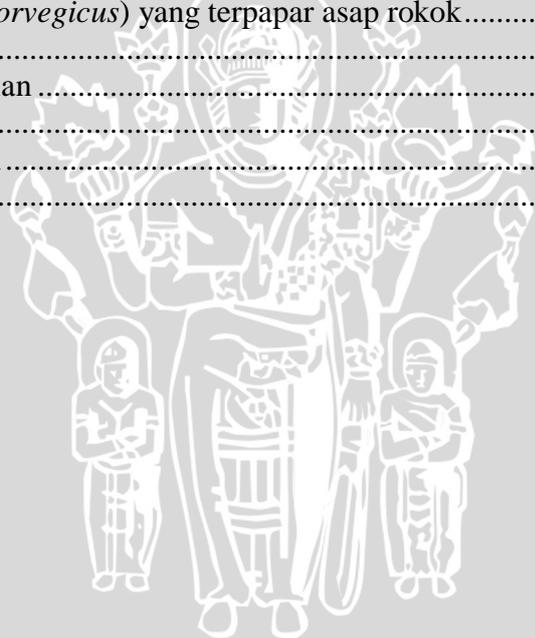
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Paparan Asap Rokok	6
2.2 Histologi Bronkus	7
2.3 Patomekanisme Bronkitis	9
2.4 Manggis (<i>Garcinia mangostana L</i>)	10
2.5 Radikal Bebas dan Antioksidan	13
2.5.1 Radikal Bebas	13
2.5.2 Antioksidan	14
2.6 Malondialdehida (MDA)	15
2.7 Hewan Coba Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	17
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	20
3.1 Kerangka Konseptual	20
3.2 Hipotesis Penelitian	23
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	24
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	24
4.2 Sampel Penelitian	24
4.3 Rancangan Penelitian	25
4.4 Variabel Penelitian	25
4.5 Alat dan Bahan	25
4.6 Tahapan Penelitian	26
4.7 Cara Kerja Penelitian	27
4.7.1 Persiapan hewan coba tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	27
4.7.2 Penentuan dosis ekstrak etanol kulit bauh manggis (<i>Garcinia mangostana L</i>)	28
4.7.3 Pembuatan ekstrak etanol kulit bauh manggis	28
4.7.4 Uji fitokimia ekstrak etanol kulit buah manggis	28



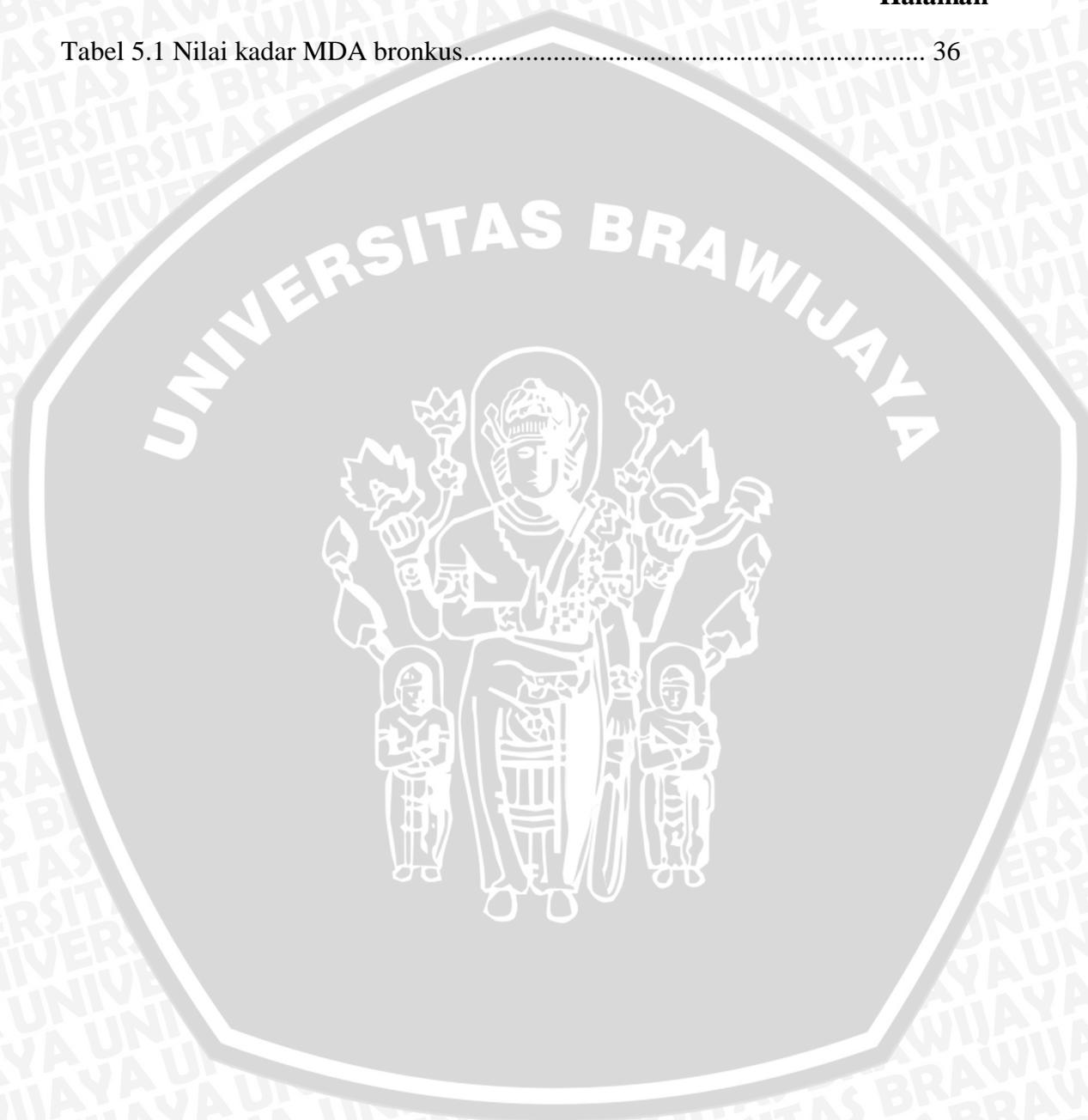
4.7.5	Analisis KLT (Kromatografi Lapis Tipis)	29
4.7.6	Paparan asap rokok pada hewan coba.....	30
4.7.7	Terapi dengan ekstrak etanol kulit buah manggis	31
4.7.8	Pengambilan organ bronkus	31
4.7.9	Pengukuran kadar MDA	31
	4.7.9.1 Pembuatan Kurva Standart MDA	31
	4.7.9.2 Pengukuran Kadar MDA Menggunakan Uji <i>Thiobarbituric Acid (TBA)</i>	32
4.7.10	Pewarnaan preparat dengan metode HE	33
4.7.11	Analisis data.....	35
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN		36
5.1	Pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit buah manggis (<i>Garcinia mangostana L</i>) terhadap kadar MDA bronkus tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) yang terpapar asap rokok	36
5.2	Pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit buah manggis (<i>Garcinia mangostana L</i>) terhadap gambaran histopatologi bronkus tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) yang terpapar asap rokok.....	40
BAB 6 PENUTUP		47
6.1	Kesimpulan	47
6.2	Saran	47
DAFTAR PUSTAKA		48
LAMPIRAN		54



DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 5.1 Nilai kadar MDA bronkus..... 36



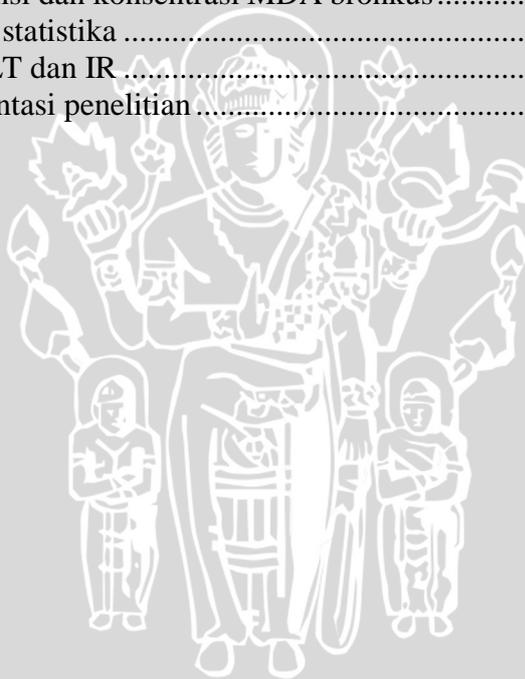
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Skema kandungan dalam rokok	7
Gambar 2.2 Histologi bronkus normal	8
Gambar 2.3 Kondisi bronkitis	9
Gambar 2.4 Buah dan kulit manggis	12
Gambar 2.5 Struktur senyawa <i>xanthone</i>	13
Gambar 2.6 Mekanisme pembentukan MDA	17
Gambar 2.7 <i>Rattus norvegicus</i>	18
Gambar 3.1 Kerangka konseptual	22
Gambar 5.1 Histopatologi jaringan bronkus tikus	41



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Keterangan kelaikan etik	54
Lampiran 2. Skema kerja penelitian.....	55
Lampiran 3. Pembuatan ekstrak kulit buah manggis	56
Lampiran 4. Uji Fitokimia ekstrak etanol kulit buah manggis.....	57
Lampiran 5. Diagram kerja penelitian	59
Lampiran 6. Perhitungan pembuatan larutan	63
Lampiran 7. Perhitungan dosis.....	65
Lampiran 8. Penentuan panjang gelombang maksimum MDA.....	67
Lampiran 9. Pembuatan kurva baku MDA	68
Lampiran 10. Absorbansi dan konsentrasi MDA bronkus	69
Lampiran 11. Hasil uji statistika	70
Lampiran 12. Hasil KLT dan IR	72
Lampiran 13. Dokumentasi penelitian	76



DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
PPOK	Penyakit Paru Obstruksi Kronik
ANOVA	<i>Analisis of Variant</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
MDA	Malondialdehida
TBA	<i>Thiobarbituric Acid</i>
HE	Hematoksinilin-Eosin
UV	Ultraviolet
PUFA	<i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substance</i>
SOD	<i>Superoksida Dismutase</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
TCA	<i>Tri Chloro Acetic</i>
PFA	Paraformaldehida
PBS	Phosphate Buffer Saline
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
NaCl	Natrium Klorida
KCl	Kalium Klorida
KHPO ₄	Potassium Hidrogen Sulfat
Na ₂ HPO ₄ (H ₂ O)	Natrium hidrogenfosfat
NaOH	Natrium Hidroksida
HCl	Asam Klorida
CHCl ₄	Triklorometana (Kloroform)
H ₂ SO ₄	Asam Sulfat
NH ₃	Amonia
IR	Inframerah
Kg	Kilogram
BB	Berat badan
Hb	Hemoglobin
COHb	<i>Carboxy Hemoglobin</i>
Perikarp	Kulit buah
C ₁₃ H ₈ O ₂	<i>Xanthone</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
CEMP	<i>Crude Extract from Mangostine Peel</i>
APCs	<i>Antigen Presenting Cells</i>
IL	<i>Interleukin</i>
Th	Sel T helper
IgE	Imunoglobulin E

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rokok merupakan salah satu penyebab kematian terbesar di dunia. Saat ini Indonesia termasuk salah satu negara berkembang yang sebagian besar masyarakatnya mengkonsumsi rokok. Konsumsi rokok di Indonesia sekitar 6,6 persen dari seluruh konsumsi di dunia (Pusat Promkes Depkes RI, 2004). Menurut WHO (2007), sebanyak 210 juta manusia mengalami Penyakit Paru Obstruksi Kronik (PPOK) dan 3 juta diantaranya meninggal akibat PPOK pada tahun 2005. Diperkirakan pada tahun 2030, PPOK menjadi penyebab ke-3 kematian di seluruh Dunia (WHO, 2008). Kematian pada PPOK mencapai 80-90%, hal tersebut berhubungan dengan rokok. WHO juga menyatakan hampir 75% kasus bronkitis kronis dan emfisema diakibatkan oleh rokok (Mackay and Eriksen, 2002).

Asap rokok mengandung sekitar 4000 senyawa, antara lain nikotin, tar dan 3,4-benzopiren, karbon monoksida, karbon dioksida, nitrogen oksida, amonia, dan sulfur. Nikotin ialah alkaloid dalam asap rokok yang lama kelamaan akan terakumulasi pada dinding pembuluh darah perokok dan menyempitkan pembuluh darah. Efisiensi absorpsi nikotin dari paru-paru ke dalam darah hampir sama dengan nikotin yang diberikan secara intravena pada suatu individu (Fidrianny, 2004). Paparan asap rokok secara terus menerus menyebabkan bronkitis. Absorpsi asap rokok dalam tubuh akan berinteraksi dengan sel dan zat-zat aktif dalam rokok dapat menyebabkan

terbentuknya radikal bebas yaitu *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Nitric Oxide* (NO).

Masuknya radikal bebas dalam tubuh disebabkan adanya hasil samping dari proses oksidasi saat terpapar asap rokok. Radikal bebas yang terbentuk akan menyebabkan peroksidasi lipid membran sel sehingga akan merusak organisasi membran sel. Menurut Winarsi (2007), peroksidasi lipid membran dapat ditentukan secara tidak langsung dengan mengukur kadar malondialdehida (MDA) yaitu produk akhir peroksidasi lipid berupa senyawa dialdehida yang dapat diukur dengan tes standar *Thiobarbituric Acid* (TBA).

Bronkus mempunyai peranan penting dalam jalur pernafasan karena bronkus berfungsi sebagai jalan udara pada sistem pernafasan yang membawa udara ke paru-paru. Kerusakan yang terjadi pada bronkus akibat akumulasi radikal bebas dapat menimbulkan peradangan.

Menurut Kumulaningsih (2006), antioksidan merupakan suatu senyawa yang mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas. Antioksidan banyak dijumpai dalam buah-buahan salah satunya adalah buah manggis. Menurut Mardiana (2012), golongan *xanthon* merupakan salah satu antioksidan dalam kandungan kulit buah manggis. *Alfa-mangostin* dan *gamma-mangostin* merupakan kandungan yang paling banyak dalam senyawa *xanthone*. Menurut Noverina (2011), *xanthone* dalam kulit manggis berjumlah sekitar 17.000–20.000 *Oxygen Radical Absorbance*

Capacity (ORAC). Nilai ORAC manggis yang tinggi menggambarkan kemampuan *xanthone* dalam menyerap radikal bebas secara cepat.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) terhadap kadar MDA serta gambaran histopatologi bronkus tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah dipapar asap rokok.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut :

1. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) terhadap kadar malondialdehida (MDA) pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) yang telah dipapar asap rokok?
2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) terhadap perubahan gambaran histopatologi bronkus tikus (*Rattus norvegicus*) yang telah dipapar asap rokok?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disebutkan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapatkan sertifikat laik etik oleh Komisi Etik Penelitian Universitas

Brawijaya No: 183-KEP-UB (Lampiran 1). Hewan coba yang digunakan berumur 3 bulan dengan berat badan rata-rata 150-200 gram.

2. Paparan asap rokok diberikan kepada setiap kelompok tikus menggunakan 2 batang rokok setiap hari selama 1 bulan (Mansour, 2013).

3. Pemberian ekstrak kulit buah manggis dilakukan secara per oral (sonde). Perlakuan yang diberikan dibedakan berdasarkan dosis pemberian yaitu 200 mg/kg BB, 400 mg/Kg BB, dan 600 mg/Kg BB. Pemberian ekstrak ini dilakukan selama 3 minggu, dalam sehari diberikan 1ml pada setiap ekor hewan coba.

4. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah kadar malondialdehid (MDA) dan gambaran histopatologi organ bronkus dengan pewarnaan *Hematoksin Eosin* (HE).

1.4 Tujuan Penelitian

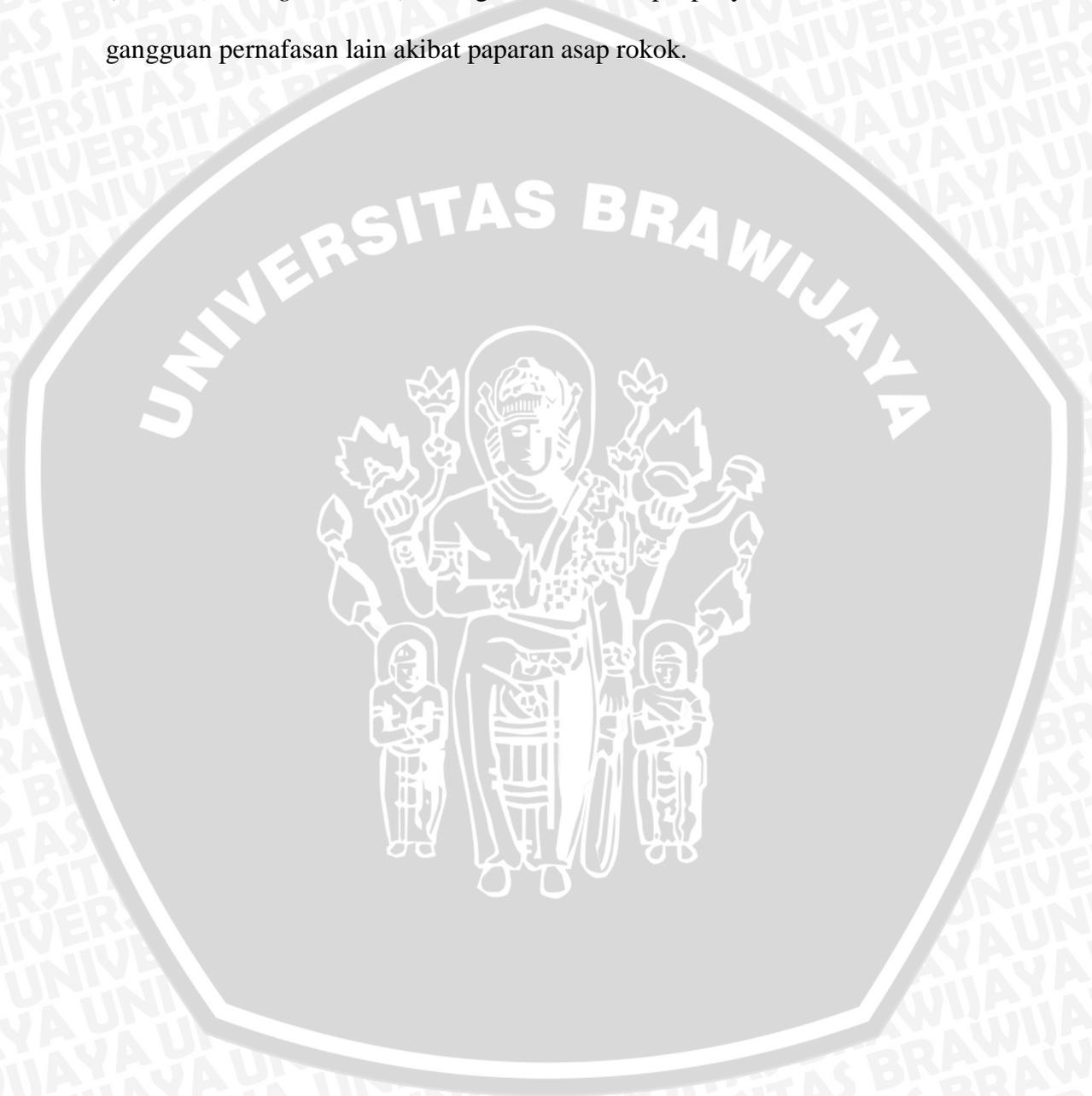
Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) terhadap kadar malondialdehid (MDA) pada hewan tikus (*Rattus norvegicus*) yang telah terpapar asap rokok.

2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) terhadap perubahan gambaran histopatologi bronkus tikus (*Rattus norvegicus*) yang telah dipapar asap rokok.

1.5 Manfaat Penelitian

Memberi informasi pemanfaatan ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) sebagai bahan terapi penyakit bronkitis atau gangguan pernafasan lain akibat paparan asap rokok.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Paparan Asap Rokok

Asap rokok tergolong substansi yang dapat memicu terbentuknya radikal bebas dalam tubuh. Oksidan (radikal bebas) yang terkandung dalam asap rokok yaitu sekitar 10^{15} - 10^{18} molekul radikal bebas setiap hisapan rokok. Gas asap rokok terdiri dari partikel dan cairan yang memiliki kandungan oksidan (radikal bebas). Sekitar 400 senyawa diantaranya beracun dan 43 senyawa bersifat karsinogenik (Syamsulina, 2007). Terdapat beberapa macam bahan kimia dalam rokok diantaranya :

1. Tar merupakan golongan zat karsinogen yang dapat menumbuhkan kanker (Sukendro, 2007:82-83) serta tergolong substansi hidrokarbon yang dapat mengiritasi paru-paru dan bersifat lengket sehingga dapat meningkatkan produksi lendir akibatnya seseorang sulit bernafas (Elizabeth, 2010).
2. Nikotin tergolong *alkolid toksis* yang terdapat pada rokok. Satu batang rokok mengandung 1-3 mg nikotin. Nikotin masuk ke dalam otak membutuhkan waktu sekitar 10 detik yang kemudian diedarkan ke seluruh tubuh selama 15-20 menit (Sukendro, 2007;83).
3. Karbon monoksida termasuk gas yang tidak berwarna, dalam asap rokok kandungannya mencapai 2-6% dan dalam paru-paru dapat bereaksi sebagai pengikat *hemoglobin* (Hb) 200 kali lebih kuat dari oksigen. Waktu paruh 4-7 jam, Hb dapat terisi oleh karbon monoksida dengan bentuk *Carboxy*

Hemoglobin (COHb) yaitu sebanyak 10% sehingga mengakibatkan seluruh tubuh akan kekurangan oksigen (Sukendro, 2007:83).



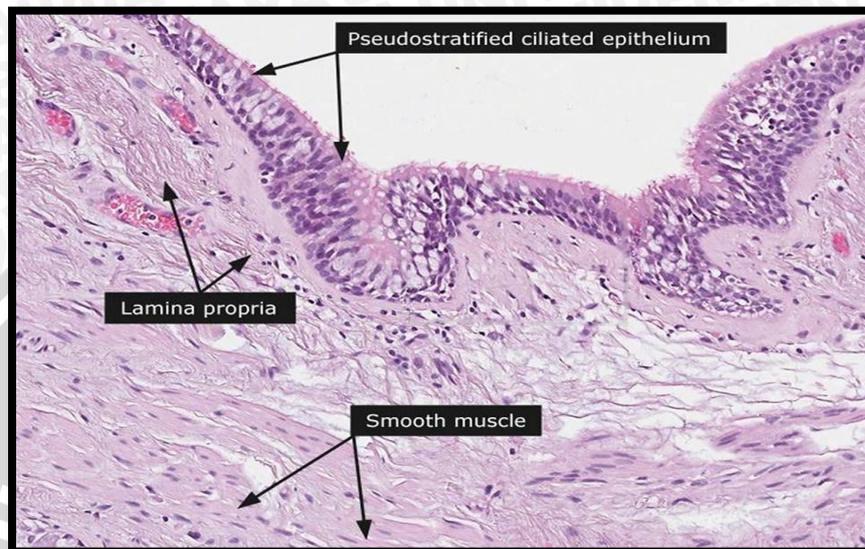
Gambar 2.1 Skema kandungan dalam rokok (Aizad, 2013)

Berbagai macam kandungan berbahaya yang terdapat dalam rokok dapat dilihat pada Gambar 2.1. Paparan asap rokok yang diberikan secara terus menerus akan menimbulkan gangguan pernafasan. Menurut WHO (2008), efek buruk asap rokok lebih besar bagi perokok pasif dibandingkan perokok aktif. Asap rokok yang terhisap oleh perokok pasif mengandung karbon dioksida 5 kali lebih besar, tar dan nikotin 3 kali lipat, amonia 46 kali lipat dan nikel 3 kali lipat.

2.2 Histologi Bronkus

Bronkus secara umum memiliki struktur dalam mediastinum, yang merupakan percabangan dari trakea. Histologi bronkus ekstrapulmonar hampir sama dengan histologi trakea. Setiap bronkus primer bercabang

membentuk bronkus sekunder dan tersier dengan diameter yang semakin menyempit (Sloane, 2003).



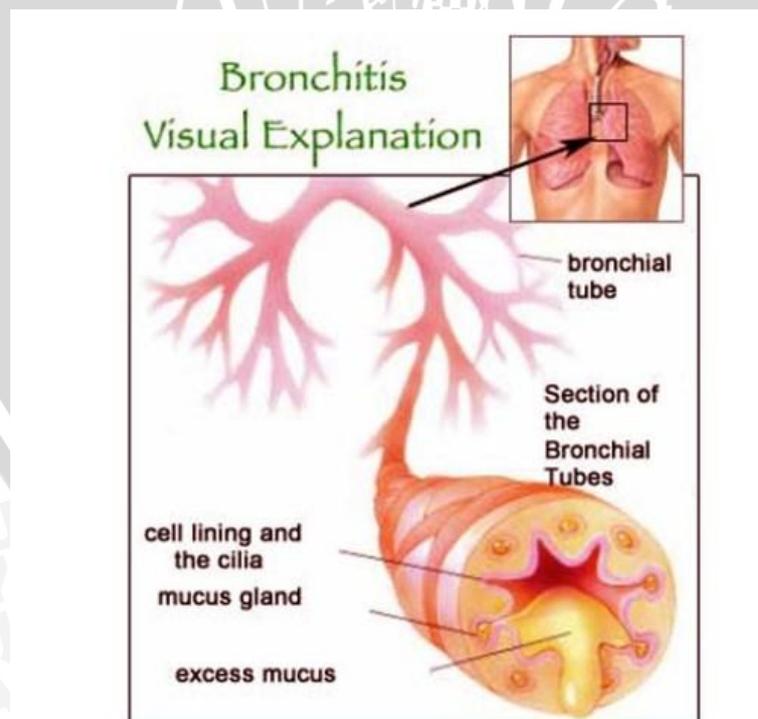
Gambar 2.2 Histologi bronkus normal
Perbesaran 1000x (Uhlen, 2010).

Menurut Junqueira dan Carneiro (1980), bronkus primer kiri dan kanan bercabang membentuk 3 bronkus pada paru-paru kanan dan 2 bronkus pada paru-paru kiri. Bronkus-bronkus ini bercabang berulang-ulang membentuk bronkus-bronkus yang lebih kecil dan cabang-cabang terminalnya dinamakan bronkiolus. Masing-masing bronkiolus bercabang-cabang lagi membentuk 5–7 bronkiolus terminalis. Tiap-tiap bronkiolus terminalis bercabang menjadi 2 atau lebih bronkiolus respiratorius. Histologi bronkus terdiri dari lapisan mukosa, submukosa dan adventitia. Gambar 2.2 menunjukkan lapisan mukosa yang terdiri dari lapisan sel-sel epitel silindris berlapis semu bersilia seperti dan lamina propria yang terdiri dari kelenjar serosa dan otot polos. Lapisan submukosa terdiri dari alveoli dari kelenjar

mukosa dan seromukosa. Pada lapisan adventitia terdapat tulang rawan berupa lempeng-lempeng tulang rawan dan jaringan ikat longgar dengan serabut elastin.

2.3 Patogenesis Bronkitis

Asap rokok mengandung molekul radikal bebas sebanyak 10^{16} molekul per satu hisapan, antara lain tar, asbestosi dan H_2O_2 (Suhartono, 2007). Asap rokok yang diabsorpsi dalam tubuh akan mengganggu lapisan mukosa pada saluran nafas, sehingga menyebabkan munculnya gangguan dalam saluran nafas dan perubahan struktur pada jalan nafas (Antaruddin, 2003). Akumulasi asap rokok dalam tubuh menghasilkan respon peradangan dan lendir yang berlebihan, akibatnya penderita sering mengalami batuk karena terdapat sumbatan lendir (dahak) yang menghambat pernafasan.



Gambar 2.3 Kondisi Bronkitis (Etemad, 2011)

Menurut Muttaqin (2008), bronkitis adalah suatu peradangan bronkiolus, bronkus, dan trakea yang disebabkan oleh berbagai faktor seperti berbagai macam mikroorganisme baik virus, bakteri, maupun parasit. Terdapat 2 jenis bronkitis yaitu bronkitis akut dan kronik. Bronkitis merupakan bentuk awal dari Penyakit Paru Obstruksi Kronik (PPOK). Bronkitis kronik adalah suatu gangguan klinis yang ditandai oleh pembentukan mukus yang berlebihan dalam bronkus (Price & Lorraine: 2006). Menurut Jonsson *et al.* (2008), penyebab bronkitis akut paling sering adalah virus yakni sekitar 90% sedangkan infeksi bakteri sekitar < 10%.

Bronkitis timbul akibat adanya paparan terhadap agen infeksi maupun non infeksi. Agen non infeksi seperti asap rokok masuk kedalam tubuh melalui jalur inhalasi. Iritan akan menyebabkan timbulnya respon inflamasi. Bronkitis akan mengalami peningkatan jumlah sel goblet yang diikuti dengan peningkatan produksi mukus (Supartini *et al.*, 1995) seperti yang terlihat seperti Gambar 2.3. Metaplasia sel goblet, kerusakan sel squamosa dari epitelium, peningkatan ukuran otot polos dan jaringan penunjang pada dinding jalan napas, serta degenerasi tulang rawan pada jalan napas dapat terjadi saat inflamasi bronkus.

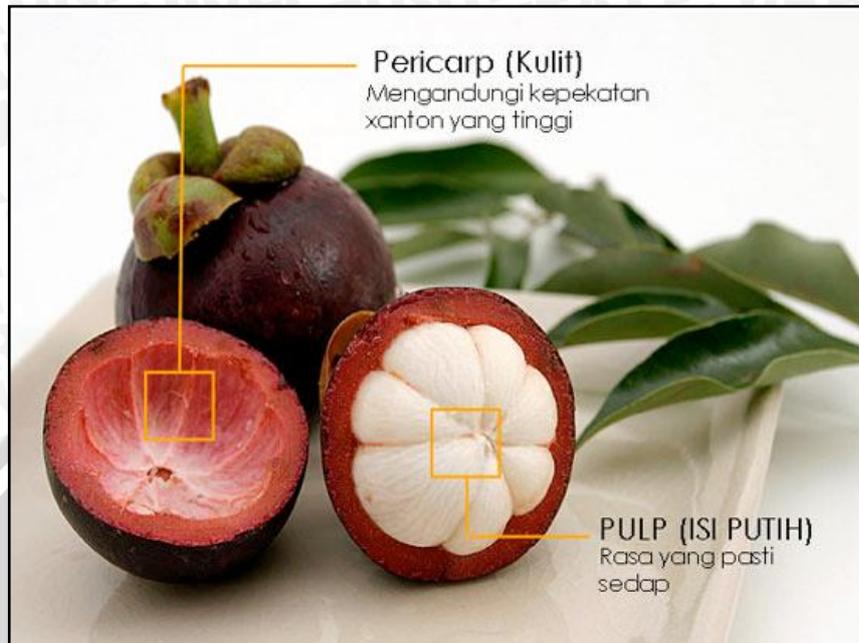
2.4 Manggis (*Garcinia mangostana L*)

Tanaman manggis berasal dari hutan tropis yang teduh di kawasan Asia Tenggara, yaitu hutan belantara Indonesia atau Malaysia. Dari Asia Tenggara, tanaman ini menyebar ke daerah Amerika Tengah dan daerah tropis lainnya seperti Filipina, Papua New Guinea, Kamboja, Thailand,

Srilanka, Madagaskar, Honduras, Brazil dan Australia Utara. “*The Queen of Fruit*” merupakan nama yang diberikan oleh seorang pengelana dunia yaitu Fairchild untuk *mangosteen* (Mahmudah, 2008).

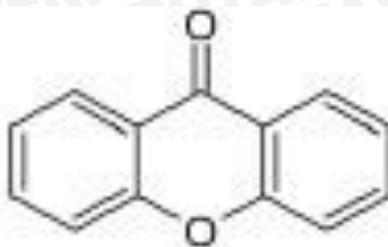
Menurut Ropiah (2009), morfologi buah manggis berbentuk bola dengan diameter 3,5–7,0 cm. Bijinya bersifat apomiksis yaitu embrio tidak dihasilkan dari penyatuan gamet dan penyerbukan, tetapi dari sel di dalam kantong embrio atau sekeliling nuselus dan berkembang membentuk biji yang fertil. Buah muda berwarna hijau dan bila telah tua berubah menjadi ungu kehitaman. Tangkai buah tebal berdaging dan keras, dengan panjang 1,8–2,0 cm. Kulit buah (perikarp) memiliki ketebalan 0,8–1,0 cm, berdaging dan bergetah kuning. Klasifikasi botani pohon manggis adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Sub Kingdom	: Tracheobionta
Superdivisio	: Spermatophyta
Divisio	: Magnoliphyta
Classis	: Magnoliopsida
Subclassis	: Dilleniidae
Ordo	: Malphigiales / Theales
Familia	: Clusiaceae
Genus	: <i>Garcinia</i>
Spesies	: <i>Garcinia mangostana</i> L (Steenis, 1947).



Gambar 2.4 Buah dan kulit manggis (Budiono dkk, 2011)

Menurut Heyne (1987), secara umum kandungan kimia yang terdapat dalam kulit manggis adalah *xanthone*, *mangostin*, *garsinon*, *flavonoid*, dan *tannin*. Senyawa *xanthone* memiliki kemampuan sebagai antioksidan, antibakteri, antifungi dan antiinflamasi. Senyawa *xanthone* termasuk golongan senyawa jenis fenol atau *polyphenol*. *Xanthone* memiliki rumus molekul $C_{13}H_8O_2$. Menurut Noverina (2011), apabila dibandingkan dengan kekuatan antioksidan pada buah-buahan lain seperti jeruk dan strawberi hanya mengandung 2400 dan 2600 *Oxygen Radikal Absorbance Capacity* (ORAC), sedangkan kandungan antioksidan pada kulit buah manggis memiliki nilai yang tinggi yaitu 17.000-20.000 ORAC *Oxygen Radikal Absorbance Capacity* (ORAC) yaitu kemampuan dalam menyerap radikal oksigen.



Gambar 2.5 Struktur senyawa *xanthone* (Budiono dkk, 2011)

2.5 Radikal Bebas dan Antioksidan

2.5.1 Radikal Bebas

Menurut Palupi (2009), radikal bebas didefinisikan sebagai atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron bebas pada strukturnya. Senyawa radikal bebas ini terbentuk secara alami selama proses metabolisme didalam tubuh. senyawa radikal bebas dihasilkan secara teratur dan dalam jumlah yang cukup, maka senyawa-senyawa tersebut mempunyai peranan dalam membantu keseimbangan sel dalam jaringan normal serta memberi isyarat dalam proses metabolisme. Beberapa peranan penting dari radikal bebas yaitu memproduksi ATP dari ADP dalam mitokondria melalui proses fosfolirasi, mendetoksifikasi zat-zat racun melalui sitokrom P450, membantu proses apoptosis sel, membunuh mikro organisme dan sel kanker serta menghasilkan prostaglandin dan leukotriena yang mempunyai berbagai fungsi regulator. Sebaliknya apabila pembentukan atau jumlah radikal bebas dalam tubuh tidak terkendali atau melebihi batas menyebabkan kerusakan oksidasi sel yang mengarah terhadap resiko terkena penyakit

degeneratif seperti jantung, kanker, diabetes mellitus, hepatitis dan penyakit alzheimer.

Senyawa radikal bebas dapat terbentuk akibat berbagai proses kimia kompleks yang terjadi di dalam tubuh seperti berasal dari hasil samping proses oksidasi atau pembakaran sel yang berlangsung pada waktu napas, metabolisme sel dan olahraga yang berlebihan (Winarsi, 2007). Makanan cepat saji, polusi udara dari asap kendaraan bermotor, asap rokok, bahan pencemar dan radiasi sinar UV akibat dari penipisan lapisan ozon juga menjadi sumber utama keberadaan radikal bebas (Jain dkk, 2004).

2.5.2 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi atau suatu zat yang dapat menetralkan atau menangkap radikal bebas (Rohman dan Riyanto, 2005). Menurut Widjaya (2003), antioksidan dinyatakan sebagai senyawa yang secara nyata dapat memperlambat oksidasi, walaupun dengan konsentrasi yang lebih rendah sekalipun dibandingkan dengan substrat yang dapat dioksidasi.

Menurut Maulida dan Zulkarnaen (2010) berdasarkan fungsinya, senyawa antioksidan dibagi menjadi lima kelompok, yaitu :

1. *Primary antioxidants*, senyawa fenol yang mampu memutus reaksi berantai pembentukan radikal bebas asam lemak. Pemberian atom hidrogen yang berasal dari hidroksi senyawa fenol dapat membentuk senyawa yang stabil misalnya tokoferol.

2. *Oxygen scavengers*, senyawa yang berperan sebagai pengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi. Senyawa tersebut mengadakan reaksi dengan oksigen yang berada dalam sistem sehingga oksigen akan berkurang misalnya vitamin C.
3. *Secondary antioxidants*, senyawa yang memiliki kemampuan untuk berdekomposisi hidroperoksida menjadi produk akhir yang stabil misalnya asam tiopropionat.
4. *Antioxidative Enzyme*, enzim yang berperan mencegah terbentuknya radikal bebas misalnya glucose oksidase.
5. *Chelators sequestrants*, senyawa yang mampu mengikat logam (besi dan tembaga) yang mampu mengkatalis reaksi oksidasi lemak misalnya fosfolipid.

Stres oksidatif dapat terjadi apabila jumlah radikal bebas dalam tubuh lebih tinggi dari jumlah antioksidan. Stres oksidatif dalam tubuh diukur melalui kadar malondialdehida (MDA) (Valko *et al.*, 2006).

2.6 Malondialdehida (MDA)

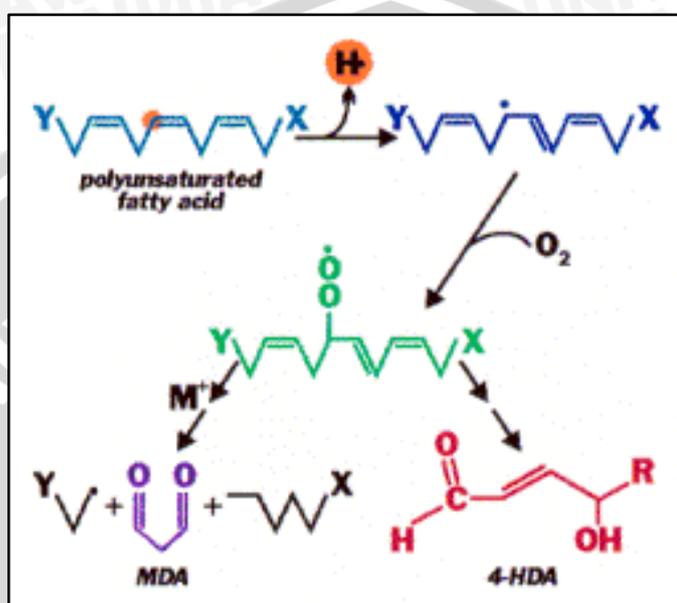
Malondialdehida (MDA) merupakan senyawa organik dengan rumus molekul $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$. Senyawa ini tergolong senyawa aldehida yang sangat reaktif dan dapat bersifat toksik. MDA terbukti bersifat mutagenik bagi sel manusia karena dapat memodifikasi struktur DNA (Niedernhofer *et al.*, 2003). Malondialdehida (MDA) merupakan lipid peroksida yang berasal dari radikal bebas yang dapat merusak membran sel apabila berlanjut mengakibatkan kerusakan sistem membran sel dan kematian sel.

Menurut Paterson dan Webster (2002) dan Marshall *et al* (2000) dalam Rahardjani (2010), pelepasan sitokin proinflamasi maupun antiinflamasi oleh makrofag pada sepsis menyebabkan lepasnya berbagai mediator sekunder seperti mediator vasoaktif dan *Reactive Oxygen Species* (ROS) akan mengawali proses inflamasi. Menurut Langseth (1994) mediator ROS merupakan oksidan kuat akibat reduksi satu elektron oksigen. Stres oksidatif dapat terjadi apabila ROS yang dihasilkan lebih besar dibanding dengan yang dapat diredam oleh mekanisme pertahanan sel (antioksidan). Menurut Droge (2003) and Stoll (2004) dalam Rahardjani (2010), peroksidasi lipid mengakibatkan kerusakan struktur molekul penyusun membran yang mengakibatkan lisis sel maupun hemolisis (Droge, 2003).

Menurut Yustika, dkk., (2013), pembentukan MDA melalui peroksidasi lipid diawali dengan penghilangan atom hidrogen (H) dari molekul lipid tak jenuh rantai panjang oleh gugus radikal hidroksil (*OH), sehingga lipid bersifat radikal. Radikal lipid ini bereaksi dengan atom oksigen (O_2) membentuk radikal peroksil (*OO) yang selanjutnya menghasilkan MDA (dengan ikatan tak jenuh lebih dari tiga).

Derajat peroksidasi lipid dapat ditunjukkan dengan kadar MDA yang merupakan produk akhir dari peroksidasi *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA). Reaksi peroksidasi lipid tidak jenuh oleh ROS dapat diawali oleh pembentukan radikal lipid (L) yang terjadi apabila lipid berupa asam lemak tak jenuh (LH) bereaksi dengan radikal hidroksil (OH). Radikal karbonlipida (L) dapat bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksil (LOO).

Radikal peroksil yang terbentuk akan bereaksi lagi dengan atom H yang berasal dari molekul lipida lainnya (L1H) menghasilkan lipid hidroperoksida (LOOH) dan radikal lipida baru (L1).



Gambar 2.6 Mekanisme pembentukan MDA (Yustika dkk, 2013).

Menurut Algameta (2009), pengukuran kinetika peroksidasi lipid secara *in vitro* dapat dilakukan dengan mengukur berapa banyak oksigen yang dibutuhkan. Ada beberapa metode yang dapat digunakan salah satunya *Thiobarbituric acid* (TBA) yang dapat dilakukan baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Tes ini didasarkan pada reaksi kondensasi antara satu molekul MDA dengan dua molekul TBA pada kondisi asam. Hasilnya adalah pigmen berwarna merah muda yang dapat diukur pada panjang gelombang 532 nm.

2.7 Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hewan percobaan yang umum digunakan dalam penelitian ilmiah adalah tikus. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan spesies tikus yang paling sering digunakan sebagai hewan model pada penelitian mengenai

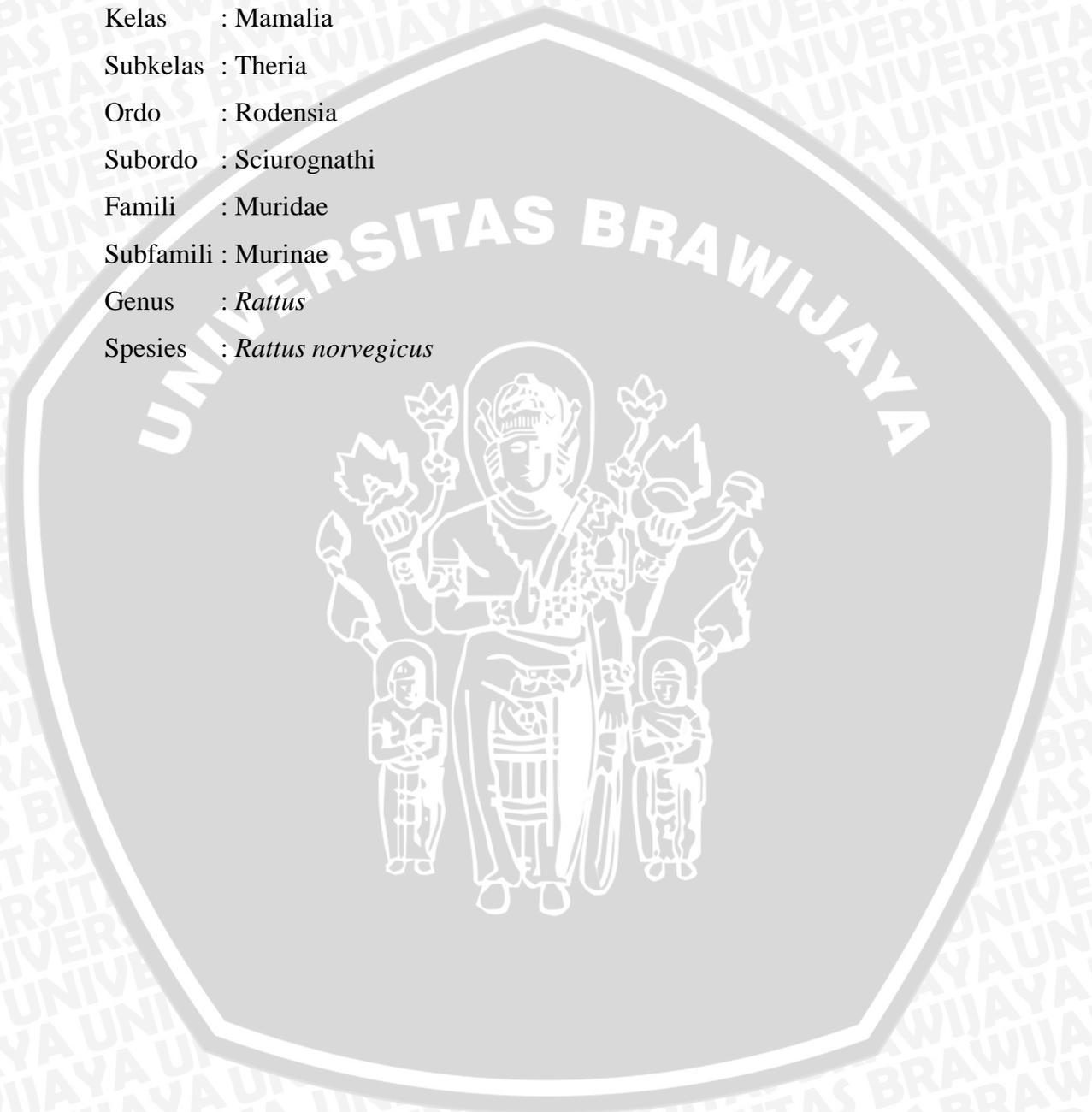
manusia maupun mamalia lain. Keadaan ini tampaknya sesuai dengan pendapat Hedrich (2006) yang menyatakan secara garis besar fungsi dan bentuk organ serta proses biokimia dan biofisika antara tikus dan manusia memiliki banyak kemiripan sehingga dapat diaplikasikan pada manusia. Hewan ini memiliki ciri-ciri morfologi antara lain berat badan antara 150 – 600 gram, hidung tumpul dan badan besar dengan panjang 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20 – 23 mm (Depkes, 2011).



Gambar 2.7 *Rattus norvegicus* (Estina, 2010)

Terdapat beberapa kelebihan pada *Rattus norvegicus* antara lain lebih cepat dewasa, tidak memperlihatkan perkawinan musiman dan umumnya lebih cepat berkembang biak. Kelebihan lain sebagai hewan laboratorium adalah sangat mudah dikendalikan dan berukuran cukup besar sehingga memudahkan pengamatan (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Menurut Besselsen (2004) dan Depkes (2011) taksonomi tikus adalah:

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Subfilum : Vertebrata
Kelas : Mamalia
Subkelas : Theria
Ordo : Rodensia
Subordo : Sciurognathi
Famili : Muridae
Subfamili : Murinae
Genus : *Rattus*
Spesies : *Rattus norvegicus*



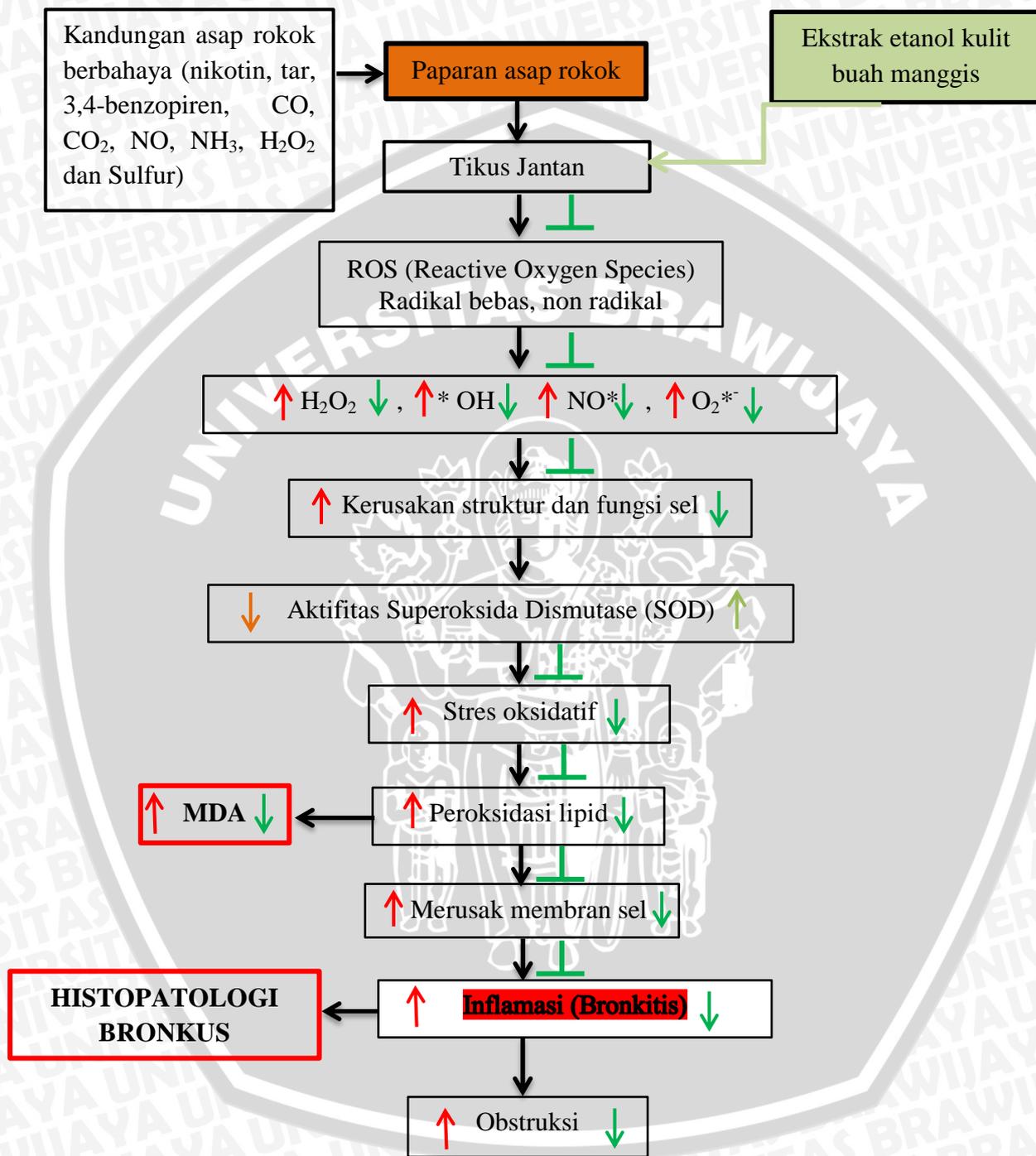
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Paparan asap rokok yang mengandung zat berbahaya seperti nikotin, tar, 3,4-benzopiren, CO, CO₂, NO, NH₃, dan sulfur tergolong sebagai *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS adalah senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif yang terdiri atas kelompok radikal bebas dan nonradikal. Kelompok radikal bebas antara lain *superoxide anion* (O₂^{*}), *hidroxyl radicals* (OH^{*}), sedangkan yang tergolong dalam nonradikal misalnya *hidrogen peroxide* (H₂O₂) (Halliwell and Whiteman, 2004). Radikal bebas dihasilkan dalam jumlah yang cukup selama proses metabolisme dalam tubuh contohnya H₂O₂ yang dihasilkan oleh sel darah putih yang memiliki fungsi untuk membunuh bakteri dan jamur di dalam tubuh namun H₂O₂ tidak mampu menyerang sasaran secara spesifik sehingga dapat menyerang asam lemak tidak jenuh ganda dari membran sel. Peningkatan radikal bebas dalam tubuh akan menyebabkan kerusakan epitel silindris berlapis semu (Winarsi, 2007). Peningkatan ROS memicu pelepasan sel mediator untuk aktivasi makrofag yang dapat merusak sel-sel radang. Kerusakan epitel pada saluran pernafasan terjadi karena adanya mediator inflamasi yaitu eosinofil. Eosinofil melepaskan enzim proteolitik berupa *Major Basic Protein* (MBP) yang dapat merusak epitel karena memiliki daya destruksi terhadap epitel mukosa. Perubahan tersebut dapat diamati secara histopatologi. Tubuh memiliki sistem pertahanan untuk menangkal serangan ROS sehingga dapat

mengurangi kerusakan yang diakibatkan oleh ROS. Sistem pertahanan antioksidan dalam tubuh adalah enzim *Superoxide Dismutase* (SOD) yang terdapat di mitokondria dan sitosol. SOD dapat berinteraksi secara langsung dengan ROS namun dalam keadaan tertentu produksi ROS yang melebihi sistem pertahanan tubuh akan menyebabkan stres oksidatif. Meningkatnya stres oksidatif akan memicu terjadinya peroksidasi lipid. Radikal bebas akan menginisiasi peroksidasi lipid secara langsung terhadap *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) dinding sel. Pengukuran tingkat peroksidasi lipid diukur dengan menggunakan produk akhir yaitu malondialdehida (MDA) yang merupakan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh dan yang bersifat toksik terhadap sel.

Antioksidan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol kulit buah manggis. Ekstrak etanol kulit buah manggis mengandung *xanthone* yang berfungsi sebagai antioksidan eksternal yang mampu meningkatkan aktivitas SOD dalam tubuh. Peningkatan aktivitas antioksidan dalam tubuh akan mengikat radikal bebas sehingga akan terjadi ikatan yang lebih stabil dalam tubuh. Kondisi tersebut dapat menurunkan stres oksidatif. Penurunan stres oksidatif diikuti dengan penurunan peroksidasi lipid sehingga respon inflamasi akan berkurang. Adapun kerangka konseptual ini dapat dilihat pada Gambar 3.1:



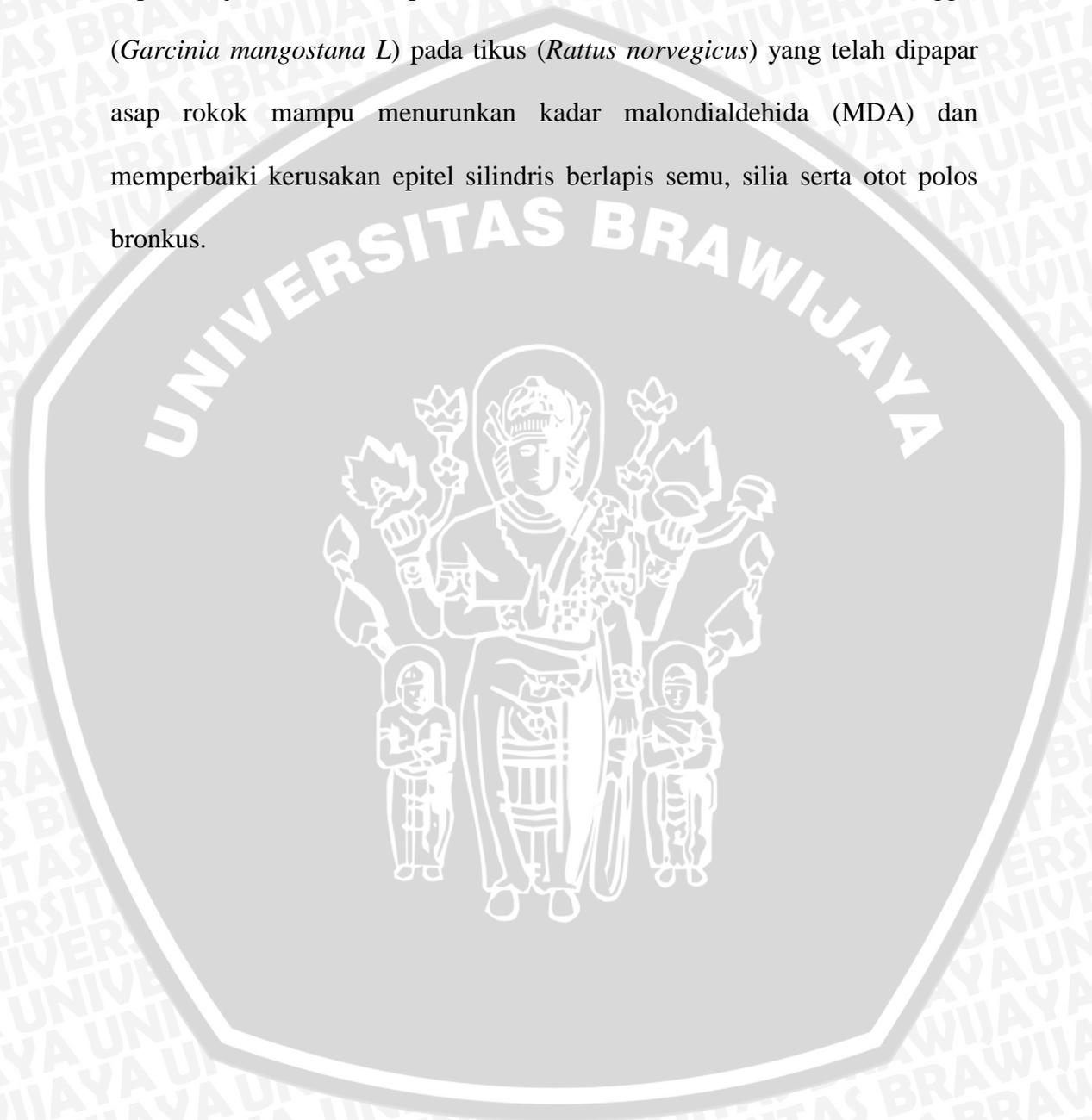
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

Keterangan :

- : Inflamasi
- ↑ : Peningkatan
- ↓ : Penurunan
- ⊥ : Menghambat
- : Variabel bebas
- : Variabel tergantung
- ← : Terapi
- ↑ : Peningkatan aktivitas antioksidan
- ↓ : Penurunan antioksidan endogen
- : Paparan

3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah: pemberian ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang telah dipapar asap rokok mampu menurunkan kadar malondialdehida (MDA) dan memperbaiki kerusakan epitel silindris berlapis semu, silia serta otot polos bronkus.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya pada bulan Oktober 2013 sampai dengan Januari 2014.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dari strain Wistar berumur tiga bulan. Berat badan tikus antara 150-200 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

$$t(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif (P0), kelompok kontrol positif (P1), kelompok yang dipapar asap rokok dan diberi terapi 200 mg/kg BB (P2), kelompok yang dipapar asap rokok dan diberi terapi 400 mg/kg BB (P3), dan kelompok yang dipapar asap rokok dan diberi terapi 600 mg/kg BB (P4). Kelompok kontrol negatif merupakan tikus tanpa perlakuan, sedangkan kontrol positif merupakan tikus yang telah dipapar asap rokok. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari empat ekor tikus sebagai ulangan.

4.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : pemberian paparan asap rokok dan terapi ekstrak kulit buah manggis

Variabel tergantung : kadar malondialdehida (MDA) dan gambaran histopatologi bronkus

Variabel kontrol : berat badan, umur dan jenis kelamin tikus

4.5 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain bak pemeliharaan hewan coba, tempat pakan dan minum hewan coba, papan bedah, pisau, penyaring, seperangkat alat gelas (tabung reaksi, beaker glass, cawan petri, labu takar 10mL, 100mL, 500mL, 1000mL), *disecting set*, mikro pipet, pipet tetes, oven, blender kering, *stirrer*, pH meter, *vortex mixer*, *microtube*,

vacutainer, *sputit*, sentrifus, alumunium voil, plastik organ, spektrofotometer IR, freezer -20°C, kulkas 4°C, *waterbath*, mesin vakum pembuat preparat, spektrofotometer UV-Vis, mortar, mikrotom, dan mikroskop cahaya.

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini antara lain tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar dengan berat badan 150-200 gram sebanyak 20 ekor, ransum pakan untuk hewan coba, kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*), Etanol 50%, Aquades, Gelatin 1%, NaCl 0,9%, PBS pH 7,4 (KCl, KHPO₄, NaCl, Na₂HPO₄H₂O) pH 7,4, Azida 1%, paraformaldehid (PFA) 4% (PFA murni 40%, NaCl 0,9%), Alkohol 70%, larutan baku MDA, Na-Thio, larutan Thricloroactic Acid (TCA), Xylol, parafin cair, pewarna jaringan HE, NaOH, HCl encer, Plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) , CHCl₃, H₂SO₄, dan NH₃.

4.6 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan sebagai berikut :

- 4.6.1 Persiapan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*)
- 4.6.2 Penentuan dosis ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*)
- 4.6.3 Pembuatan ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*)
- 4.6.4 Uji fitokimia ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*)
- 4.6.5 Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT)
- 4.6.6 Paparan asap rokok pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*)
- 4.6.7 Terapi dengan ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*)
- 4.6.8 Pengambilan organ bronkus tikus putih (*Rattus norvegicus*)

4.6.9 Pengukuran kadar malondialdehida (MDA)

4.6.9.1 Pengukuran kurva standar malondialdehida (MDA)

4.6.9.2 Pengukuran kadar MDA organ bronkus tikus dengan metode TBA

4.6.10 Pewarnaan preparat dengan metode HE (Hematoksilin-Eosin)

4.6.11 Analisis data

4.7 Cara Kerja Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Persiapan hewan coba dilakukan adaptasi selama tujuh hari di Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Malang. Tikus diberi pakan berupa ransum basal dan minum *ad libitum*. Komposisi ransum basal disusun berdasarkan standar *Association of Analytical Communities* (AOAC) (2005) yaitu mengandung karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, mineral, vitamin, dan air 12%. Tikus dibagi menjadi lima kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (P0), kelompok kontrol positif (P1), kelompok yang dipapar asap rokok 2 batang dan diberi terapi 200 mg/kg BB (P2), kelompok yang dipapar asap rokok 2 batang dan diberi terapi 400 mg/kg BB (P3), dan kelompok yang dipapar asap rokok 2 batang dan diberi terapi 600 mg/kg BB (P4). Kelompok kontrol negatif merupakan tikus tanpa perlakuan, sedangkan kontrol positif merupakan tikus yang telah dipapar asap rokok. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari empat ekor tikus sebagai ulangan. Kandang tikus berukuran panjang 25,75cm, lebar 17,5cm,

dan tinggi 17,5cm. Suhu optimum ruangan hewan coba 22-24°C dengan kelembaban 50-60%.

4.7.2 Penentuan Dosis Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L*)

Penelitian ini menggunakan tiga dosis untuk terapi yaitu 200 mg/kg BB, 400 mg/kg BB, dan 600 mg/kg BB berdasarkan penelitian dari Mansour (2013). Pemberian terapi ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) diberikan setiap hari selama 3 minggu. Setiap ekor hewan coba disonde sebanyak 1 ml.

4.7.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L*)

Kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) dicuci bersih menggunakan air mengalir kemudian dipisahkan dari buahnya setelah itu dipotong kecil-kecil ($0,5 \times 1 \text{cm}^2$) agar ekstrak dapat keluar maksimal kemudian dikeringkan semalam dalam oven dengan suhu 45°C, setelah itu dihancurkan dengan menggunakan blander kering untuk membuat serbuknya (Mansour, 2013). Penghilangan tanin dilakukan sebelum maserasi.

4.7.4 Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L*)

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui komponen bioaktif yang terdapat pada suatu bahan alam yang terkandung dalam ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia Mangostana L*). Uji fitokimia itu sendiri meliputi uji flavanoid, uji terpenoid, dan uji alkaloid. Adanya senyawa flavanoid diuji dengan mereaksikan 0,5mL ekstrak etanol kulit buah

manggis dengan 1ml larutan NaOH 10% kemudian ditambahkan 1ml HCl encer. Ekstrak akan menunjukkan hasil positif uji flavanoid apabila setelah ditambahkan NaOH akan berwarna kuning coklat dan setelah penambahan HCL encer akan berubah menjadi lebih bening (kuning muda) (Harborne, 1984).

Uji terpenoid dilakukan dengan cara mengambil ekstrak sebanyak 0,5ml ditambah 2ml kloroform (CHCl_3), setelah itu ditambahkan 2ml asam sulfat (H_2SO_4) pekat. Hasil positif uji terpenoid akan menunjukkan adanya warna merah kecoklatan antar 2 lapisan larutan (Harborne, 1984).

Uji alkaloid dapat dilakukan dengan cara mengambil 0,5ml ekstrak ditambah dengan kloroform (CHCl_3) sebanyak 10ml dan 1ml NH_3 0,05M. Larutan kemudian dicampur dengan H_2SO_4 2 M sebanyak 1ml, dikocok dan terbentuk 2 lapisan. Lapisan asam sulfat diambil dan ditambahkan pereaksi Wagner. Alkaloid menunjukkan hasil positif uji alkaloid jika terbentuk endapan coklat pada larutan (Harborne, 1984).

4.7.5 Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sebelum dilakukan analisis inframerah (IR), ekstrak etanol kulit buah manggis diisolasi dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). KLT merupakan suatu analisis yang digunakan untuk memisahkan senyawa secara cepat berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi. Pada kromatografi lapis tipis, fase diamnya berupa lapisan

yang seragam (*uniform*) pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik (Rohman, 2007). Adsorben berupa serbuk halus yang dilapiskan secara merata dan tipis (0,1- 2 ml) diatas lempeng kaca sebagai fase diam dan pelarut toluen pengembang sebagai fase gerak. Fase gerak (pengembang) yang digunakan adalah asam asetat: dietil eter: etil asetat (3:4:4). Noda (spot) yang berbentuk pada silika dilihat dengan lampu UV pada panjang gelombang 366. Tiap – tiap noda dihitung harga Rf-nya dengan rumus (Soebagio, 2002):

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut pengembang}}$$

Selanjutnya setiap noda pada silika dikerok dan dianalisis dengan spektrofotometer IR menggunakan pelat KBr. Analisis spektrofotometri IR bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit buah manggis.

4.7.6 Paparan Asap Rokok pada Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Paparan asap rokok dilakukan selama satu bulan, dalam sehari hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dipapar dengan 2 batang rokok pada kelompok P1, P2, P3, dan P4 berdasarkan penelitian dari Mansour (2013). Paparan asap rokok dilakukan dengan menggunakan spuit 60ml kemudian ujungnya diberi *yellow tip*. Siapkan selang plastik sesuai dengan ukuran rokok, setelah itu rokok dinyalakan kemudian asap rokok disedot menggunakan spuit yang ujungnya dipasang dengan *yellow tip*. Asap rokok kemudian ditransfer ke dalam

kandang khusus pengasapan hewan coba. Hal tersebut dilakukan secara berulang hingga rokok habis.

4.7.7 Terapi dengan Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L)

Terapi dilakukan pada kelompok tikus P2, P3, dan P4 dengan memberikan ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L) sebanyak 1ml per ekor secara peroral (sonde) selama tiga minggu dan diberikan setiap hari (Mansour, 2013). Perhitungan dosis dapat dilihat pada Lampiran 7.

4.7.8 Pengambilan Organ Bronkus Tikus (*Rattus norvegicus*)

Pengambilan organ dilakukan dengan melakukan pembedahan tikus terlebih dahulu. Tikus dikorbankan dengan cara dislokasi pada leher, kemudian diletakkan pada papan bedah dan tikus diposisikan rebah dorsal. Scalpel, gunting, dan pinset merupakan alat yang digunakan saat proses pembedahan. Kemudian satu per satu organ dikeluarkan dan dicuci menggunakan NaCl 0,9%. Pengambilan bronkus pada awalnya dilakukan dengan mengambil percabangan dari trakea kemudian dipisahkan secara perlahan, setelah itu sebagian direndam dalam PBS (*Phospat Buffer Saline*) Azida dan sebagian lagi disimpan dalam larutan PFA (*Paraformaldehyd*) 4%.

4.7.9 Pengukuran Kadar MDA (Malondialdehida)

4.7.9.1 Pembuatan Kurva Standar MDA

Larutan stok MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 μ g/ml masing-masing diambil 100 μ L, dimasukkan

dalam tabung reaksi yang berbeda. Setelah itu ditambahkan 550 μ l aquades. Masing-masing tabung yang berisi 650 μ l larutan standar ditambahkan 100 μ l TCA 100%, 250 μ L HCl 1 N dan 100 μ L Na-Thio 1%, kemudian dihomogenkan dengan *vortex mixer*, setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit dan dihasilkan supernatan dan homogenat. Supernatan diambil lalu diinkubasi dengan penangas air dengan suhu 100°C selama 30 menit kemudian didinginkan pada suhu ruang. Selanjutnya MDA dengan konsentrasi 4 μ g/ml diukur absorbansinya pada range panjang gelombang 500-600 nm untuk menentukan panjang gelombang maksimum MDA. Kemudian dibuat kurva standar MDA dengan dibaca absorbansinya pada variasi konsentrasi (1,2,3,4,5,6,7 dan 8 μ g/ml) pada panjang gelombang maksimumnya (Amin, dkk., 2009).

4.7.9.2 Pengukuran Kadar MDA Menggunakan Uji Thiobarbituric Acid (TBA)

Jaringan bronkus dari setiap kelompok masing-masing diambil sebanyak 0,1 gram dipotong kecil-kecil lalu digerus dalam mortar dingin yang diletakkan di atas balok es. Ditambahkan 1ml NaCl 0,9%, kemudian homogenat dipindah ke dalam *microtube* dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit dan diambil supernatannya. Setelah itu diambil 100 μ L supernatan bronkus ditambah 550 μ L akuades.

Lalu ditambahkan 100 μ L TCA, 250 μ L HCl 1N, dan 100 μ L Na-Thio. Setiap penambahan reagen larutan dihomogenkan dengan *vortex*. Sentrifugasi dilakukan kembali dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit, setelah itu supernatan dipisahkan dan dipindahkan pada *microtube* baru. Kemudian larutan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 100°C selama 30 menit, selanjutnya dibiarkan pada suhu ruang. Sampel diukur absorbansinya pada λ max (532 nm) untuk uji TBA dan diplotkan pada kurva standar yang telah dibuat untuk menghitung konsentrasi sampel (Amin, dkk., 2009).

4.7.10 Pewarnaan Preparat dengan Metode HE (Hematoksilin-Eosin)

Fiksasi dilakukan untuk mencegah kerusakan pada jaringan, menghentikan proses metabolisme, mengawetkan komponen sitologi dan histologi, dan mengeraskan materi yang lunak agar jaringan dapat diwarnai. Fiksasi dilakukan dengan cara memasukkan jaringan dalam larutan PFA 4%.

Dehidrasi dilakukan untuk mengeluarkan air dari jaringan agar jaringan tersebut dapat diisi oleh parafin sehingga jaringan dapat diiris tipis. Proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat mulai dari 70%, 80%, 90%, 95% dan 100%.

Tahap penjernihan dilakukan mulai pemindahan jaringan dari alkohol absolut III ke larutan penjernihan yaitu xylol I (1 jam), xylol II, dan Xylol III (30 menit pada suhu kamar dan 30 menit pada

inkubator). Proses infiltrasi kemudian dilakukan dalam parafin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60°C (Junquiera dan Carneiro, 2007).

Embedding dilakukan dengan cetakan yang didalamnya diisi paraffin cair, setelah membeku cetakan tersebut dipotong-potong dan ditempelkan pada blok kayu. Blok tersebut dipasang pada mikrotom dan diatur agar posisinya sejajar dengan posisi pisau. Blok parafin dipotong dengan ketebalan 4 μm . Awal pemotongan dilakukan *trimming* karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna. Sediaan disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C selama semalam lalu siap diwarnai dengan HE.

Pewarnaan HE dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hematoxilin untuk memberi warna pada inti sel dan memberi warna biru (basofilik). Eosin yang merupakan *counterstaining* hematoxilin untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberi warna merah muda. Diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol absolut I, II dan III masing-masing 3 menit, alkohol 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan selama 3 menit. Sediaan dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan dilanjutkan dengan air akuades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna hematoxilin selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan air akuades selama 5 menit. Sediaan kemudian

dapat diwarnai dengan pewarna eosin selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit dan air akuades selama 5 menit. Setelah sediaan terwarnai dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama beberapa detik lalu dilanjutkan dengan alkohol proses *clearing* dengan xylol I, II dan III selama 3 menit kemudian dikering anginkan, selanjutnya dilakukan *mounting* (perekatan) dengan *entellan* (Suntoro, 1983).

4.7.11 Analisis Data

Percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang mana tikus dibagi lima perlakuan. Data yang diperoleh dari pengukuran kadar MDA dianalisis dengan uji *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) (Dahlan, 2004), apabila terdapat perbedaan hasil diantara perlakuan maka dilakukan analisis lebih lanjut dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau uji *Tukey* ($\alpha = 5\%$) menggunakan SPSS 16.0 *For Windows*, sedangkan analisis data histopatologi dilakukan secara kualitatif dengan deskripsi.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L*) Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) Bronkus Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Terpapar Asap Rokok

Hasil pengukuran kadar malondialdehida (MDA) hewan coba (*Rattus norvegicus*) pada jaringan bronkus yang telah dipapar asap rokok tertera dalam Tabel 5.1. MDA merupakan hasil akhir dari peroksidasi lipid serta penanda adanya stress oksidatif dalam tubuh. **Tabel 5.1** Perbandingan kadar MDA pada hewan coba setiap perlakuan.

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Kadar MDA (mg/ml)	Kadar MDA (%)	
		Peningkatan	Penurunan
Tikus Kontrol Negatif (P0)	0,1410 ± 0,0396 ^a	0	0
Tikus Kontrol Positif (P1)	0,6030 ± 0,0413 ^d	327	-
Tikus Paparan Asap Rokok dan Terapi 200mg/Kg BB (P2)	0,4020 ± 0,0359 ^c	-	33
Tikus Paparan Asap Rokok dan Terapi 400mg/Kg BB (P3)	0,2430 ± 0,0224 ^b	-	60
Tikus Paparan Asap Rokok dan Terapi 600mg/Kg BB (P4)	0,1560 ± 0,0268 ^a	-	74

Ket : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$).

Analisis kadar MDA yang diolah secara statistika menggunakan SPSS. 16 menunjukkan bahwa rata-rata kadar MDA pada berbagai perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda nyata antar perlakuan, kecuali pada perlakuan P0 dan P4. Hasil terbaik ditunjukkan pada kelompok P4 dengan terapi 600 mg/Kg BB (0,1560 ± 0,0268) yang mendekati kontrol negatif, sehingga dapat diartikan bahwa kelompok P4 memiliki respon yang hampir sama dengan kelompok P0.

Perbedaan kadar MDA organ bronkus ($p < 0,05$) yang nyata terjadi antara kelompok tikus kontrol positif, kelompok kontrol negatif, dan kelompok tikus yang diberi paparan asap rokok yang mendapatkan terapi. Kelompok tikus kontrol positif menunjukkan peningkatan kadar MDA sebesar 327% dari kontrol negatif. Hewan coba yang diberikan paparan asap rokok dan diterapi 600mg/Kg BB mengalami penurunan kadar MDA sebesar 74% dari kontrol positif (Tabel 5.1). Penurunan tersebut sangat efektif karena lebih dari 50%.

Reactive Oxygen Species (ROS) merupakan senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif yang terdiri atas kelompok radikal bebas dan kelompok non radikal. Kelompok radikal bebas antara lain *superoxide anion* (O_2^*), *hydroxyl radicals* (OH^*), dan *peroxyl radicals* (RO_2^*) sedangkan non radikal misalnya *hydrogen peroxide* (H_2O_2), dan *organic peroxides* (ROOH) (Halliwell and Whiteman, 2004). Senyawa oksigen reaktif ini dihasilkan dalam proses metabolisme oksidatif dalam tubuh misalnya pada proses oksidasi makanan menjadi energi, keadaan ini sama seperti yang dipaparkan oleh Praptiwi, dkk., (2006). ROS diproduksi dalam jumlah yang cukup dalam tubuh seperti sel darah putih yang menghasilkan H_2O_2 yang berfungsi untuk membunuh beberapa jenis bakteri dan jamur, namun H_2O_2 tidak mampu menyerang secara spesifik sehingga dapat menyerang asam lemak tidak jenuh ganda dari membran sel yang dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi dari sel (Winarsi, 2007). Radikal bebas di dalam tubuh dapat dinetralisir oleh antioksidan endogen.

Antioksidan endogen utama pada sel-sel tubuh adalah enzim SOD (*Superoxide dismutase*). Antioksidan dapat menghambat pelepasan H_2O_2 yang dihasilkan oleh neutrofil pada hewan coba.

Paparan asap rokok berhubungan dengan berbagai gangguan saluran nafas. Zat berbahaya seperti sulfur dioksida, nitrogen oksida dan partikel hasil paparan asap rokok menyebabkan peningkatan imunoglobulin E (IgE) dengan berbagai mekanisme inflamasi pada saluran nafas, hal ini sejalan dengan penelitian Santoso dan Dahlan (2013) yang menyatakan bahwa polusi udara dan asap rokok merupakan faktor predisposisi peningkatan kadar IgE. Paparan asap rokok sebagai alergen akan memicu *Antigen Presenting Cells* (APCs) kemudian didegradasi menjadi peptida-peptida yang selanjutnya dipresentasikan pada sel limfosit T atau yang lebih dikenal dengan sel Th. Pemaparan asap rokok selama 1 bulan bertujuan untuk memberikan paparan alergen secara langsung ke target utama yaitu saluran pernafasan. Paparan asap rokok akan mengaktifasi $CD4^+$ dan sel mast pada saluran pernafasan. $CD4^+$ akan berdiferensiasi menjadi Th2, saat proses diferensiasi akan dihasilkan IL-4 dan IL-5. Th2 yang bergabung dengan IL-5 dapat mengaktifasi dan meningkatkan produksi eosinofil. Aktivasi sel mast akan memicu pelepasan mediator inflamasi seperti histamin, prostaglandin, leukotrin, dan sitokin.

Antioksidan merupakan senyawa yang berfungsi untuk mencegah, menurunkan reaksi oksidasi, memutus, menghambat, menghentikan, dan menstabilisasi radikal bebas (Prakash, 2001). Jumlah radikal bebas yang ada

di dalam tubuh berpengaruh terhadap kerja antioksidan endogen. Paparan asap rokok yang diberikan secara terus menerus dapat meningkatkan radikal bebas dalam tubuh sehingga akan memicu ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan endogen yang akan menyebabkan stress oksidatif. Tingginya stress oksidatif akan memicu terjadinya peroksidasi lipid, hal ini sama seperti yang dipaparkan dalam penelitian Evans (2000). Peroksidasi lipid merupakan proses oksidasi asam lipid tak jenuh rantai panjang (*Polyunsaturated Fatty Acid* atau PUFA) pada membran sel yang menghasilkan radikal peroksidasi lipid hidroperoksida dan produk aldehida misalnya MDA.

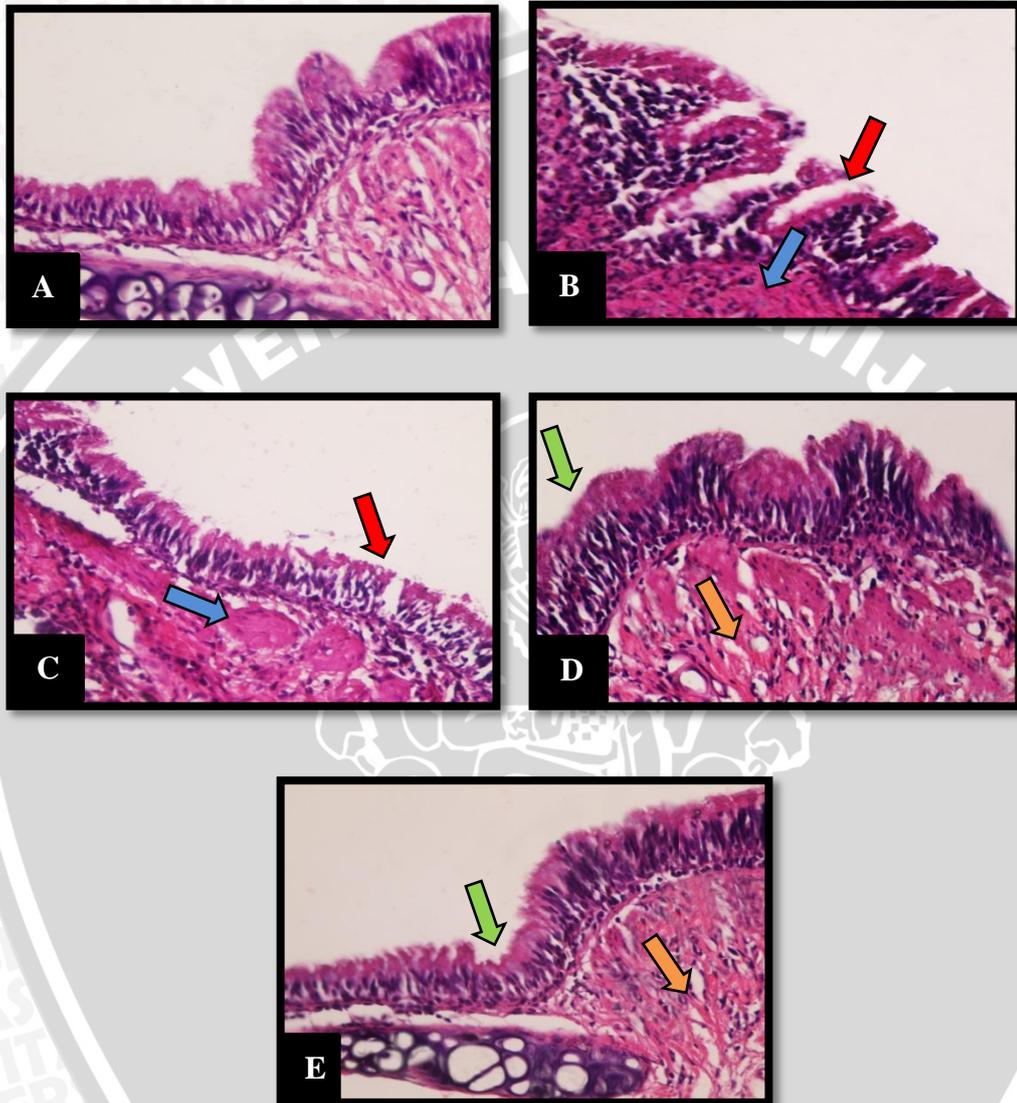
Menurut Retno (2012) dalam Prangdimurdi (2011), MDA merupakan produk akhir yang dapat digunakan untuk mengetahui derajat kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid hasil dari radikal bebas akan selalu membentuk reaksi berantai yang terus berlanjut sampai radikal bebas ini dihilangkan oleh sistem antioksidan dari tubuh. Terapi antioksidan yang digunakan adalah ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*). Kulit buah manggis memiliki kandungan *xanthone* yang tinggi sehingga memiliki kemampuan untuk menangkap radikal bebas yang ada di dalam tubuh akibat paparan asap rokok. Gugus hidroksi (OH) yang dimiliki oleh *xanthone* efektif mengikat radikal bebas karena elektron yang tidak memiliki pasangan dapat berikatan langsung dengan gugus OH yang dimiliki oleh senyawa *xanthone*.

Hasil analisis kadar MDA pada penelitian ini menunjukkan bahwa kadar MDA pada kelompok tikus yang terpapar asap rokok (kontrol positif) berbeda nyata dengan kelompok tikus yang tidak diberikan paparan asap rokok (kontrol negatif). Tingginya kadar MDA disebabkan oleh tingginya peroksidasi lipid yang secara tidak langsung menunjukkan tingginya kadar radikal bebas. Tingginya kandungan radikal bebas dalam jaringan yang tidak diimbangi oleh antioksidan akan menyebabkan stress oksidatif. Penelitian lain menunjukkan antioksidan berperan sebagai zat yang mampu menetralkan radikal bebas dalam tubuh (Praptiwi, dkk., 2006). Jadi semakin tinggi kandungan radikal bebas dalam jaringan akan berbanding lurus dengan tingginya stress oksidatif yang dapat memicu meningkatnya peroksidasi lipid dengan produk akhir MDA yang digunakan sebagai penanda (marker) kerusakan seluler akibat adanya radikal bebas. Prinsip pengukuran MDA adalah reaksi satu molekul MDA dengan dua molekul TBA (*Thiobarbituric acid*) membentuk senyawa kompleks MDA-TBA yang berwarna pink.

5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L*) Terhadap Gambaran Histopatologi Bronkus Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Terpapar Asap Rokok

Kerusakan jaringan bronkus pada keadaan bronkitis dapat terjadi akibat paparan asap rokok. Dinding saluran nafas normal dilapisi oleh epitel semu berlapis (*pseudostratified*) bersilia. Keadaan bronkitis menyebabkan terjadinya perubahan sel dan abnormalitas struktur karena terjadinya

inflamasi. Melalui pemeriksaan histopatologi dari bronkus didapatkan kerusakan epitel bronkus, abnormalitas silia dan hipertropi otot polos.



Gambar 5.2 Histopatologi jaringan bronkus tikus (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE) (400x)

Keterangan: (A) Tikus kontrol negatif, (B) Tikus kontrol positif, (C) Tikus yang diberi paparan asap rokok dan terapi 200mg/kg BB, (D) Tikus yang diberi paparan asap rokok dan terapi 400mg/kg BB, (E) Tikus yang diberi paparan asap rokok dan terapi 600mg/kg BB.

- Tanda panah merah : abnormalitas silia
- Tanda panah biru : hipertropi otot polos
- Tanda panah hijau : perbaikan silia
- Tanda panah orange : penurunan ukuran otot polos

Gambar 5.2 menunjukkan perbandingan kondisi kerusakan jaringan organ bronkus pada bagian epitel dan silia, serta hipertropi otot polos. Hal tersebut membuktikan bahwa paparan asap rokok yang diberikan selama 1 bulan dapat merusak jaringan bronkus. Epitel silindris berlapis semu bersilia tikus kontrol (Gambar 5.2 A) terlihat pada kondisi normal yang mana epitel-epitel masih kompak dan berbentuk epitel silindris berlapis semu bersilia, sedangkan pada tikus (Gambar 5.2 B) mengalami hipertropi otot polos dan abnormalitas silia. Abnormalitas silia dan hipertropi otot polos juga masih terlihat pada tikus (Gambar 5.2 C). Penurunan ukuran otot polos dan perbaikan silia mulai terlihat (Gambar 5.2 D dan Gambar 5.2 E). Gambar 5.2 E memiliki susunan epitel yang lebih rapi dan kompak dibandingkan dengan Gambar 5.2 D.

Kerusakan jaringan bronkus dapat disebabkan oleh adanya radikal bebas dari luar tubuh seperti paparan asap rokok yang mengandung zat *nitric oxide* (NO). NO merupakan senyawa toksik berupa molekul gas yang diproduksi oleh *inducible NO synthase* (iNOS) dengan cara mengubah asam amino L-arginin menjadi NO dan citrulin (Yosida dan Tuder, 2007). NO dalam saluran pernafasan dihasilkan oleh berbagai sel termasuk epitel saluran pernafasan, sel-sel inflamasi (makrofag, neutrofil, dan sel mast) dan endotel pembuluh darah. NO dapat terurai menjadi oksida nitrogen lain yaitu nitrit (NO₂) dan nitrat (NO₃). NO juga bereaksi dengan anion superoksida untuk menghasilkan *peroxynitrite* (ONOO⁻) yang merupakan molekul sitotoksik dan dapat menyebabkan kerusakan epitel serta

meningkatkan jumlah sel inflamasi. Paparan asap secara terus menerus yang bersifat alergen mampu merangsang terjadinya inflamasi pada saluran nafas yang menimbulkan terjadinya *remodelling* pada jalan nafas berupa terjadinya kerusakan epitel dan hipertrofi otot polos, hal tersebut sejalan dengan apa yang telah dipaparkan oleh Palmans (2002).

Kerusakan epitel pada saluran pernafasan terjadi karena adanya sel mediator inflamasi yaitu eosinofil yang dilepaskan saat proses inflamasi, kebocoran mikrovaskuler, hipersekresi mukus, dan adanya radikal bebas akibat aktivasi sel. Pelepasan mediator inflamasi dapat merusak membran biologis penyusun sel-sel epitel (Supartini *et al.*, 1995). Proses inflamasi berperan penting pada hiperreaktivitas bronkus. Peningkatan produksi mukus dapat mengganggu fungsi silia.

Paparan asap rokok akan mengaktifasi $CD4^+$ dan sel mast pada saluran pernafasan. $CD4^+$ akan berdiferensiasi menjadi Th2, saat proses diferensiasi akan dihasilkan IL-4 dan IL-5. Th2 yang bergabung dengan IL-5 dapat mengaktifasi dan meningkatkan produksi eosinofil, sedangkan Th2 yang bergabung dengan IL-4 akan menginisiasi pembentukan IgE kemudian terjadi aktivasi sel mast. Aktivasi sel mast akan memicu pelepasan mediator inflamasi seperti histamin, prostaglandin, leukotrin, dan sitokin. Histamin dapat meningkatkan terjadinya kontraksi otot polos, sedangkan prostaglandin E2 (PGE2) dan leukotrin berperan dalam produksi mukus sehingga dapat menimbulkan bronkokonstriksi. Pelepasan sitokin oleh sel mast seperti IL-4 dan IL-13 akan meningkatkan produksi IgE, sedangkan

IL-5 berperan dalam aktivasi eosinofil (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Eosinofil melepaskan enzim proteolitik berupa *Major Basic Protein* (MBP) yang dapat merusak epitel karena memiliki daya destruksi terhadap epitel sementara limfosit melepas limfokin (IL-5) yang berperan terhadap inflamasi. Menurut Donno *et al.*, (2000) paparan tersebut dapat mempengaruhi lama inflamasi dan menyebabkan kerusakan struktur epitel.

Nekrosis merupakan salah satu pola dasar kematian pada sel. Nekrosis dapat dikenali karena adanya perubahan secara makroskopis maupun mikroskopis. Kejadian nekrosis menyebabkan perubahan pada inti sel yang terdiri dari tiga proses, yaitu (Lestari dan Mulyono, 2011) piknosis merupakan pengerutan inti yang terjadi akibat homogenisasi sitoplasma dan peningkatan eosinofil, kemudian DNA berkondensasi menjadi massa yang padat. Selanjutnya terjadi karioreksis yaitu keadaan inti yang terfragmentasi (terbagi atas fragmen-fragmen) yang piknotik kemudian terjadi kariolisis yaitu pemudaran kromatin basofil akibat aktivitas DNase.

Pemberian ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) berfungsi sebagai antioksidan karena memiliki kandungan *xanthone*. *Xanthone* memiliki gugus hidroksi (OH) efektif untuk mengikat elektron bebas dari asap rokok. Antioksidan yang terdapat pada kulit buah manggis mampu meningkatkan aktifitas antioksidan endogen (SOD) sehingga dapat menstabilkan ikatan radikal bebas yang ada di dalam tubuh. Dengan demikian IgE dapat menurun kemudian diikuti dengan penurunan aktivitas sel mast dalam tubuh. Penurunan aktivitas sel mast akan memicu terjadinya

penurunan pelepasan sel mediator seperti histamin, prostaglandin, leukotrin, dan sitokin sehingga terjadi penurunan kontraksi otot polos. Kontraksi otot polos yang terjadi akan memicu sel-sel otot untuk melakukan metabolisme dan menghasilkan distrofin. Distrofin merupakan protein otot yang dapat mengikat satu sel otot dengan otot lainnya sehingga apabila kontraksi otot polos sering terjadi maka akan terjadi peningkatan ukuran otot polos. Sebaliknya jika kontraksi otot polos berkurang maka akan terjadi penurunan distrofin yang dapat mengurangi ikatan antara sel-sel otot yang dapat menyebabkan penurunan ukuran otot polos. Paparan asap rokok yang mengaktivasi $CD4^+$ berdiferensiasi menjadi Th2 yang dapat bergabung dengan IL-5 dapat mengaktivasi dan peningkatan produksi eosinofil. Proses perbaikan epitel terjadi melalui penurunan jumlah kerusakan epitel saat elektron bebas dari paparan asap rokok diikat dengan antioksidan dari *xanthone* berupa gugus OH. *Xanthone* akan memicu peningkatan aktivitas SOD dalam tubuh untuk menstabilkan radikal bebas. Dengan demikian akan terjadi penurunan aktivasi IL-5 yang akan diikuti dengan penurunan enzim proteolitik berupa *Major Basic Protein* (MBP) sehingga akan terjadi penurunan jumlah kerusakan epitel.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) terhadap organ bronkus yang mengalami bronkitis mampu memperbaiki kerusakan jaringan akibat inflamasi dari paparan asap rokok dengan adanya perbaikan epitel silindris berlapis semu, silia, dan penurunan ukuran otot polos. Hasil terbaik

ditunjukkan pada (Gambar 5.2 E) yang mengalami penurunan ukuran otot polos dan terjadi perbaikan silia, serta terjadi perbaikan epitel silindris berlapis semu.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) memberikan pengaruh nyata terhadap kadar malondialdehida (MDA) jaringan bronkus tikus (*Rattus norvegicus*). Penurunan kadar MDA terbaik ditunjukkan pada pemberian dosis 600mg/Kg BB yang mendekati tikus kontrol negatif.
2. Pemberian terapi ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) terhadap hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) yang telah terpapar asap rokok mampu memperbaiki kerusakan jaringan bronkus yang ditunjukkan dengan perbaikan silia dan sel epitel silindris berlapis semu, serta penurunan ukuran otot polos.

6.2 Saran

Perlu dikaji lebih lanjut tentang bentuk sediaan penggunaan ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*) yang bisa dimanfaatkan untuk *pet animal*.

DAFTAR PUSTAKA

- Aizad. 2013. <http://pendaftar.unisza.edu.my/jkkp/index.php/artikel-osh/9-asap-rokok-pasif>. [25 Oktober 2013]
- Algameta, E. D. 2009. Uji Aktivitas Antioksidan Tablet Effervescent Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dan Sambiloto (*Adrographis paniculata*) pada Tikus yang Dibebani Glukosa [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Amin, M.H.F., A.P.W. Mahendra., dan Aulanni'am. 2009. Pengaruh Paparan Lipopolisakarida pada Rongga Mulut dan Assisted Drainage Therapy (Adt) terhadap Kadar S-Ige dan Profil Radikal Bebas Pada Tikus Asma. Seminar Nasional Biologi XX dan Kongres PBI XIV Uin Maliki Malang 24-25 Juli 2009.
- Antaruddin, 2003. Pengaruh Debu Padi pada Faal Paru Pekerja Kilang Padi yang Merokok dan Tidak Merokok. Skripsi. Program Pendidikan Dokter Spesialis Paru. Fakultas Kedokteran USU. Medan.
- AOAC, International. 2005. *Official Methods Of Analysis Of AOAC International*. 2 Vols. 16 edition. Arlington VA. USA. Association of Analytical Community.
- Ballenger, J.J. 1994. Hidung dan Sinus Paranasal, Aplikasi Klinis Anatomi dan Fisiologi Hidung dan Sinus Paranasal. Dalam : *Penyakit Telinga Hidung dan Tenggorokan dan Leher*. Jilid satu. Binarupa Aksara. Jakarta.
- Baratawidjaja , K.G & Rengganis , I. 2010. *Imunologi Dasar*, 9th ed, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta: p.479.
- Besselsen DG. 2004. *Biology of laboratory rodent*. [terhubung berkala]. <http://www.ahsc.arizona.edu/>. [17 September 2013]
- Budiono, K., Y. I. P. A. Miryanti., L. Sapei., S. Indra. 2011. Ekstraksi Antioksidan dari Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat. Universitas Katolik Parahyangan. Bandung.
- Dahlan, S. 2004. *Seri Statistik: Statistiek untuk Kedokteran dan Kesehatan Uji Hipotesis dengan Menggunakan SPSS Program 12 Jam*. Jakarta: PT Arkans.
- Departemen Kesehatan RI. 2004. *Kawasan Tanpa Rokok*. Pusat Promkes Depkes RI. Jakarta.

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2011. Pedoman Pengendalian Tikus. <http://www.depkes.go.id/downloads/Pengendalian%20tikus.pdf>. [17 September 2013].
- Departemen Kesehatan RI. 1990. Daftar Komposisi Bahan Makanan. Dalam Mahmudah I. 2008. Memperpanjang umur simpan buah manggis segar (*Garcinia mangostana* L.) dengan kombinasi proses pre-cooling, pelilinan, stretch film singe wrapping pada penyimpanan dingin 5°C. [Skripsi]. Departemen Teknik Pertanian, IPB, Bogor.
- Donno, M.D., D. Bittesnich., A. Chetta., D. Olivieri., and M.T. Lopez- Vidriero. 2000. The Effect of Inflammation on mucocilliary clearence in asthma. *Chest*; 118: 1142-9.
- Droge, W. 2003. Free radicals in the physiology control of cell function. *Physiol Rev* 2003; 82: 47-95.
- Elizabeth, L. 2010. *Stop Merokok*. Yogyakarta: Garailmu
- Estina, 2010. <http://dokterternak.wordpress.com/2010/11/05/jenis-dan-ciri-ciri-tikus-labolatorium-disertai-gamba/>. [31 Oktober 2013]
- Etemad, A. 2011. [How do the Lungs Protect Themselves.](http://emedtravel.wordpress.com/page/19/) <http://emedtravel.wordpress.com/page/19/> [26 Oktober 2013]
- Evans, W. J. 2000. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr*, 72, 647S-52S.
- Fidrianny, I., I. Supradja., dan A. Soemardji. 2004. Analisis nikotin dalam asap dan filter rokok. *Acta Pharmaceutica Indonesia*; 29(3):100-4.
- Halliwell, B. and Whiteman, M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: *how should you do it and what do the results mean Br J Pharmacol*, 142, 231-55.
- Harborne, J.B., 1984. Phitochemical Method. *Chapman and Hall ltd.* London
- Hedrich, H.J. 2006. Taxonomy and Stock and Strains. *J lab Rat* 71-92.
- Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia III*, Penerjemah : Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Yayasan Sarana Wahajaya, Jakarta, pp 1385 –1386.
- Jain, K., S. Kataria., and K. N. Guruprasad. 2004. Effect of UV-B Radiation On Antioxidant Enzymes and Its Modulation By Benzoquinone and α -tocopherol in Cucumber cotyledons, *Current Science*, Vol.87.

- Jonsson, J.S., J.A. Sigurdsson., K.G. Kristonsson., M. Guthnadottir., S. Magnusson. 2008. Acute Bronchitis in Adult. How Close do We Come To Its Aetiology In General Practice Scand *J Prim Health Care*. 2008; 15: 156-160.
- Junqueira C. L. dan J. Carneiro. 1980. *Histologi Dasar*. Diterjemahkan oleh Adji Darma. Edisi Ketiga. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Junqueira, C. L. 2007. *Histologi Dasar Teks dan Atlas*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Kumalaningsih. 2006. Antioksidan Alami Penangkal Radikal Bebas Sumber, Manfaat, Cara Penyediaan dan Pengolahan. Surabaya: Trubus Agrisarana.
- Kusriningrum. 2008. *Perancangan Percobaan untuk Penelitian*. Surabaya. Airlangga University Press.
- Langseth, L. 1994. Oxidants and antioxidants: some basic concepts. Dalam: Bracco U, Jardine NJ, penyunting. Oxidants, antioxidants, and disease prevention. Belgium: *International Life Science Institute*.1-4.
- Lestari, Ajeng S.P. dan A. Mulyono. 2011. Analisis Citra Ginjal untuk Identifikasi Sel Piknosis dan Sel Nekrosis. *Jurnal Neutrino* Vol.4, No.1, p:48-66.
- Mackay, J and Eriksen M. 2002. *The tobacco atlas*. Switzerland: Myriad: 18-36.
- Mansour, N. A. A. 2013. Antioxidant Activity of Crude Extract from Mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn) Pericarp on The Lung Rat Wich Exposure by Cigarette [Thesis]. Master of Agriculture Product Technology. Faculty of Agricultural Technology. Brawijaya University.
- Mardiana, L. Tim Penulis PS. 2012. *Ramuan dan Khasiat Kulit Manggis*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Marshall, C. John., and R. Taneja. 2000 Terminology and conceptual challenges, Dalam: Sepsis and multiple organ dysfunction a multidisciplinary approach. Philadelphia:WB Saunders Company. 12-18.
- Maulida, D dan N. Zulkarnaen, 2010. Ekstraksi Antioksidan(Likopen) dari Buah Tomat dengan Menggunakan Solven Campuran, N –Heksana, Aseton, dan Etanol. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Diponegoro Semarang.

- Muttaqin, A. 2008. *Buku Ajar Asuhan Keperawatan Klien dengan Gangguan Sistem Pernafasan*. Jakarta : Salemba Medika.
- Niedernhofer, Laura J., J. Daniels., Scott., C. A. Rouzer., Greene, E. Rachel., and L. J. Marnett. 2003. Malondialdehyde, a Product of Lipid Peroxidation, Is Mutagenic in Human Cells. *Journal of Biological and Chemistry* Vol. 278, No. 33, pp. 31426–31433.
- Noverina, A. 2011. *Kasiat Fantastis Kulit Manggis, Anti Kanker, Anti Diabetes, Anti Kolesterol*. Ed. Cetakan 1. Gramedia Widiasarana Indonesia. Jakarta.
- Palmans, E., N.J. Vanacker., R.A. Pauwels., and J.C. Kips.2002. Effect of Age on Allergen Induced Structural Airway Change in Brown Norway Rats. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 165: 1280-1284.
- Palupi, I. A., M. Martosupomo. 2009. Buah Merah: Potensi dan Manfaatnya Sebagai Antioksidan. *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia*.
- Paterson, R. L, N.R. Webster. 2002. Sepsis and inflammatory response syndrome. *J Royal Coll Surg Edinburgh*. 45:178-182.
- Prakash, A. 2001. Antioxidant Activity. Medallion Laboratories: *Analytical Progress* Vol 19 No 2: 1-4.
- Praptiwi, P. Dewi, M. Harapini. 2006. Nilai peroksida dan anti radikal bebas diphenyl pycryl hydrazil hidrate DPPH ekstrak methanol Knema laurina. *Majalah Farmasi Indonesia*, (17)1: 32-36.
- Price, S. A. and M. L. Wilson. 2006. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit* Edisi 6. Jakarta : EGC.
- Rahardjani, K. B. 2010. Hubungan antara Malondialdehyde (MDA) dengan Hasil Luaran Sepsis Neonatorum. *Jurnal Sari Pediatri*, 12(2): 82-87.
- Retno, T. 2012. Pengaruh Pemberian Isoflavon terhadap Peroksidasi Lipid pada Hati Tikus Normal. *Indonesia Medicus Veterinus* 1(4) : 483-491. ISSN : 2301-784.
- Rohman, A., dan S. Riyanto. 2005. Daya antioksidan ekstrak etanol daun kemuning (*Murraya paniculata* (L) Jack) secara in-vitro. *Majalah Farmasi Indonesia* 16(3):136-140.
- Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Cetakan I. penerbit Pustaka Pelajar, Yogyakarta.

- Ropiah, S. 2009. Perkembangan Morfologi dan Fisiologi Buah Manggis (*Garcinia mangostana L*) Selama Pertumbuhan dan Pematangan [Tesis]. Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Santoso, P dan Z. Dahlan. 2013. Diferensiasi Asma Atopik dengan Nonatopik pada Pasien Rawat Jalan di Klinik Paru-Asma. Fakultas Kedokteran. Universitas Padjajaran.
- Sloane, E. 2003. *Anatomi dan Fisiologi untuk Pemula*. Jakarta: EGC.
- Smith, J. B dan S. Mangkoewidjojo. 1988. Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Soebagio. 2002. *Kimia Analitik II*. Malang : JICA.
- Stenis, C.G.G.J. van, 1947. *Flora voor de scholen in Indonesia*. Noordhoff – Kolff N.V., Batavia.
- Stoll, B.J. 2004. Infections of neonatal infant. Dalam: Behrman RF, Kleigman RM, Jenson HB. penyunting. Nelson Textbook of Pediatrics. Edisi ke-17 Philadelphia: *WB Saunders Co*;h.623-640.
- Suhartono, E., H, Fachir., dan B, Setiawan., 2007. Rokok sebagai sumber radikal bebas dalam Kapita selekta biokimia: Stres oksidatif dasar dan penyakit. Banjarmasin: *Pustaka Banua*; 117-8.
- Sukendro, S. 2007. *Filosofi Rokok, Sehat Tanpa Berhenti Merokok*. Yogyakarta: Pinus Book Publisier.
- Suntoro, H.S. 1983. *Metode Pewarnaan (Histologi dan Histokimia)*. Jakarta: Brata Karya Aksara.
- Supartini, N. Santoso D.I. dan Kardjito T. 1995. Konsep Baru Patogenesis Asma Bronkial. *J. Respire Indo*; 15:156-162.
- Syamsulina, R. 2007. Pengaruh Radikal Bebas pada Rokok Terhadap Timbulnya Kelainan di Rongga Mulut. *Denta Jurnal Kedokteran Gigi FKG UHT*. Vol.1(2):85-89.
- Uhlen, M., P. Oksvold, L. Fagerberg, E. Lundberg, K. Jonasson, M. Forsberg, M. Zwahlen, C. Kampf, K. Wester, S. Hober, H. Wernerus, L. Bjorling, F. Ponten. 2010. The Human Protein Atlas. <http://www.proteinatlas.org/dictionary/normal/bronchus/detail+1>. [26 Oktober 2013]

- Valko, M., C. J. Rhodes., J. Moncol., M. Izacovic., and M. Mazur. 2006. Free Radical, metal and antioxidant in oxidative stress induced cancer. *J biochem Cell Biol. Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, SK-812 37 Bratislava, Slovakia.*
- Weir, N, and D.G. Golding. 1997. The Physiology of The Nose and Paranasal Sinuses. In: *Kerr Ag. Scott-Brown's Otolaryngology Rinology*. 6thed, Butterworth, London.
- WHO., 2007. Tuberculosis. <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>. Fact sheet No. 104. Diakses pada 21 Desember 2013.
- WHO., 2008. Global Tuberculosis Control. Geneva: World Health Organization. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/en/index.html. Diakses pada 21 Desember 2013.
- World Health Organization. (2008). Pencegahan dan Pengendalian ISPA di Fasilitas Pelayanan Kesehatan. <http://www.who.int/csr/resources/publications/AMpandemicbahasa.pdf>. Diakses tanggal 13 Februari 2014.
- Widjaya, C.H. 2003. *Peran Antioksidan terhadap Kesehatan Tubuh*. Healthy Choice . Edisi IV.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensi dan Aplikasi dalam Kesehatan*. Yogyakarta. Kanisius.
- Yoshida, T., Tuder, R.M., 2007. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiol. Rev.* 87 (3), 1047–1082.
- Yustika, A. R., Aulanni'am, dan S. Prasetyawan. Kadar Malondialdehid (MDA) dan Gambaran Histologi pada Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi Cylosporine-A. *Kimia Student Journal*, Vol. 1, No. 2, pp. 222-228 Universitas Brawijaya Malang.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LAMPIRAN



repository.ub.ac.id

Lampiran 1. Keterangan Kelaikan Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"

No: 183-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (*ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE*)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : STUDI PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL KULIT BUAH
MANGGIS (*Garcinia mangostana L*) TERHADAP
KADAR MALONDIALDEHID DAN GAMBARAN
HISTOPATOLOGI BRONKUS PADA TIKUS (*Rattus
norvegicus*) YANG TERPAPAR ASAP ROKOK

PENELITI : BERLYA PUTRI DWI FIDYA ALVI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : PENDIDIKAN KEDOKTERAN HEWAN / UNIVERSITAS
BRAWIJAYA

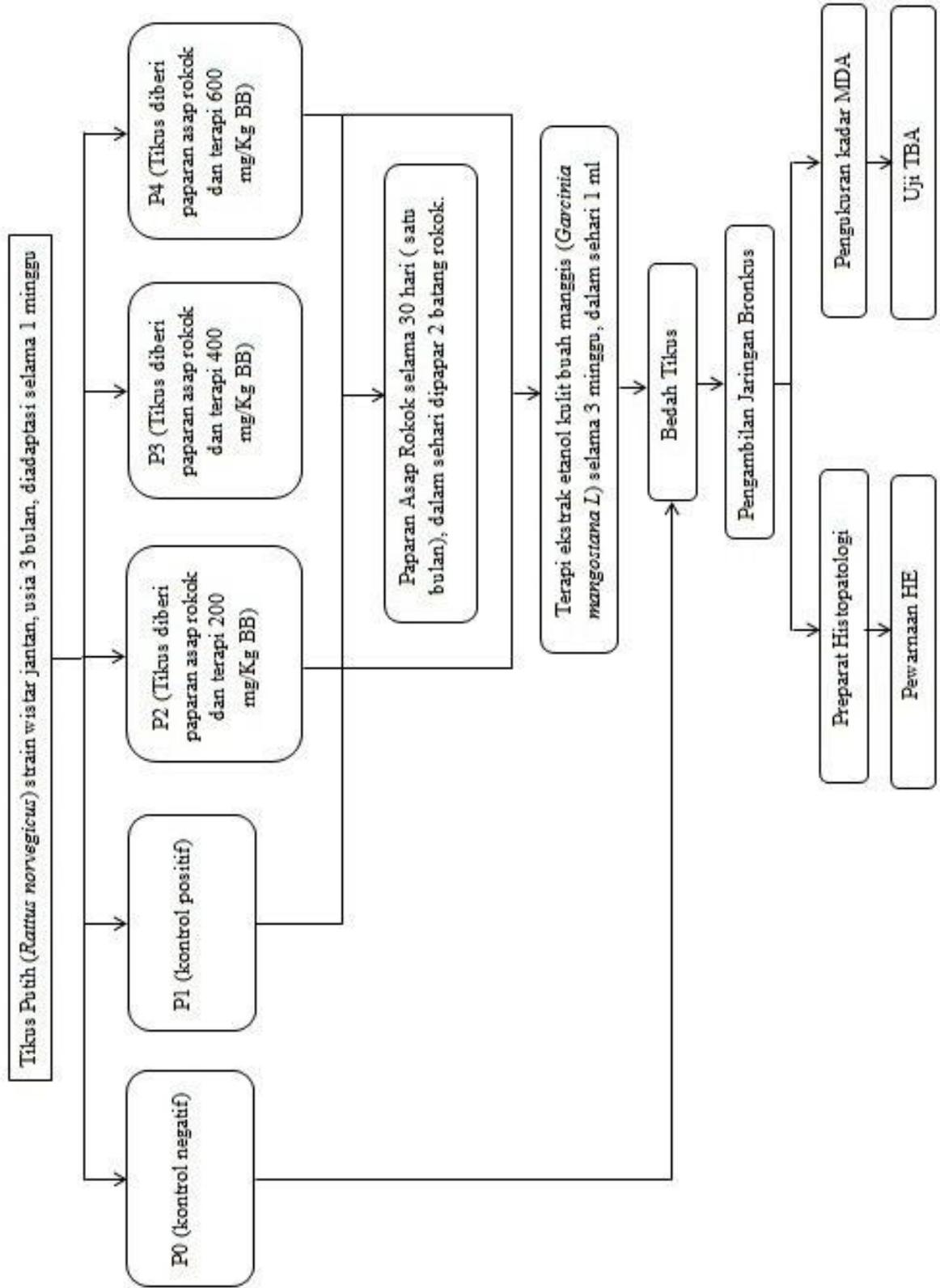
DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 6 Desember 2013
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

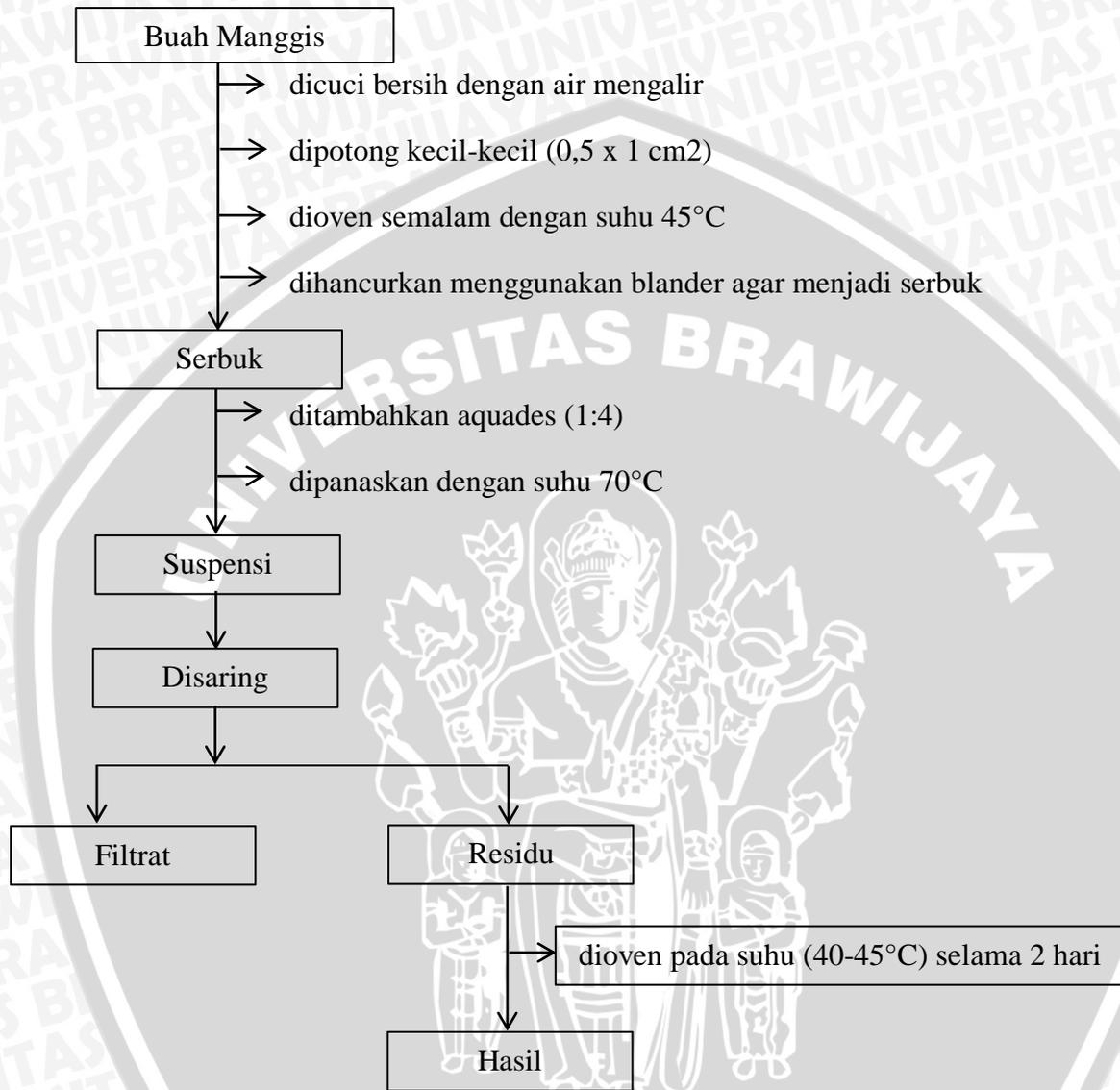


Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 2. Skema Kerja Penelitian

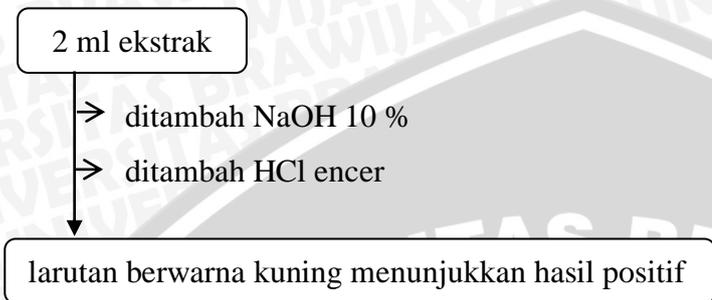


Lampiran 3. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Manggis

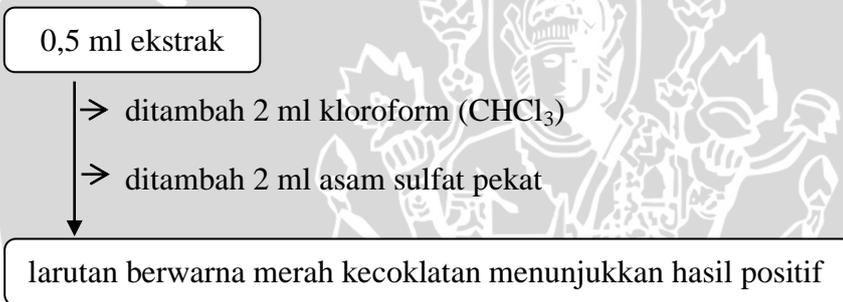


Lampiran 4. Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L*)

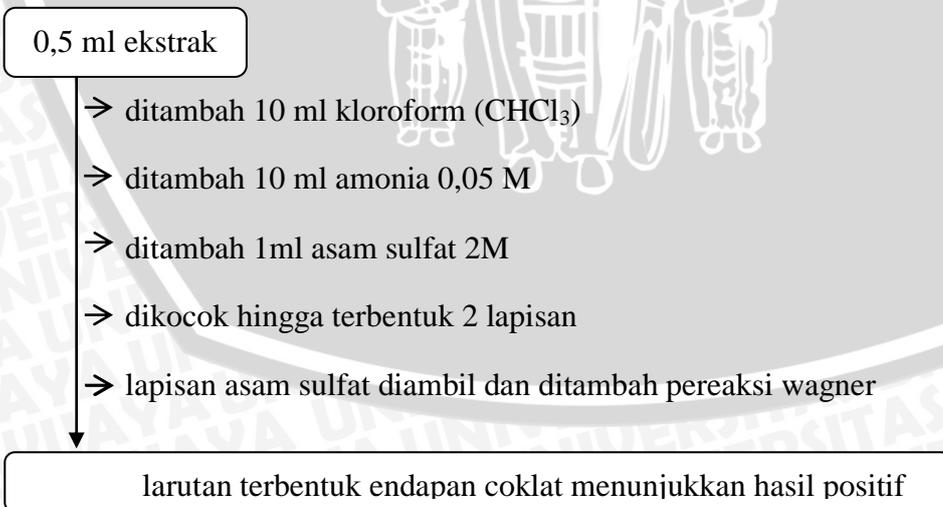
Lampiran 4.1 Flavanoid



Lampiran 4.2 Terpenoid

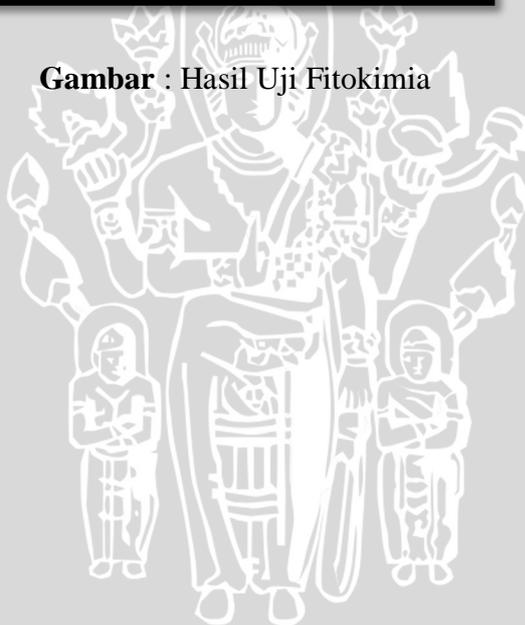


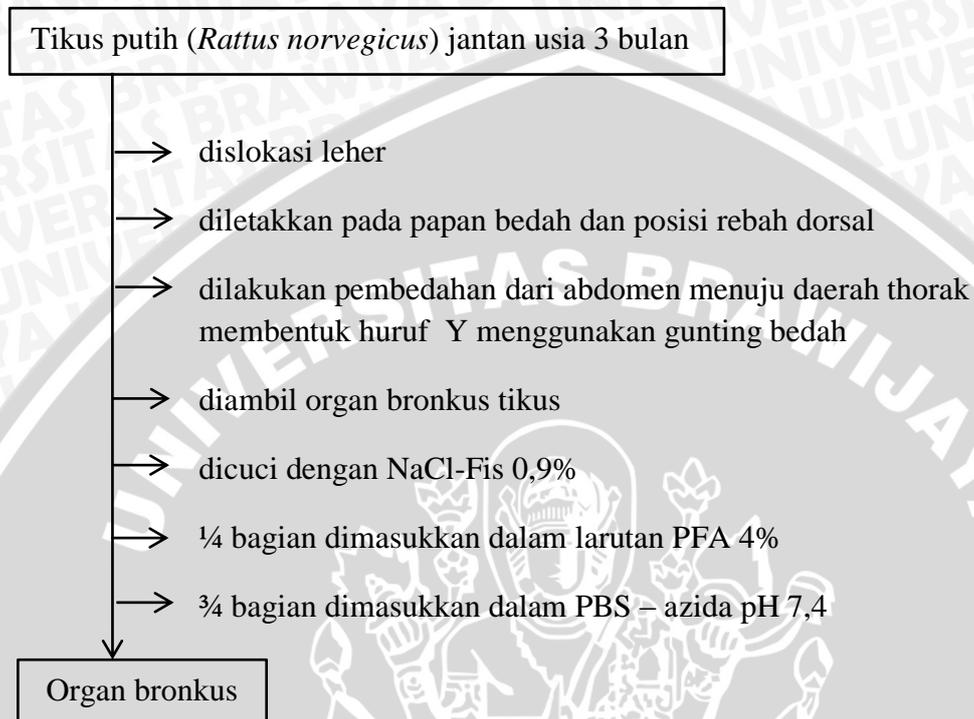
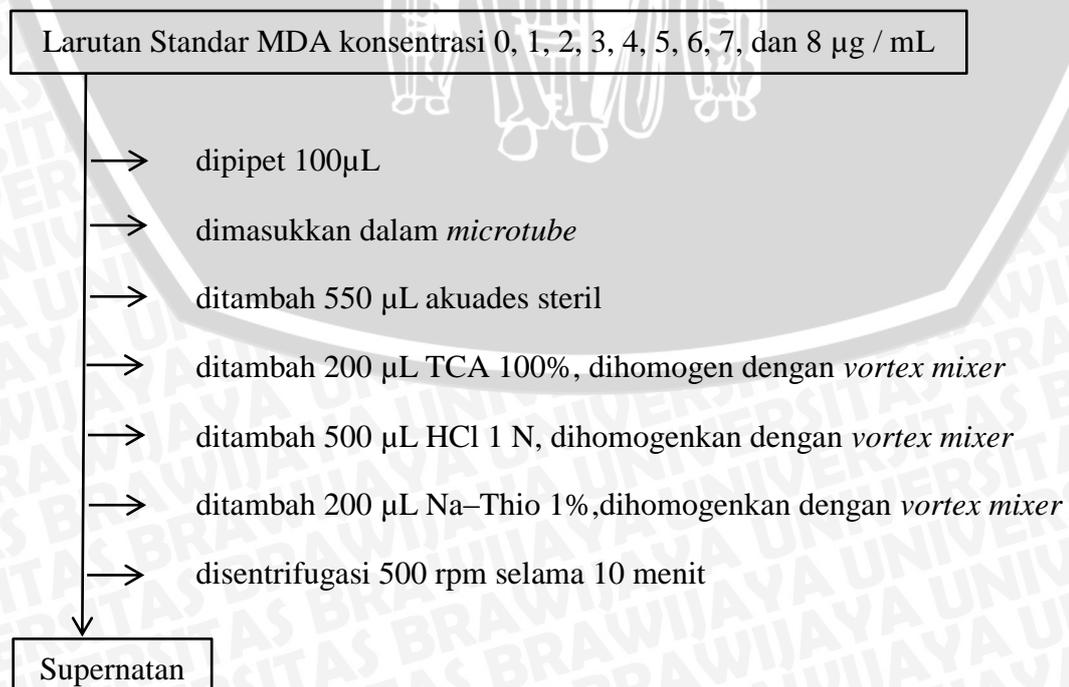
Lampiran 4.3 Alkaloid

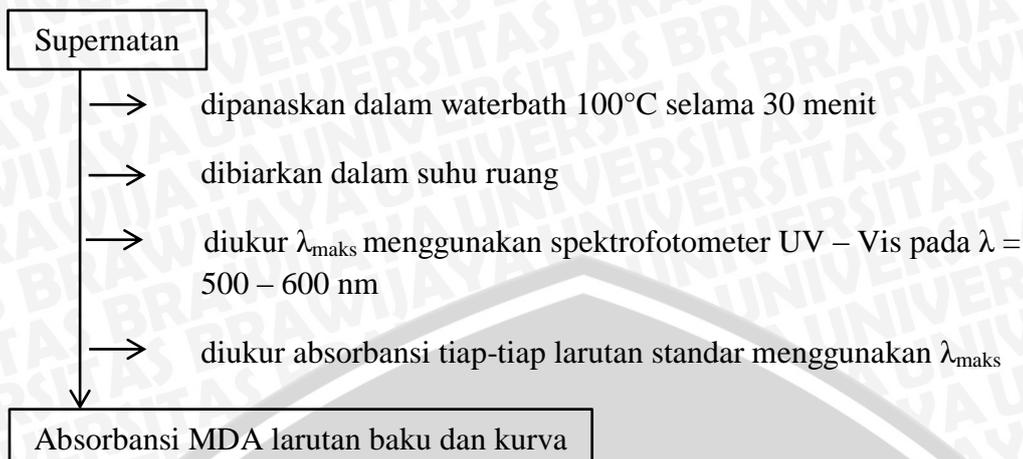




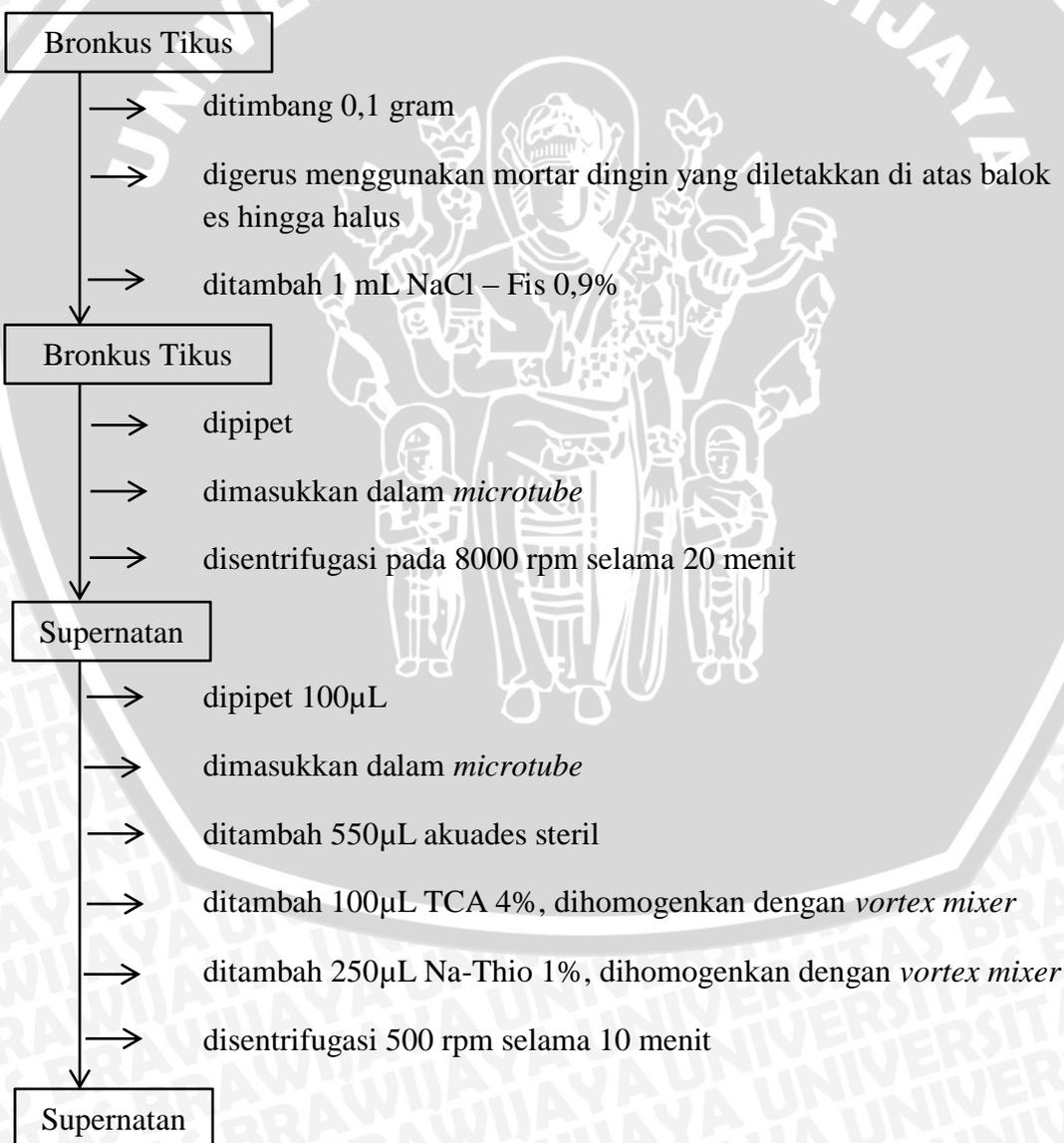
Gambar : Hasil Uji Fitokimia

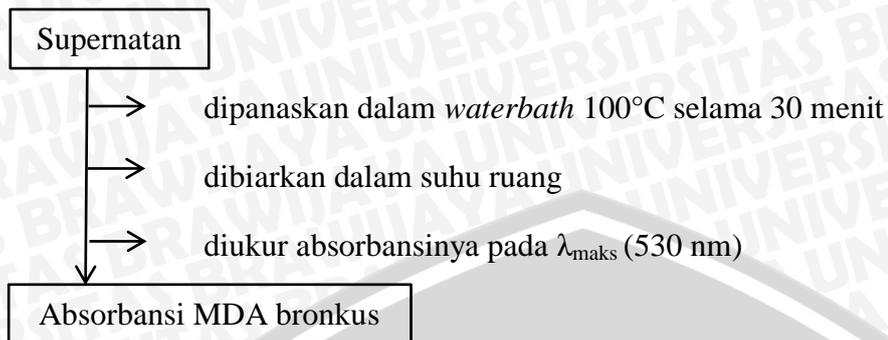


Lampiran 5. Diagram Kerja Penelitian**Lampiran 5.1** Pembedahan Hewan Coba**Lampiran 5.2** Pengukuran Kadar MDA Jaringan Brobkus**Lampiran 5.2.1** Pembuatan Kurva Baku MDA

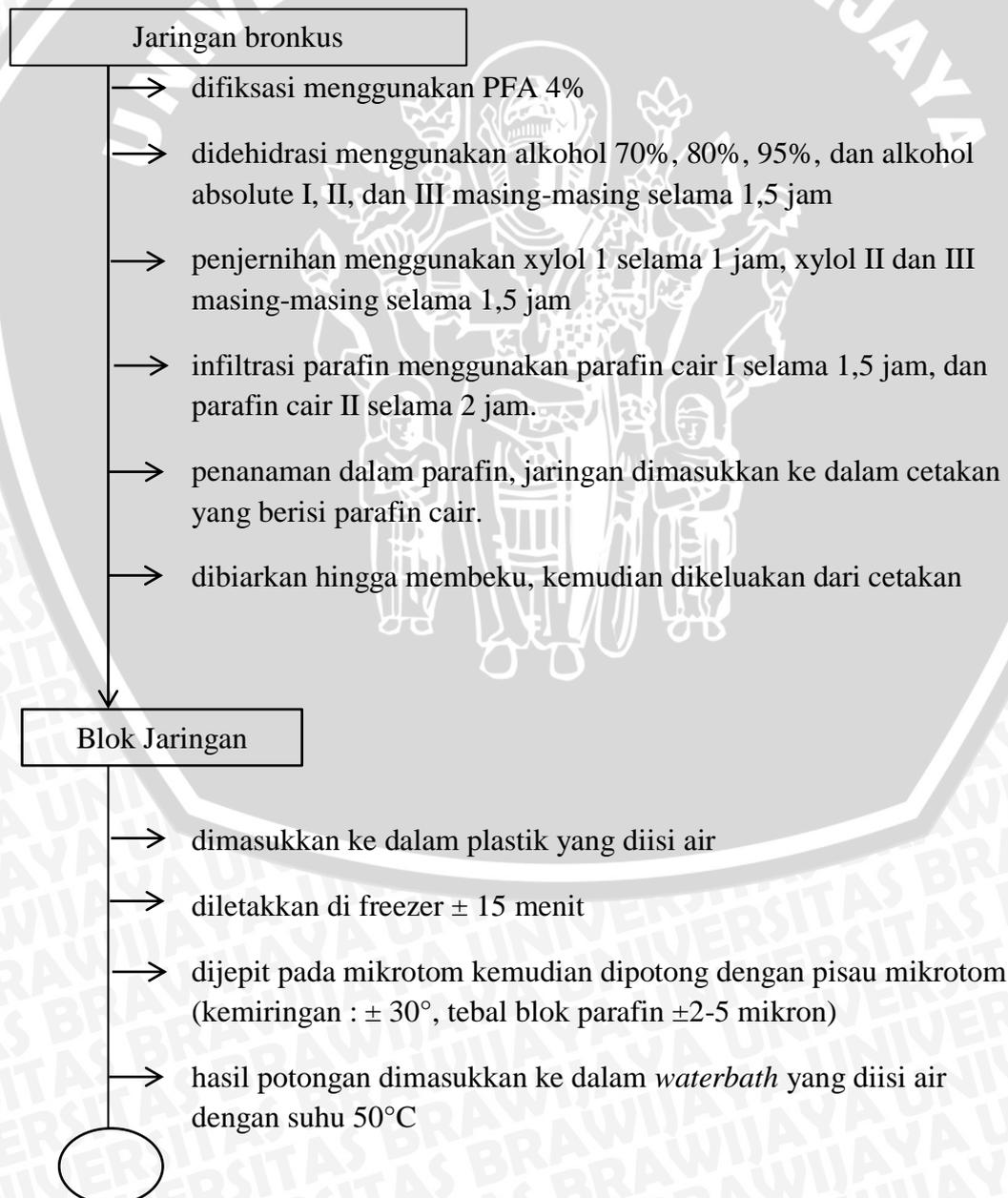


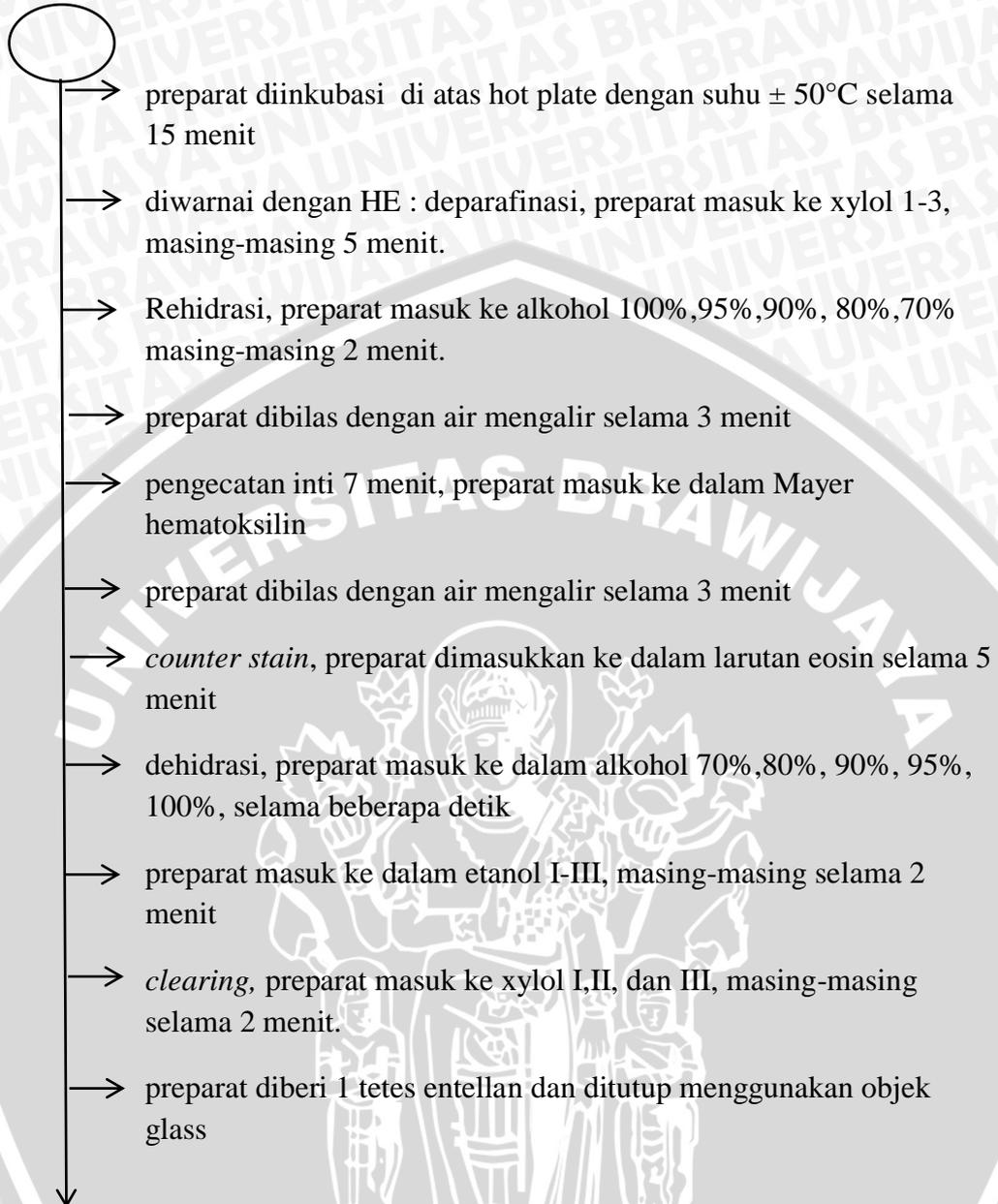
Lampiran 5.2.2 Pengukuran Kadar MDA Menggunakan Uji TBA





Lampiran 5.3 Pembuatan Preparat Histopatologi Jaringan Bronkus dengan Metode Pewarnaan HE (Hematoksilin Eosin)



- 
- preparat diinkubasi di atas hot plate dengan suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit
 - diwarnai dengan HE : deparafinasi, preparat masuk ke xylol 1-3, masing-masing 5 menit.
 - Rehidrasi, preparat masuk ke alkohol 100%,95%,90%, 80%,70% masing-masing 2 menit.
 - preparat dibilas dengan air mengalir selama 3 menit
 - pengecatan inti 7 menit, preparat masuk ke dalam Mayer hematoksilin
 - preparat dibilas dengan air mengalir selama 3 menit
 - *counter stain*, preparat dimasukkan ke dalam larutan eosin selama 5 menit
 - dehidrasi, preparat masuk ke dalam alkohol 70%,80%, 90%, 95%, 100%, selama beberapa detik
 - preparat masuk ke dalam etanol I-III, masing-masing selama 2 menit
 - *clearing*, preparat masuk ke xylol I,II, dan III, masing-masing selama 2 menit.
 - preparat diberi 1 tetes entellan dan ditutup menggunakan objek glass

Pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x

Lampiran 6. Perhitungan Pembuatan Larutan

Lampiran 6.1 Pembuatan Larutan Phospat Buffer Saline (PBS) pH 7,4

KCl sebanyak 0,1 gram, KH_2PO_4 sebanyak 0,1 gram, NaCl sebanyak 4 gram, dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebanyak 1,08 gram dicampur kemudian dilarutkan dalam 250 mL akuades steril dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* dalam gelas kimia 500 mL. pH larutan diatur 7,4 dengan larutan NaOH 1M menggunakan pH meter. Kemudian dipindahkan larutan ke dalam labu ukur 500 mL dan ditanda bataskan dengan akuades steril.

Lampiran 6.2 Pembuatan PBS – Azida

Menggunakan larutan PBS yang telah dibuat sebelumnya, larutan PBS dengan pH 7,4 sebanyak 500mL ditempatkan dalam gelas kimia, kemudian ditambah 16 tetes azida 1% (NaN_3) dengan menggunakan pipet tetes. Lalu larutan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*.

Lampiran 6.3 Pembuatan Larutan NaCl – Fis 0,9%

$$\text{NaCl-Fis \%} = \frac{0,9 \text{ gram}}{100 \text{ mL}} \times 500 \text{ mL} = 4,5 \text{ gram,}$$

Tahap pertama adalah menimbang 4,5 gram NaCl kemudian dilarutkan dalam 100 mL akuades steril dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 500mL dan ditandabatkan dengan akuades.

Lampiran 6.4 Pembuatan Larutan PFA (Paraformaldehid) 4%

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 40 \% = 1000 \text{ mL} \cdot 4\%$$

$$V_1 = 100 \text{ mL}$$

Langkah pertama yaitu membuat larutan NaCl – Fis 0,9% sebagai pelarut. Larutan PFA 4% dapat dibuat dengan mengambil 100mL PFA murni 40% dimasukkan dalam labu ukur 1000 mL dan dilarutkan dengan NaCl-Fis sampai tanda batas.

Lampiran 6.6 Pembuatan Larutan TCA

Membuat TCA 100 mL yaitu dengan menggunakan padatan TCA sebanyak 10 gram dan dilarutkan dalam akuabides dalam labu ukur 100 mL.

Lampiran 6.7 Pembuatan HCl 1 N

$$N = M e$$

$$\text{Mol} = M \times V$$

$$= 1 \times V$$

$$= 0,1 \text{ mol}$$

$$\text{Berat} = \text{mol} \times \text{BM}$$

$$= 0,1 \text{ mol} \times 36,5 \text{ g/mol}$$

$$= 3,65 \text{ gram}$$

$$\rho = 1,268 \text{ g/mL}$$

$$V = \frac{3,65 \text{ gram}}{1,268 \text{ gram/mL}} = 2,878 \text{ mL}$$

$$V = \frac{100}{37} \times 2,878 = 7,780 \text{ mL}$$

HCl 37% dipipet 7,780 ml atau 7780 μL dengan mikropipet, kemudian dimasukkan labu ukur 100 ml dan ditambahkan akuades sampai tanda batas.

Lampiran 6.8 Pembuatan Na–Thiobarbituric 1%

Pembuatan Na–Thiobarbituric acid dengan menggunakan thiobarbiburat 0,868 gram dan 0,241 gram NaOH, kemudian dilarutkan dalam akuabides dan diencerkan dalam labu takar.

Lampiran 7. Perhitungan Dosis

Dosis ekstrak :

Dengan bahan 95 gram kulit buah manggis kemudian dilakukan maserasi menghasilkan 27,6 mL

$$\text{Konsentrasi per mL} = \frac{95 \text{ gr}}{27,6 \text{ mL}} = 3,442 \text{ gr / mL} = 0,003442 \text{ mg/}\mu\text{L (kandungan dalam 1 mL)}$$

Rata – rata berat badan tikus adalah 200 gram

Jadi :

$$\text{Dosis 200} = \frac{200 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}} \times 200 \text{ mg} = 40 \text{ mg} = 0,04 \text{ gr}$$

$$\text{Dosis 400} = \frac{200 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}} \times 400 \text{ mg} = 80 \text{ mg} = 0,08 \text{ gr}$$

$$\text{Dosis 600} = \frac{200 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}} \times 600 \text{ mg} = 120 \text{ mg} = 0,12 \text{ gr}$$

Konsentrasi CEMP (*Crude Extract from Mangosteen Peel*) adalah 3,44 gr/mL dan CEMP yang harus diambil :

$$[\text{CEMP}] = 3,44 \text{ gr/ mL} = 3,44 \text{ gr/1000 } \mu\text{L}$$

$$\text{Dosis 200} = \frac{0,04 \text{ gr}}{3,44 \text{ gr}} \times 1000 \mu\text{L} = 11,63 \mu\text{L}$$

$$\text{Dosis 400} = \frac{0,08 \text{ gr}}{3,44 \text{ gr}} \times 1000 \mu\text{L} = 23,26 \mu\text{L}$$

$$\text{Dosis 600} = \frac{0,12 \text{ gr}}{3,44 \text{ gr}} \times 1000 \mu\text{L} = 34,88 \mu\text{L}$$

Pemberian dilakukan secara per oral (sonde) dalam 3 minggu, satu hari 1 ml/ekor

Pembuatan ekstrak untuk sonde dilakukan 3 hari sekali :

$$\text{Dosis 200} = 11,63 \mu\text{L} \times 12 \text{ tikus} = 139.56 \mu\text{L} \text{ (ekstrak)}$$

$$\text{Dosis 400} = 23,26 \mu\text{L} \times 12 \text{ tikus} = 279.12 \mu\text{L} \text{ (ekstrak)}$$

$$\text{Dosis 600} = 34,88 \mu\text{L} \times 12 \text{ tikus} = 401.76 \mu\text{L} \text{ (ekstrak)}$$

Pengenceran dilakukan dengan penambahan akuades :

$$\text{Dosis 200} = 12.000 \mu\text{L} - 139.56 \mu\text{L} = 11.860,44 \mu\text{L} \text{ akuades}$$

$$\text{Dosis 400} = 12.000 \mu\text{L} - 279.12 \mu\text{L} = 11.720,88 \mu\text{L} \text{ akuades}$$

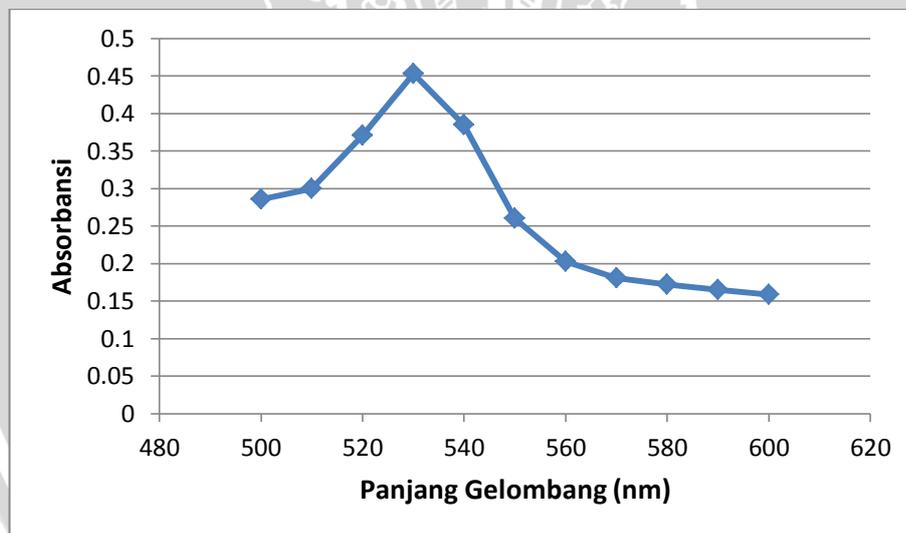
$$\text{Dosis 600} = 12.000 \mu\text{L} - 401.76 \mu\text{L} = 11.598,24 \mu\text{L} \text{ akuades}$$



Lampiran 8. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum MDA

Tabel 8.1 Absorbansi larutan standard malondialdehid 4 ppm pada berbagai panjang gelombang

λ (nm)	Absorbansi
500	0.286
510	0.3
520	0.371
530	0.453
540	0.385
550	0.26
560	0.203
570	0.181
580	0.172
590	0.165
600	0.159

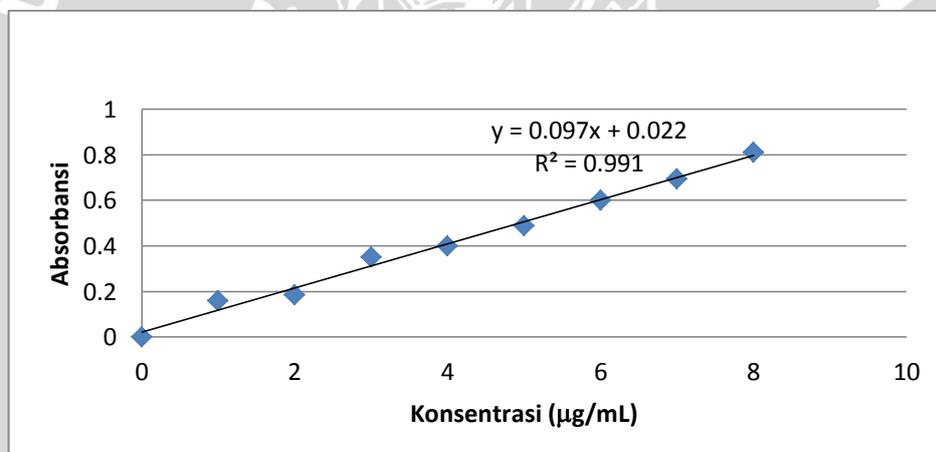


Gambar 8.1 Kurva serapan MDA

Absorbansi larutan standar MDA terbesar didapatkan pada panjang gelombang 532nm, pengukuran menggunakan larutan MDA 4 μ g/mL dengan variasi panjang gelombang. Panjang gelombang ini merupakan panjang gelombang maksimum yang digunakan untuk pengukuran absorbansi larutan standar MDA dan sampel.

Lampiran 9. Pembuatan Kurva Baku MDA**Tabel 9.1** Absorbansi Larutan Standard Malondialdehid $\lambda_{\text{maks}} = 532 \text{ nm}$ pada berbagai konsentrasi

Konsentrasi Larutan Standar ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi
0	0,000
1	0.160
2	0.184
3	0.350
4	0.401
5	0.490
6	0.600
7	0.695
8	0.811

**Gambar 10.1** Kurva Baku MDA pada $\lambda_{\text{maks}} 532 \text{ nm}$.

Lampiran 10. Absorbansi dan Konsentrasi MDA pada Bronkus

Konsentrasi MDA dapat dihitung dengan menggunakan kurva baku MDA yang sudah ada dan memasukkan data absorbansi yang didapat.

Contoh perhitungan konsentrasi MDA:

$$y = 0,097x + 0,022$$

$$0,032 = 0,097x + 0,022$$

$$x = (0,032 - 0,022) / 0,097$$

$$= 0,106 \text{ (}\mu\text{g/mL)}$$

Tikus	Absorbansi rata-rata	Kadar Malondialdehid ($\mu\text{g/mL}$)
Sehat (P0)	0.032	0.106
	0.040	0.185
	0.038	0.164
	0.033	0.109
Rerata		0.141
Sakit (P1)	0.085	0.659
	0.080	0.604
	0.076	0.561
	0.079	0.588
Rerata		0.603
Terapi 200mg/kgBB (P1)	0.066	0.455
	0.059	0.391
	0.059	0.387
	0.058	0.375
Rerata		0.402
Terapi 400mg/kgBB (P3)	0.048	0.270
	0.043	0.215
	0.045	0.242
	0.046	0.245
Rerata		0.243
Terapi 600mg/kgBB (P4)	0.040	0.190
	0.035	0.133
	0.038	0.165
	0.035	0.136
Rerata		0.156

Lampiran 11. Hasil Uji Statistika

Tabel 11.1 Uji Normalitas Data

		MDA
N		20
Normal Parameters ^a	Mean	.3090
	Std. Deviation	.18089
Most Extreme Differences	Absolute	.188
	Positive	.188
	Negative	-.131
Kolmogorov-Smirnov Z		.842
Asymp. Sig. (2-tailed)		.478

Test distribution is Normal.

Tabel 11.2 Uji Homogenitas Varian

Kadar MDA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.752	4	15	.572

(*p-value* > 0,05, yaitu 0,572)

Tabel 11.3 Uji ANOVA

ANOVA					
MDA	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.604	4	.151	130.176	.000
Within Groups	.017	15	.001		
Total	.622	19			

Tabel 11.4 Uji Tukey

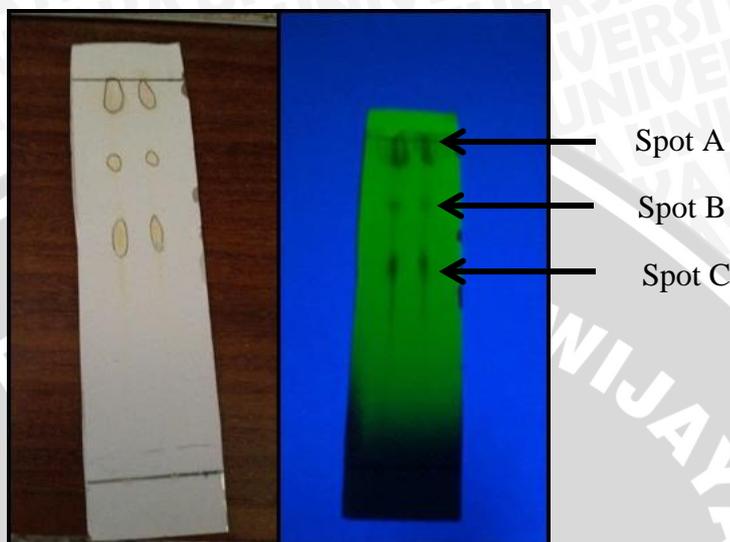
		MDA				
Perlakuan		N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Tukey	Tikus Sehat (P0)	4	.1410			
HSD ^a	Paparan+Terapi 600 (P4)	4	.1560			
	Paparan+Terapi 400 (P3)	4		.2430		
	Paparan+Terapi 200 (P2)	4			.4020	
	Tikus Sakit (P1)	4				.6030
	Sig.		.969	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.



Lampiran 12. Hasil KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dan IR pada Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L*)



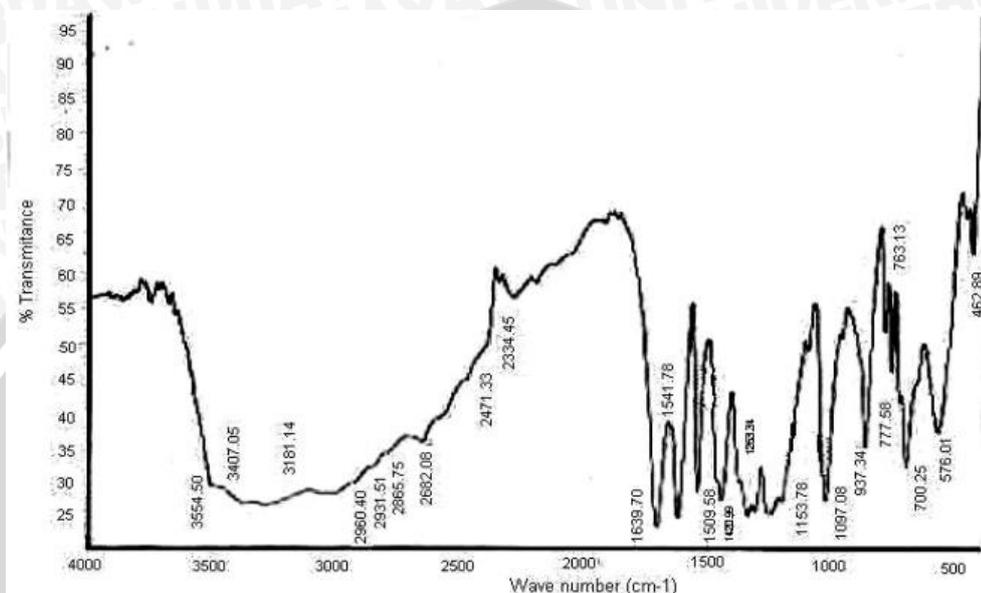
Gambar 12.1 Hasil KLT

Tabel 12.1 Nilai Rf dari masing-masing noda ekstrak etanol kulit buah manggis dengan metode KLT

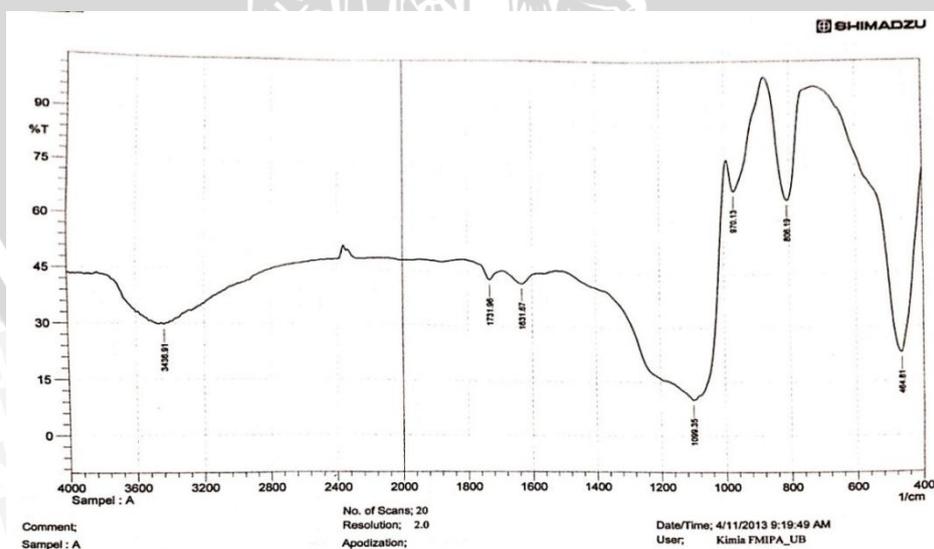
Noda	Jarak noda dari tempat gerakan awal		Nilai Rf
	Noda	Eluen	
A	4,5	8	0,56
B	6,2	8	0,77
C	7,6	8	0,95

Asam galat digunakan sebagai standar spektrum IR untuk mengkonfirmasi gugus-gugus fungsi yang terkandung. Asam galat digunakan karena memiliki kerangka dasar yang sama dengan polifenol. Standar asam galat mempunyai range spektrum dengan absorbansi berkisar antara 426,89 cm^{-1} sampai 3.554,50 cm^{-1} .

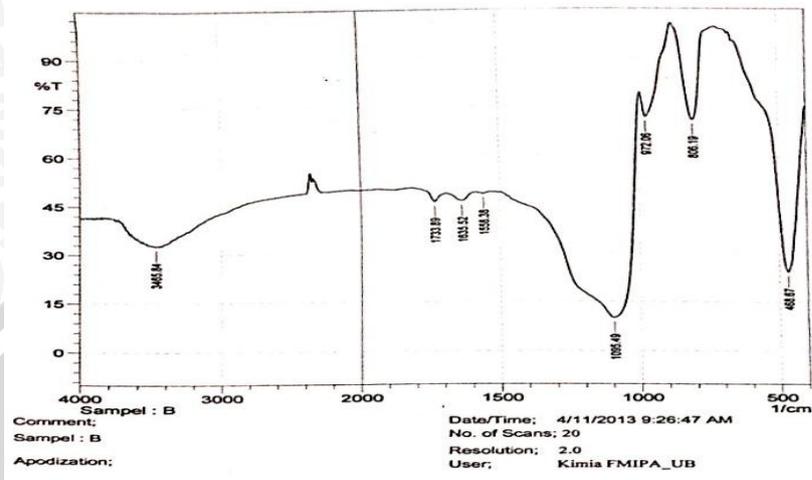
Asam galat biasanya mengandung gugus-gugus fungsi seperti O-H, C-H, C=C, dan C-O.



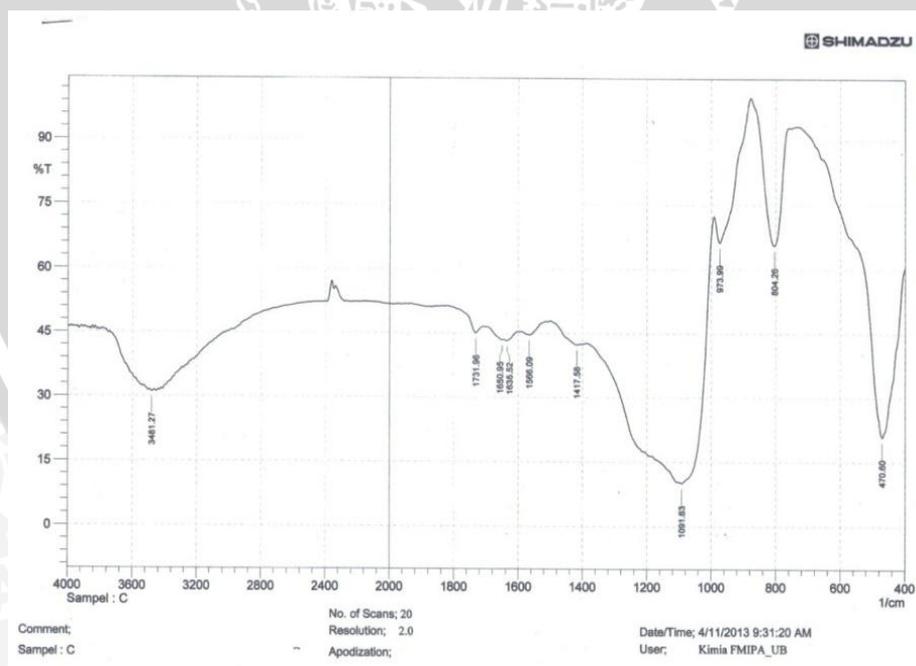
Gambar 12.2 Spektrum IR standar asam galat



Gambar 12.3 Spektrum IR node A hasil KLT ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L*)



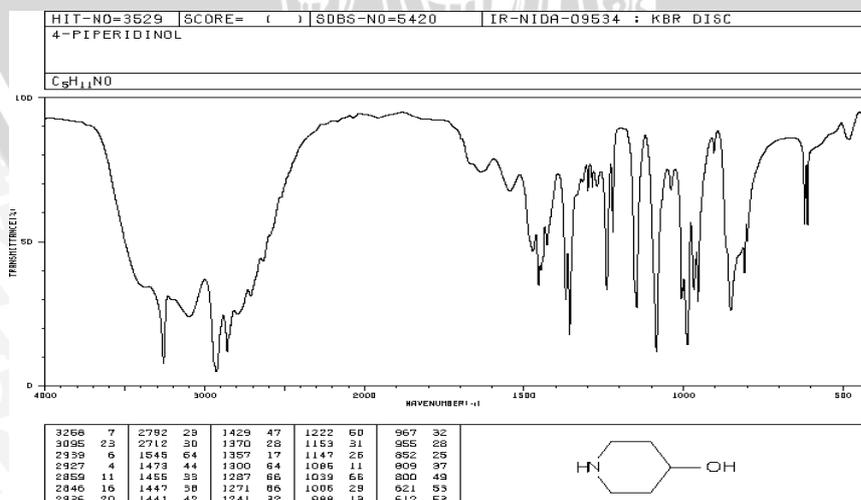
Gambar 12.4 Spektrum IR noda B hasil KLT ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*)



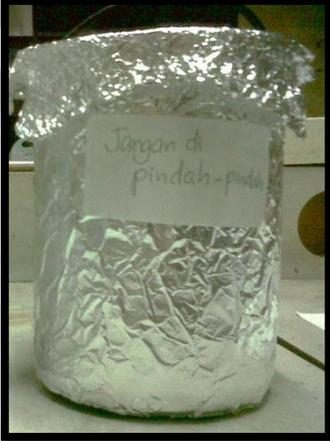
Gambar 12.5 Spektrum IR noda C hasil KLT ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*)

Tabel 12.2 Interpretasi serapan Infra Merah (IR) Sampel dan Standar

No.	Bilangan gelombang (cm ⁻¹)			Standar Asam Galat (Meenakshi, et al., 2009)	Reference (Sastrohami djojo, 1992)	Interpretasi
	Noda A	Noda B	Noda C			
1.	3.436,91	3.495,86	3.481,27	3.407,05 3.554,50	3200-365	O-H (alkohol, fenol)
2.	-	-	-	2.960,40 2.931,51 2.865,75	2.850-3.000	C-H alifatik
3.	1.731,96	1.733,89	1.731,96	-	1.705-1.750	C=O aldehida, keton, asam karboksilat dan ester
4.	1.631,67		1.650,95	1.639,70	1.600-1.680	C=C alkena
5.		1.635,52	1.636,52	1.509,58	1.475-1.600	C=C aromatik
6.		1.558,38	1.566,09	1.420,99	1.370-1.465	C-H alifatik
7.	1.099,35	1.095,49	1.417,58 1.091,63	1.153,78 1.097,08	1.000-1.300 1020-1150	C-O (alkohol, eter, ester, asam karboksilat) C-N amina
8.	806,19	806,19	804,26	777,58 763,13	690-900	C-H aromatik

**Gambar 12.6** Spektrum IR standar 4-piperidiniol

Lampiran 13. Dokumentasi Penelitian

	
<p>Tempat pengasapan untuk hewan coba</p>	<p>Alat bantu berupa spuit untuk pengasapan</p>
	
<p>Kandang pemeliharaan untuk hewan coba</p>	<p>Ransum pakan untuk hewan coba</p>
	
<p>Maserasi menggunakan etanol 50%</p>	<p>Proses penyaringan setelah maserasi</p>



Pemberian terapi dilakukan secara per oral (sonde)



Preparasi sebelum bedah



Ekstrak etanol kulit buah manggis



Terapi ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*)