

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL KULIT
MANGGIS (*Garcinia mangostana linn*) TERHADAP PROFIL
PROTEIN DAN AKTIVITAS PROTEASE JARINGAN
BRONKUS TIKUS (*Rattus norvegicus*)
HASIL PAPARAN ASAP ROKOK**

SKRIPSI

Oleh :
Wisdiani Putri P.
105130101111083



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL KULIT
MANGGIS (*Garcinia mangostana linn*) TERHADAP PROFIL
PROTEIN DAN AKTIVITAS PROTEASE JARINGAN
BRONKUS TIKUS (*Rattus norvegicus*)
HASIL PAPARAN ASAP ROKOK**

SKRIPSI

Sebagai syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :
Wisdiani Putri P.
105130101111083



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Manggis (*Garcinia mangostana linn*) Terhadap Profil Protein Dan Aktivitas Protease Jaringan Bronkus Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Paparan Asap Rokok

Oleh :
WISDIANI PUTRI P.
105130101111083

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 16 Agustus 2014
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 1898802 2 001

Dyah Kinasih Wuragil, S.Si, MP.M.Sc

NIP. 19820914 200912 2 004

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

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 1898802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Wisdiani Putri P
NIM : 105130101111083
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Manggis (*Garcinia mangostana liin*) Terhadap Profil Protein dan Aktivitas Protease Jaringan Bronkus Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Paparan Asap Rokok

Dengan ini menyatakan :

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, 16 Agustus 2014
Yang menyatakan,

Wisdiani Putri P.
NIM. 105130101111083

repository.ub.ac.id

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Manggis (*Garcinia mangostana linn*) Terhadap Profil Protein dan Aktivitas Protease Jaringan Bronkus Tikus (*Rattus norvegicus*)
Hasil Paparan Asap Rokok**

ABSTRAK

Asap rokok mengandung radikal bebas yang dapat menimbulkan efek pada saluran pernapasan salah satunya adalah bronkitis. Bronkitis adalah suatu peradangan pada bronkus yang disebabkan oleh asap rokok, polusi udara, debu, dan gas beracun. Kulit buah manggis diketahui mengandung xanton yang berfungsi sebagai antioksidan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana linn*) terhadap profil protein dan aktivitas protease pada bronkus tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terpapar asap rokok. Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus yang dikelompokkan menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol (P0), kelompok positif (P1) diberi paparan asap rokok, kelompok P2, P3 dan P4 adalah kelompok yang diberi paparan asap rokok kemudian diberi terapi ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 600 mg/kgBB. Paparan asap rokok 2 batang/hari/kelompok dilakukan selama 1 bulan. Karakterisasi profil protein dilakukan dengan menggunakan SDS-PAGE dan dianalisis secara semikuantitatif sedangkan aktivitas protease diukur dengan metode spektrofotometri dan dianalisis secara kuantitatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol kulit manggis mampu memperbaiki profil protein pada kelompok tikus terapi sama seperti pada kelompok kontrol yang memiliki pita protein dengan berat molekul 91 kDa dan 26 kDa. Pada kelompok tikus terpapar asap rokok muncul pita protein dengan berat molekul 79 kDa, 62 kDa, 49 kDa, 42 kDa, dan 23 kDa. Terapi ekstrak etanol kulit manggis secara signifikan ($p > 0,05$) menurunkan aktivitas protease sebesar 18,16%, 38,58% dan 64,24% secara berturut-turut pada dosis terapi 200mg/kgBB, 400mg/kgBB dan 600mg/kgBB. Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian terapi ekstrak etanol kulit manggis dapat memperbaiki profil protein dan menurunkan aktivitas protease jaringan bronkus tikus yang dipapar asap rokok.

Kata kunci : Asap rokok, Bronkitis, Ekstrak etanol kulit manggis, Profil protein, Aktivitas protease

**Effect of Mangosteen Peel (*Garcinia mangostana* Linn) Ethanol Extract
On Protein Profile and Protease Activity Of
Bronchial Tissue in Rats (*Rattus norvegicus*)
Exposed to Cigarette Smoke**

ABSTRACT

Cigarette smoke contains of free radicals that causes harmful effect on the respiratory tract, such as bronchitis. Bronchitis is an inflammation of the bronchi caused by cigarette smoke, air pollution, dust, and toxic gases. Mangosteen peel has been known contain of xanton which play a role as an antioxidant. It has capability to neutralize oxidants derived from cigarette smoke. The purpose of this study was to determine the effect of mangosteen peel ethanol extract (*Garcinia mangostana* Linn) towards protein profile and protease activity in rat (*Rattus norvegicus*) bronchi which exposed with cigarette smoke. This research used 5 groups of rats: control group (P0), the positive group (P1) with exposed to cigarette smoke, group P2, P3 and P4 exposed to cigarette smoke and then were treated with ethanol extract of mangosteen peel dose of 200 mg/kgBW, 400 mg/kgBW and 600 mg/kgBW, respectively. Exposure of cigarette smoke 2 cigarettes / day / group were conducted for 1 month. Characterization of protein profil conducted by SDS PAGE then semiquantitatively analyzed whereas protease activity was measured by spectrophotometry method and quantitatively analyzed. The results showed that the mangosteen peel ethanol extract was able to improve the profile of proteins in a group of rat the same treatment as the control group who had a protein band with a molecular weight of 91 kDa and 26 kDa. In the group of rats exposed to cigarette smoked appears protein bands with molecular weight of 79 kDa, 62 kDa, 49 kDa, 42 kDa and 23 kDa. Mangosteen peel therapy of ethanol extract significantly ($p>0.05$) lowered protease activity to be 18.16%, 38.58% and 64.24% with dose of 200 mg/kgBW, 400 mg/kgBW and 600 mg/kgBW, respectively. The conclusions of this research were the mangosteen peel ethanol extract therapy could improve protein profile and decrease protease activity in rat bronchial tissues exposed to cigarette smoke.

Keywords : Cigarette smoke, Bronchitis, Mangosteen peel ethanol extract, Protein profile, Protease activity.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir/skripsi yang berjudul **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Manggis (*Garcinia mangostana linn*) Terhadap Profil Protein Dan Aktifitas Protease Jaringan Bronkus Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Paparan Asap Rokok”**. Penelitian ini merupakan bagian dari payung penelitian yang diketuai oleh Prof. Dr. Aulanni’am, drh. DES, serta merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan.

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

1. Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES selaku Pembimbing I atas segala bimbingan, bantuan, kesabaran, nasehat, waktu dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
2. Ibu Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc selaku Pembimbing II atas segala bimbingan, kesabaran, nasehat, arahan dan waktu yang diberikan kepada penulis.
3. Drh. Dyah Ayu Oktavianie, M. Biotech selaku Penguji I dan Drh. Ani Setianingrum selaku Penguji II yang telah banyak memberikan saran dan kritik yang membangun kepada penulis.
4. Dr. Agung Pramana Warih M., MS selaku Ketua Program Kedokteran Hewan universitas Brawijaya atas kepemimpinan dan fasilitas yang telah diberikan.
5. Bapak Nabel Ahmed A. Mansour yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk turut serta dalam payung penelitian.
6. Kepala Laboratorium Biokimia, Laboratorium Biomolekuler dan Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas MIPA UB, laboran, staff pegawai, asisten khususnya mbak Vivi Shofia, mbak Rizka Nizar, mas Dliya’

Elhaq, mbak Anita dan Pak Har atas bantuan yang telah diberikan kepada penulis selama melaksanakan penelitian.

7. Keluarga tercinta Bapak Drh. Budiono, Ibu Drh. Rosmiati Wisindie dan Kakak Anindita Ayu P. yang telah memberikan doa, kasih sayang dan dukungan yang sangat luar biasa kepada penulis selama menimba ilmu di Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
8. Teman seperjuangan Yusrina Suhartiningsih, Fitriya Ramadhany, Rinta Nur Armidha, Friski Rosandi dan Berlya Putri atas bantuan, inspirasi dan semangatnya dalam menyelesaikan penelitian ini.
9. Seluruh sahabat angkatan 2010 terutama kelas C “COMPAC”, serta sahabat lainnya yang tidak bisa disebutkan satu persatu atas segala perhatian, semangat, motivasi, kebersamaannya dan doanya yang telah diberikan kepada penulis.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, maka saran dan kritik dari semua pihak sangat diharapkan demi penyempurnaan selanjutnya.

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, Agustus 2014

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---|----------------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PENGESAHAN | ii |
| HALAMAN PERNYATAAN | iii |
| ABSTRAK | iv |
| ABSTRACT | v |
| KATA PENGANTAR | vi |
| DAFTAR ISI | viii |
| DAFTAR TABEL | x |
| DAFTAR GAMBAR | xi |
| DAFTAR LAMPIRAN | xii |
| DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG | xiii |
| BAB 1 PENDAHULUAN | |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 4 |
| 1.3 Batasan Masalah | 4 |
| 1.4 Tujuan Penelitian | 5 |
| 1.5 Manfaat Penelitian | 5 |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA | |
| 2.1 Rokok | 6 |
| 2.2 Bronkitis | 7 |
| 2.3 Manggis (<i>Garcinia mangostana</i> Linn)..... | 9 |
| 2.4 Enzim Protease | 12 |
| 2.5 SDS-PAGE | 13 |
| BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN | |
| 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian | 16 |
| 3.2 Hipotesis Penelitian | 18 |
| BAB 4 METODE PENELITIAN | |
| 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian | 19 |
| 4.2 Alat dan Bahan Penelitian | 19 |
| 4.3 Tahapan Penelitian | 20 |
| 4.4 Prosedur Penelitian | 20 |
| 4.4.1 Rancangan Penelitian dan Variabel Penelitian | 21 |
| 4.4.2 Persiapan Hewan Percobaan | 22 |
| 4.4.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Manggis | 22 |
| 4.4.4 Persiapan Hewan yang Dipapar Asap Rokok | 23 |
| 4.4.5 Persiapan Hewan Terapi | 24 |
| 4.4.6 Pengambilan Organ Bronkus | 24 |
| 4.4.7 Isolasi Protein | 25 |
| 4.4.8 Pengukuran Aktivitas Protease | 25 |
| 4.4.9 Pemisahan dan Karakterisasi Protein | 27 |
| 4.4.10 Profil Protein Hasil SDS-PAGE..... | 27 |
| 4.4.11 Analisis Data | 27 |
| BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN | |
| 5.1 Gambaran Profil Protein Bronkus Tikus Putih..... | 28 |
| 5.2 Aktivitas Protease Bronkus Tikus Putih..... | 33 |
| BAB 6 PENUTUP | |

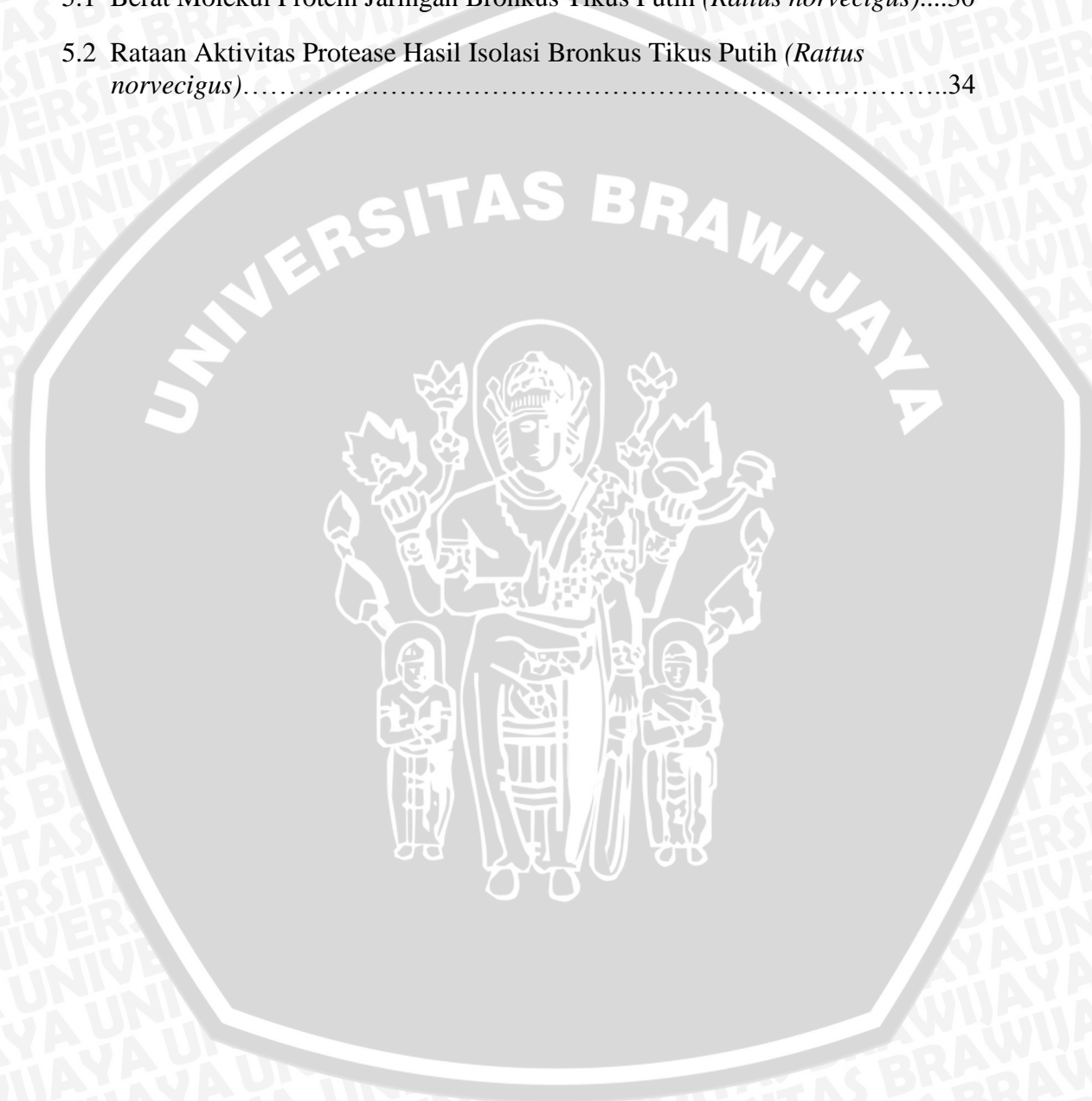


| | |
|-----------------------------|-----------|
| 6.1 Kesimpulan..... | 39 |
| 6.2 Saran..... | 39 |
| DAFTAR PUSTAKA | 40 |
| LAMPIRAN | 46 |



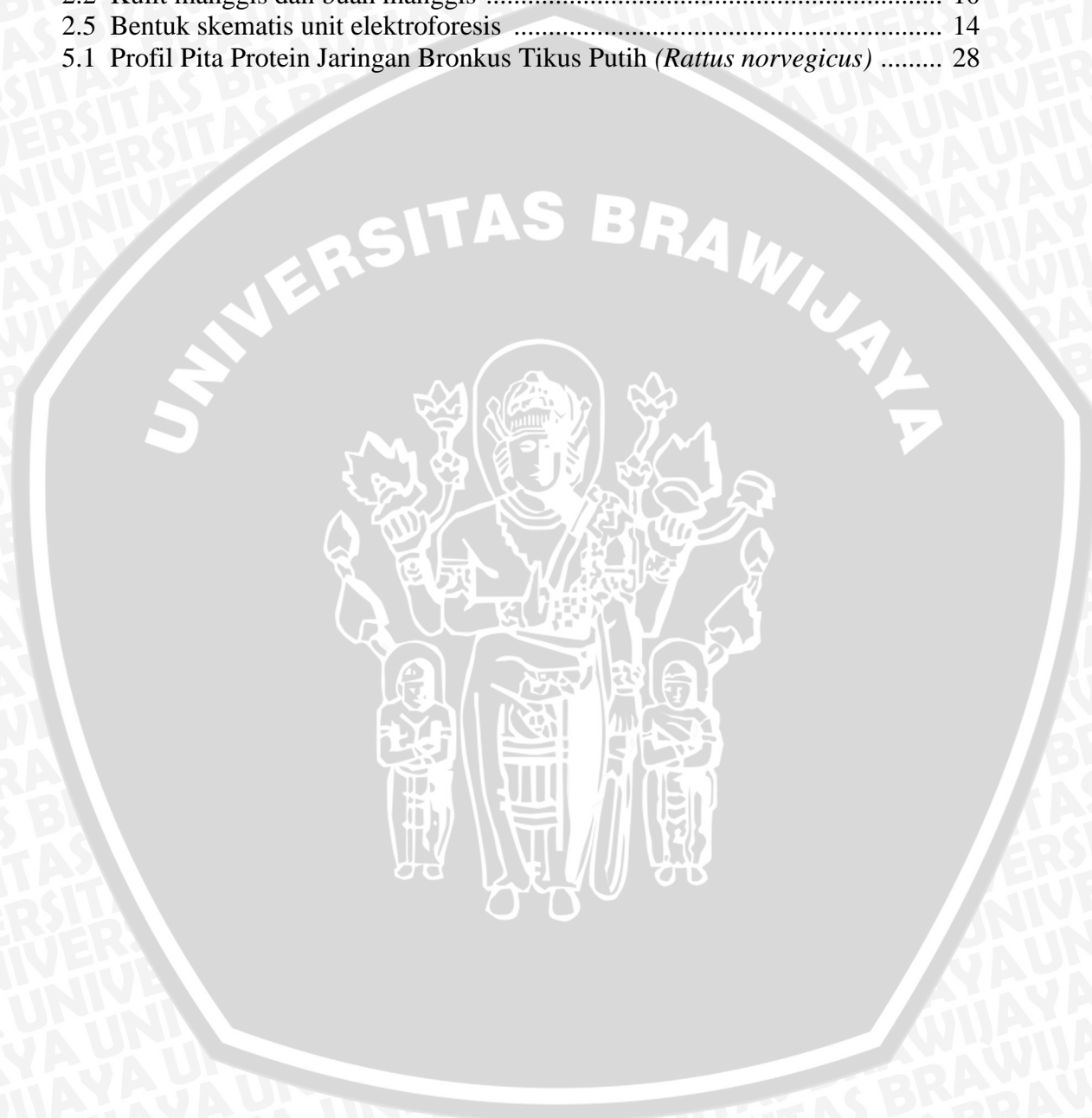
DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|---|---------|
| 4.1 Kelompok Perlakuan Penelitian..... | 20 |
| 5.1 Berat Molekul Protein Jaringan Bronkus Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).... | 30 |
| 5.2 Rataan Aktivitas Protease Hasil Isolasi Bronkus Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)..... | 34 |



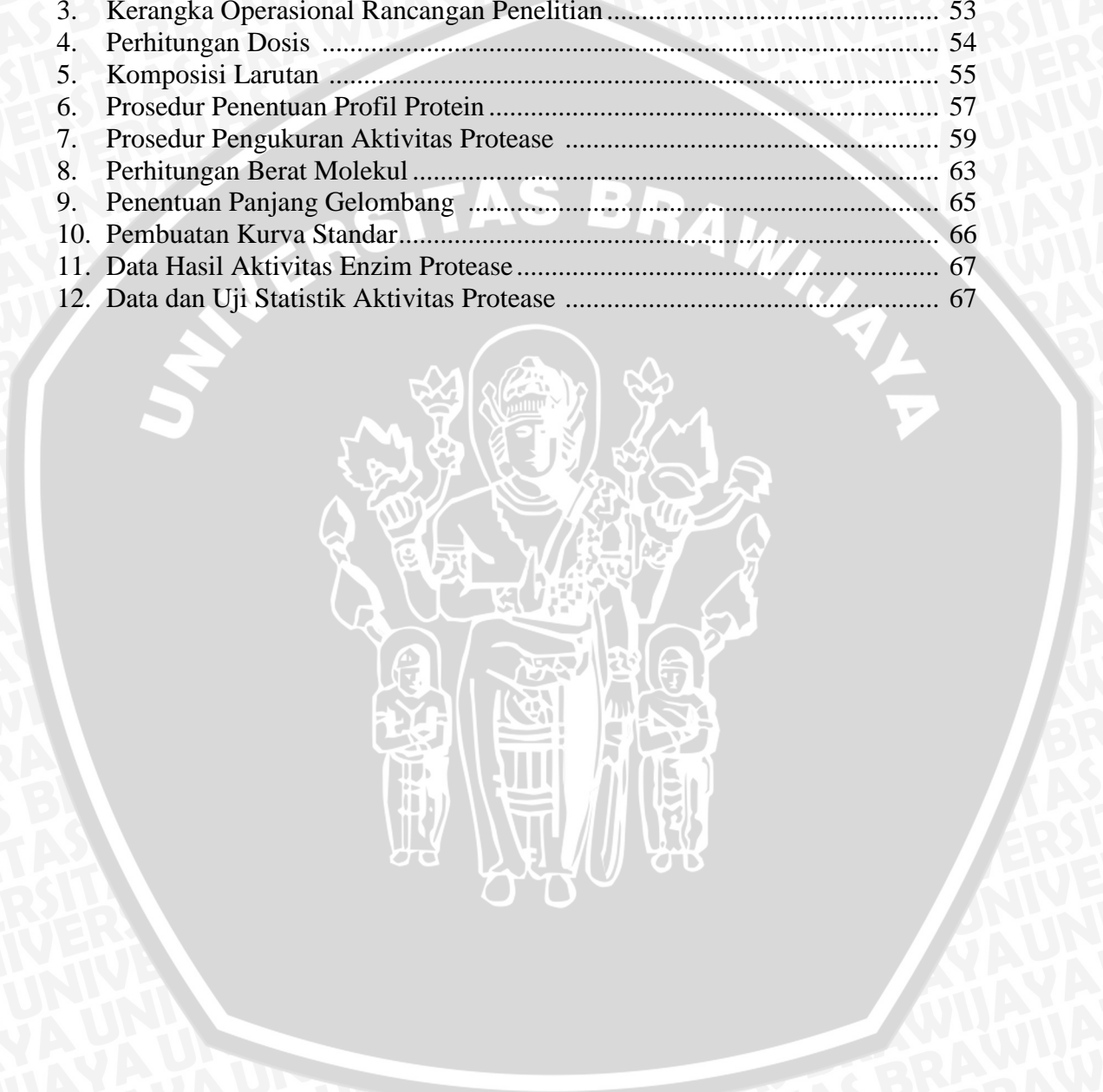
DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|---|---------|
| 2.1 Bronkus normal dibandingkan dengan bronkus yang mengalami bronkitis.. | 9 |
| 2.2 Kulit manggis dan buah manggis | 10 |
| 2.5 Bentuk skematis unit elektroforesis | 14 |
| 5.1 Profil Pita Protein Jaringan Bronkus Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) | 28 |



DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|---|----------------|
| 1. Sertifikat Laik Etik | 46 |
| 2. Hasil Uji LCMS | 47 |
| 3. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian | 53 |
| 4. Perhitungan Dosis | 54 |
| 5. Komposisi Larutan | 55 |
| 6. Prosedur Penentuan Profil Protein | 57 |
| 7. Prosedur Pengukuran Aktivitas Protease | 59 |
| 8. Perhitungan Berat Molekul | 63 |
| 9. Penentuan Panjang Gelombang | 65 |
| 10. Pembuatan Kurva Standar | 66 |
| 11. Data Hasil Aktivitas Enzim Protease | 67 |
| 12. Data dan Uji Statistik Aktivitas Protease | 67 |



DAFTAR SINGKATAN

| | |
|------------------|--|
| AAT | : Alfa1-antitripsin |
| ANOVA | : Analysis Of Variance |
| APS | : Ammonium persulphate |
| BM | : Berat Molekul |
| BNT | : Berat Nyata Terkecil |
| EGFR | : Epidermal Growth Factor Receptor |
| COX-2 | : Siklooksigenase 2 |
| GH | : Growth Hormon |
| HCl | : Hidrogen klorida |
| IL-8 | : Interleukin 8 |
| IL-14 | : Interleukin 14 |
| INF | : Interferon |
| JAK 2 | : Janus Kinase 2 |
| kg/BB | : kilogram per Berat Badan |
| LGB | : Lower Gel Buffer |
| LTB4 | : Leukotriene B4 |
| µl | : Mikroliter |
| ml | : Milliliter |
| mg | : miligram |
| MMPs | : Matrix Metalloproteinase |
| NaN ₃ | : Sodium azida |
| NaCl | : Natrium klorida |
| NaOH | : Natrium hidroksida |
| (NF-κb) | : nuclear factor-κb |
| nm | : nanometer |
| OH | : Radikal hidroksil |
| O ₂ | : Radikal superoksida |
| PBS | : Phospat Buffer Saline |
| PFA | : Formaldehid |
| PGE 2 | : Prostaglandin E2 |
| ppm | : part per million |
| PPOK | : Penyakit Paru Obstruksi Kronik |
| RAL | : Rancangan Acak Lengkap |
| ROS | : Reactive Oxygen Spesies |
| rpm | : revolusi per menit |
| RSB | : Reducing Sample Buffer |
| SDS-PAGE | : Sodium Duodecyl Sulphate – Polyacrilamid Gel Electrophoresis |
| STAT | : Signal Transducers and Activator of Transcription |
| TCA | : tri chloroacetic acid |
| TEMED | : N,N,N',N' - tetramethyl ethylene diamine |
| UGB | : Upper Gel Buffer |
| WHO | : World Health Organization |

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Merokok merupakan suatu kebiasaan yang dapat membahayakan diri sendiri dan orang-orang yang berada disekitar. Merokok tidak menyebabkan kematian secara langsung, tetapi dapat memicu suatu penyakit sehingga dapat mendorong munculnya penyakit (Sitepoe, 2000). WHO memperkirakan jumlah perokok di dunia mencapai 1,3 milyar orang. Sebanyak 70% dari seluruh jumlah perokok berada pada negara berkembang (Depkes RI, 2005). Di Indonesia, 57.563.866 penduduk dewasa adalah perokok. Hal ini menjadikan Indonesia sebagai negara konsumen rokok tertinggi kelima di dunia (Benowitz, 2010)

Rokok merupakan produk berbahaya dan adiktif karena asap pada sebatang rokok mengandung berbagai bahan kimia tidak kurang dari 4000 bahan berbahaya dan 43 senyawa diantaranya bersifat karsinogenik (Afriansyah, 2001). Asap rokok mengandung tiga macam bahan kimia berbahaya diantara yaitu tar, karbonmonoksida, dan nikotin. Zat nikotin inilah yang dapat menyebabkan ketergantungan. Asap rokok dapat memicu terbentuknya radikal bebas dalam tubuh (Yuniarti dan Ali, 2004). Bahan yang terkandung dalam asap rokok dapat mengganggu sistem enzimatis dalam tubuh khususnya enzim protease karena bahan yang terkandung dalam asap rokok akan terikat pada protein dan enzim protease sehingga akan mengganggu aktivitas enzim protease. Rokok mengandung 10^4 radikal bebas dalam satu kali hisapan yang akan masuk ke dalam tubuh dan akan bertahan dalam waktu yang relatif lama, dapat mengakibatkan diantaranya

kanker paru, kanker saluran perapasan atas, penyakit jantung, *stroke*, bronkitis, emfisema, dan lain-lain.

Bronkitis merupakan suatu peradangan pada bronkus. Penyakit ini biasanya bersifat ringan dan pada akhirnya akan sembuh sempurna. Penderita yang memiliki penyakit menahun (misalnya penyakit jantung atau penyakit paru-paru) dan pada usia lanjut, bronkitis bisa bersifat serius. Penyebab bronkitis antara lain perokok, asap rokok, polusi udara, debu, dan gas beracun di tempat kerja (Arif, 2008). Asap rokok yang terhirup akan menyebabkan iritasi pada saluran napas sehingga menyebabkan terjadinya inflamasi dan hipersekresi mukus. Kelenjar mensekresi mukus dan mukus yang diproduksi meningkat, hal itu juga menyebabkan sel goblet meningkat karena sel goblet merupakan sel penghasil mukus dan terjadi penurunan fungsi silia. Fungsi silia adalah untuk menahan dan mengeluarkan kotoran dan debu yang masuk bersama udara. Hipersekresi mukus menyebabkan penyempitan dan penyumbatan pada bronkus (Manurung, 2008).

Bronkitis tidak hanya terjadi pada perokok aktif namun juga perokok pasif. Kejadian pada hewan bisa menyerang pada kucing yang dipelihara di lingkungan perokok, dapat menyerang kucing segala usia dengan penyakit peradangan kronis pada saluran respirasi. Apabila tidak diobati, dapat menyebabkan fibrosis pada paru dan akan terjadi atelektasis. Pada keadaan bronkitis terjadi perubahan aktivitas protease sehingga nantinya akan mempengaruhi profil protein.

Terapi untuk bronkitis pada saat ini yaitu menggunakan bronkodilator dan kortikosteroid inhalasi. Bronkodilator merupakan obat pertama yang dipilih untuk menangani gejala Penyakit Paru Obstruktif Kronik (PPOK). Bronkodilator

dianjurkan sebagai pencegahan atau mengurangi gejala yang akan timbul dari PPOK namun obat ini kurang efektif dalam terapi bronkitis (Sonia *et al.*, 2006; Tashkin *et al.*, 2004). Penggunaan kortikosterooid inhalasi dapat mengurangi gejala, meningkatkan fungsi paru, dan menurunkan frekuensi eksaserbasi namun apabila pemberiannya dihentikan secara tiba-tiba akan menyebabkan eksaserbasi sehingga tidak bisa direkomendasikan untuk jangka panjang (Singh *et al.*, 2002).

Berdasarkan hal tersebut maka pengobatan bronkitis mengarah pada terapi herbal yang berasal dari tanaman karena lebih aman dan efektif (Sheff, 2002). Kulit manggis dipilih untuk terapi bronkitis karena manggis mudah ditemui terutama di Asia Tenggara termasuk di Indonesia. Sedangkan kulit manggis awalnya hanya sebagai limbah dan tidak dimanfaatkan, tetapi sebenarnya kulit manggis memiliki banyak manfaat. Menurut Moongkarndi *et al.*, (2004) menyatakan bahwa kulit manggis mengandung antioksidan dan senyawa lainnya yang dapat digunakan sebagai antiinflamasi, antihistamin, pengobatan penyakit jantung, antibakteri, antijamur. Menurut, Ho *et al.*, (2002), Jung *et al.*, (2006), senyawa berkhasiat yang terkandung dalam kulit manggis antara lain senyawa alfa-mangostin, gamma-mangostin, flavonoid, xanton, tannin dan antosianin. Alfa-mangostin memiliki aktivitas antioksidan dan penangkal radikal bebas (William *et al.*, 1995).

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mempelajari tentang pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana linn*) terhadap profil protein dan aktivitas protease dari jaringan bronkus tikus (*Rattus norvegicus*) yang terpapar asap rokok.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, didapatkan rumusan masalah yang akan dibahas dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah terdapat perubahan profil protein pada bronkus tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terpapar asap rokok setelah pemberian ekstrak etanol kulit manggis?
2. Apakah terdapat penurunan aktivitas protease pada jaringan bronkus tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terpapar asap rokok setelah pemberian ekstrak etanol kulit manggis?

1.2 Batasan Masalah

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

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan umur 3 bulan berat badan 200 gram yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Gadjah Mada (UPHP UGM). Penggunaan hewan coba telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No: 187-KEP-UB.
2. Pemaparan asap rokok dengan menggunakan rokok filter yang diberikan pada hewan coba dilakukan setiap hari 2 batang rokok setiap kelompok tikus dalam jangka waktu 1 bulan dengan *smoking pump* (Mansour, 2013).
3. Ekstrak etanol kulit manggis diperoleh dengan cara ekstraksi etanol (Mansour, 2013) dan diberikan secara oral dengan sonde sebanyak 1

ml/hari/tikus selama 21 hari dengan dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 600 mg/kgBB. Manggis didapatkan dari UPT Materia Medica Batu.

4. Karakterisasi Profil protein dengan menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate - Poly Acrilamide Gel Electrophoresis*) dan Pengukuran aktivitas protease dengan menggunakan metode Spektrofotometri.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui profil protein pada bronkus tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terpapar asap rokok setelah pemberian ekstrak etanol kulit manggis.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit manggis terhadap aktivitas protease pada jaringan bronkus tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terpapar asap rokok.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan pada penelitian ini adalah dapat digunakan sebagai kajian ilmiah tentang manfaat ekstrak etanol kulit manggis sebagai bahan terapi penyakit bronkitis dari akibat paparan asap rokok.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rokok

Rokok merupakan sumber utama dari radikal bebas yang berasal dari lingkungan, polusi udara, paparan bahan kimia, dan radiasi ion. Asap rokok merupakan aerosol heterogen dari pembakaran tembakau, komponen dalam rokok serta pembungkusnya (Christyaningsih, 2003). Asap rokok mengandung 4.000 bahan kimia yang dikelompokkan menjadi 2 komponen, yaitu *gas phase* (komponen gas) dan *particulate phase* (komponen padat atau partikel) (Muhammad, 2009). Satu batang rokok mengandung banyak bahan kimia diantaranya adalah : nikotin, karbon monoksida, dan tar (Christyaningsih, 2003).

Asap rokok yang terhirup dalam satu kali hirupan mengandung 10^{17} molekul *Reactive Oxygen Species* (ROS). *Reactive Oxygen Species* (ROS) diproduksi secara endogen melalui pengaktifan sel-sel inflamasi seperti neutrofil dan makrofag. Stress oksidatif yang disebabkan oleh asap rokok akan menginduksi terjadinya respons inflamasi yang dapat mendestruksi septum alveolar paru (Sianturi, 2003).

Asap rokok mengandung radikal bebas dalam jumlah yang sangat tinggi, selain itu asap rokok juga berefek karsinogenik yang dapat menyebabkan iritasi saluran napas oleh sulfur dioksida, ammonia dan formaldehid (Balmes *et al.*, 2005). Radikal bebas merupakan oksidan yang dapat berdampak negatif antara lain mengganggu integritas sel dan dapat bereaksi dengan komponen sel, yaitu: komponen struktural, merusak protein (termasuk enzim) dan DNA, yang akhirnya akan terjadi kerusakan sel (Christyaningsih, 2003). Nikotin dalam rokok yang

dihasilkan dari asap arus utama (*mainstream*) adalah 4 – 6 kali lipat daripada asap arus samping (*sidestream*) (Susanna, 2003). Zat yang dianggap karsinogenik dalam asap rokok ialah persenyawaan hidrokarbon aromatik polisiklik (zat tar) dan kelainan yang ditimbulkan berupa hiperplasia sel basal, metaplasia sel skuamosa atau karsinoma pada epitel bronkhus (Kurniawan, 2002). Bahaya rokok lainnya yaitu kanker paru-paru selain itu juga dapat terkena emfisema dan bronkitis (Pratiwi *et al.*, 2004).

2.2 Bronkitis

Bronkitis adalah suatu peradangan (inflamasi) pada bronkus (saluran udara yang membawa udara ke paru-paru). Penyakit ini biasanya bersifat ringan dan pada akhirnya akan sembuh sempurna. Penderita yang memiliki penyakit menahun (misalnya penyakit jantung atau penyakit paru-paru) dan pada usia lanjut, bronkitis bisa bersifat serius (Suryo, 2010).

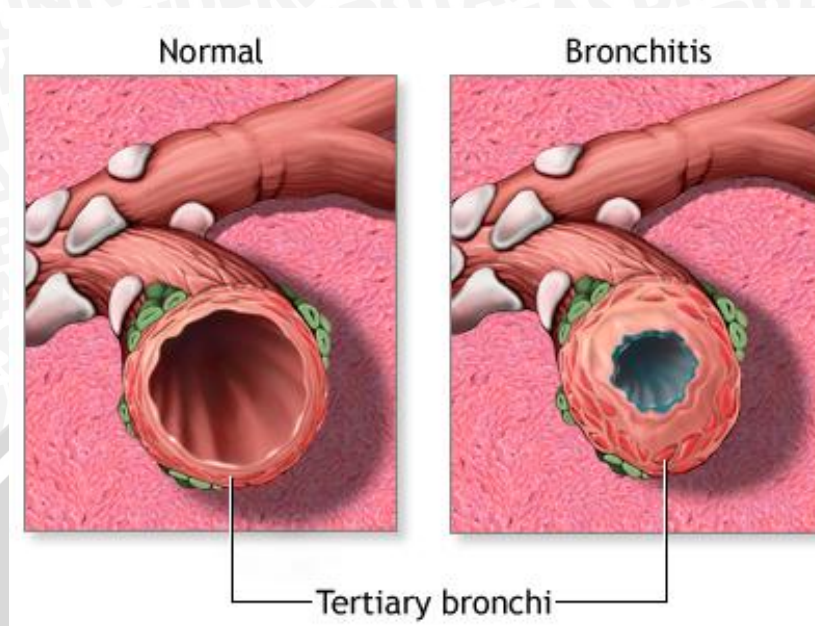
Bronkitis ada 2 macam yaitu bronkitis akut dan bronkitis kronis. Bronkitis akut yaitu bronkitis yang biasanya datang dan sembuh hanya dalam waktu 2 hingga 3 minggu saja. Virus yang menyebabkan flu atau pilek dapat menyebabkan bronkitis akut. Penyebab lain bronkitis akut dapat disebabkan karena non infeksi dari paparan asap tembakau, debu, dan uap. Bronkitis kronis yaitu bronkitis yang biasanya datang secara berulang-ulang dalam jangka waktu yang lama, terutama pada perokok. Bronkitis akut dapat menyebabkan bronkitis kronis jika tidak mengalami penyembuhan. Penebalan dan peradangan bisa terjadi pada dinding bronkus paru – paru yang sifatnya permanen (Eka, 2011). Bronkitis akut maupun bronkitis kronis memiliki gejala seperti batuk berdahak baik yang jelas atau putih,

abu-abu atau kekuning-kuningan atau berwarna hijau (dahak tidak selalu muncul baik pada bronkitis akut maupun bronkitis kronik), sesak napas, kelelahan, sedikit demam dan menggigil dan dada merasa tidak nyaman (Eka, 2011).

Masuknya komponen-komponen rokok akan menyebabkan iritasi pada saluran napas yang berakibat pada hipersekresi lender dan terjadi inflamasi. Terjadi hiperplasia pada kelenjar mukus sehingga produksi mukus menjadi meningkat sehingga menyebabkan penurunan fungsi silia dan menyebabkan penyempitan dan penyumbatan pada bronkus (Anonim, 2008).

Terapi yang digunakan untuk bronkitis ini adalah dengan menggunakan bronkodilator dan kortikosteroid inhalasi. Bronkodilator adalah obat pertama yang dipilih untuk menangani gejala, bronkodilator dianjurkan sebagai pencegahan atau mengurangi gejala yang akan timbul. Bronkodilator bekerja kurang efektif (Sonia, 2006) (Tashkin *et al.*, 2004). Kortikosteroid inhalasi dapat mengurangi gejala, meningkatkan fungsi paru, dan menurunkan frekuensi eksaserbasi. Pemberian terapi kortikosteroid apabila dihentikan secara tiba-tiba akan menyebabkan eksaserbasi. Terapi kortikosteroid inhalasi tidak bisa direkomendasikan untuk jangka panjang (Singh *et al.*, 2002).

Gambar 2.1 menjelaskan bahwa adanya perbedaan yang terlihat antara bronkus normal dengan bronkus yang mengalami bronkitis. Bronkus normal tidak terlihat adanya cairan mukus yang menyumbat bronkus. Bronkus yang mengalami bronkitis terlihat adanya cairan mukus yang menyumbat bronkus.



Gambar 2.1 Bronkus normal dibandingkan dengan bronkus yang mengalami bronkitis (Suryo, 2010)

2.3 Manggis (*Garcinia mangostana liin*)

Manggis merupakan tanaman buah berupa pohon yang berasal dari hutan tropis yang teduh di kawasan Asia Tenggara, yaitu hutan belantara Malaysia atau Indonesia. Dari Asia Tenggara, tanaman ini menyebar ke daerah Amerika Tengah dan daerah tropis lainnya seperti Srilanka, Malagasi, Karibia, Hawaii dan Australia Utara. Di Indonesia manggis disebut dengan berbagai macam nama lokal seperti manggu (Jawa Barat), Manggus (Lampung), Manggusto (Sulawesi Utara), Manggista (Sumatera Barat) (Rusnasbuah, 2007).

Buah manggis terdiri dari bagian kulit dan bagian daging buah (pulp). Bagian kulit memiliki struktur yang keras berwarna hijau (ketika masih mentah) dan berwarna ungu gelap (bila sudah matang) sedangkan bagian daging buah

berwarna putih susu, mempunyai rasa yang khas (kombinasi manis, asam, dan sepat) (Paramawati, 2010).

Taksonomi tanaman manggis adalah sebagai berikut: (Juanda dan Cahyono, 2000)

- Divisio : Spermatophyta
Sub Divisio : Angiospermae
Classis : Dicotyledoneae
Sub Classis : Archielamidacea
Ordo : Parietales
Famile : Guttiferae
Genus : *Garcinia*
Species : *Garcinia mangostana linn*



Gambar 2.2 Kulit Buah Manggis (A) Buah Manggis (B) (Paramawati, 2010)

Buah manggis merupakan buah yang mempunyai banyak keunggulan dibandingkan buah lainnya. Bagian kulit buah manggis dapat dimanfaatkan sebagai penghasil zat warna alami yang dapat digunakan sebagai pewarna makanan, juga dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan, antidiare dan antikanker. Pemanfaatan kulit manggis belum maksimal. Kulit manggis selama ini diketahui

memiliki kandungan antioksidan yang tinggi. Menurut Iswari (2011) berbagai penelitian menjelaskan bahwa kulit manggis yang sudah matang mengandung polihidroksi-xanton yang merupakan derivat mangostin dan β -mangostin. Xanthon mempunyai kemampuan sebagai antioksidan, antibakteri, antikanker.

Penampilan kulit manggis yang berwarna ungu menunjukkan ada pewarna alami yang terkandung didalamnya. Senyawa flavonoid salah satunya yang terkandung dalam kulit buah manggis adalah antosianin. Antosianin diketahui dapat berfungsi sebagai antioksidan (Jordheim, 2007)

Menurut Silalahi (2002) sifat antioksidan pada manggis melebihi vitamin E dan vitamin C. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi oksidasi radikal bebas dalam oksidasi lipid dalam konsentrasi yang lebih rendah dari substrat yang dapat dioksidasi. Antioksidan bereaksi dengan radikal bebas sehingga mengurangi kapasitas radikal bebas untuk menimbulkan kerusakan. Antioksidan alami yang terdapat dalam bahan pangan tersebut antara lain adalah vitamin C, vitamin E, antosianin, klorofil dan senyawa flavonoid. Antioksidan yang baik adalah senyawa yang mampu membuat radikal fenol dari antioksidan menjadi lebih stabil.

Menurut Nakatani *et al.*, (2002), ekstrak etanol 40% menunjukkan efek paling poten dalam menghambat pelepasan histamin dari sel 2H3-RBL yang diperantarai IgE dibandingkan dengan ekstrak kulit manggis dengan etanol 100%, ekstrak kulit manggis dengan etanol 70% berpotensi sebagai antioksidan. Menurut Weecharansan *et al.*, (2006) menindak lanjuti hasil penelitian tersebut dengan melakukan penelitian aktivitas antioksidan beberapa ekstrak kulit manggis yaitu

ekstrak air, etanol 50% dan 95%, serta etil asetat. Metode yang digunakan adalah penangkapan radikal bebas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua ekstrak mempunyai potensi sebagai penangkal radikal bebas, ekstrak air dan etanol mempunyai potensi lebih besar berkaitan dengan aktivitas antioksidan tersebut, kedua ekstrak tersebut juga mampu menunjukkan aktivitas neuroprotektif.

2.4 Enzim Protease

Enzim adalah molekul protein kompleks yang dihasilkan oleh sel hidup dan bekerja sebagai katalisator dalam berbagai proses kimia di dalam tubuh. Enzim pemecah protein atau protease sangat penting dalam proses pencernaan untuk memecah ikatan peptida dari protein yang dikonsumsi menjadi asam-asam amino yang mudah diabsorpsi (Akhdiya, 2003).

Protease adalah enzim yang memutuskan ikatan peptida pada protein. Berdasarkan tempat pemutusan ikatan peptida, enzim protease dibagi menjadi dua yaitu endopeptidase dan eksopeptidase. Endopeptidase ialah enzim yang mengkatalis pemecahan ikatan peptida pada bagian dalam rantai polipeptida sedangkan enzim yang mengkatalis pemecahan ikatan peptida pada ujung-ujung rantai polipeptida disebut eksopeptidase (Murray *et al.*, 2003). Menurut Naiola dan Widhyastuti (2002) Protease adalah enzim yang mengkatalis pemecahan ikatan peptida dalam peptida, polipeptida dan protein dengan menggunakan reaksi hidrolisis menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek dan asam amino.

Prinsip kerja dari metode pengukuran aktivitas enzim protease menggunakan kasein sebagai substrat. Asam amino bebas misalnya tirosin diukur konsentrasi dengan menggunakan kurva standar tirosin. Satu unit aktivitas protease adalah banyaknya 1ml mol tirosin yang dipecah oleh enzim protease dalam setiap menit.

Enzim protease dirilis sebagai hasil dari respon inflamasi dari asap rokok. Stres oksidatif yang terjadi akan mengakibatkan inaktivasi antiprotease yaitu Alpha1-antitripsin yang berfungsi sebagai enzim proteolitik elastase dan kolagenase pada paru. Pada keadaan ini yang berperan secara dominan adalah enzim protease yang dihasilkan dari sintesa neutrofil yang dapat mengakibatkan kerusakan jaringan elastis maupun kolagen dari paru (Dekhuijzen, 1998).

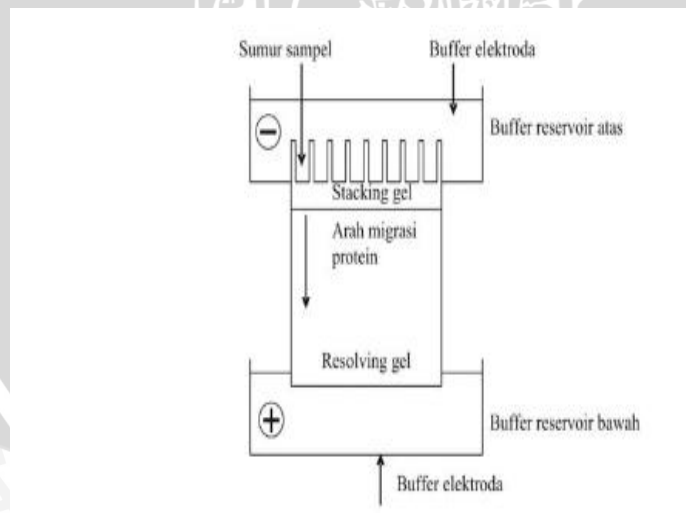
2.5 SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate - Poly Acrilamide Gel Electrophoresis*)

Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan yang memisahkan molekul berdasarkan kemampuannya bergerak dalam medium konduksi yang biasanya berupa larutan bufer dan akan memberikan respons setelah ditambahkan medan listrik (Harvey, 2000). Tujuan metode elektroforesis untuk memisahkan [protein](#) yang bermuatan berdasarkan berat molekul. Molekul yang lebih pendek bermigrasi lebih cepat melalui pori-pori gel daripada molekul yang lebih panjang.

Gel akrilamid sebagai dasar atas gerakan sampel protein (Kurniati, 2000). *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) merupakan detergen anionik yang bersama dengan β -merkaptotanol dan pemanasan menyebabkan rusaknya struktur tiga dimensi protein menjadi konfigurasi acak. Hal ini disebabkan oleh pecahnya ikatan disulfida yang selanjutnya tereduksi menjadi gugus-gugus sulfidril.

Polimerisasi dapat terjadi dengan cepat pada suhu kamar dengan adanya katalis dan inisiator. Katalis dan inisiator yang umum digunakan ialah N,N',N',N' - tetrametilenadamina (TEMED) dan amonium persulfat (APS) sebagai sumber radikal bebas yang akan menginisiasi pembentukan polimer (Caprette, 2005).

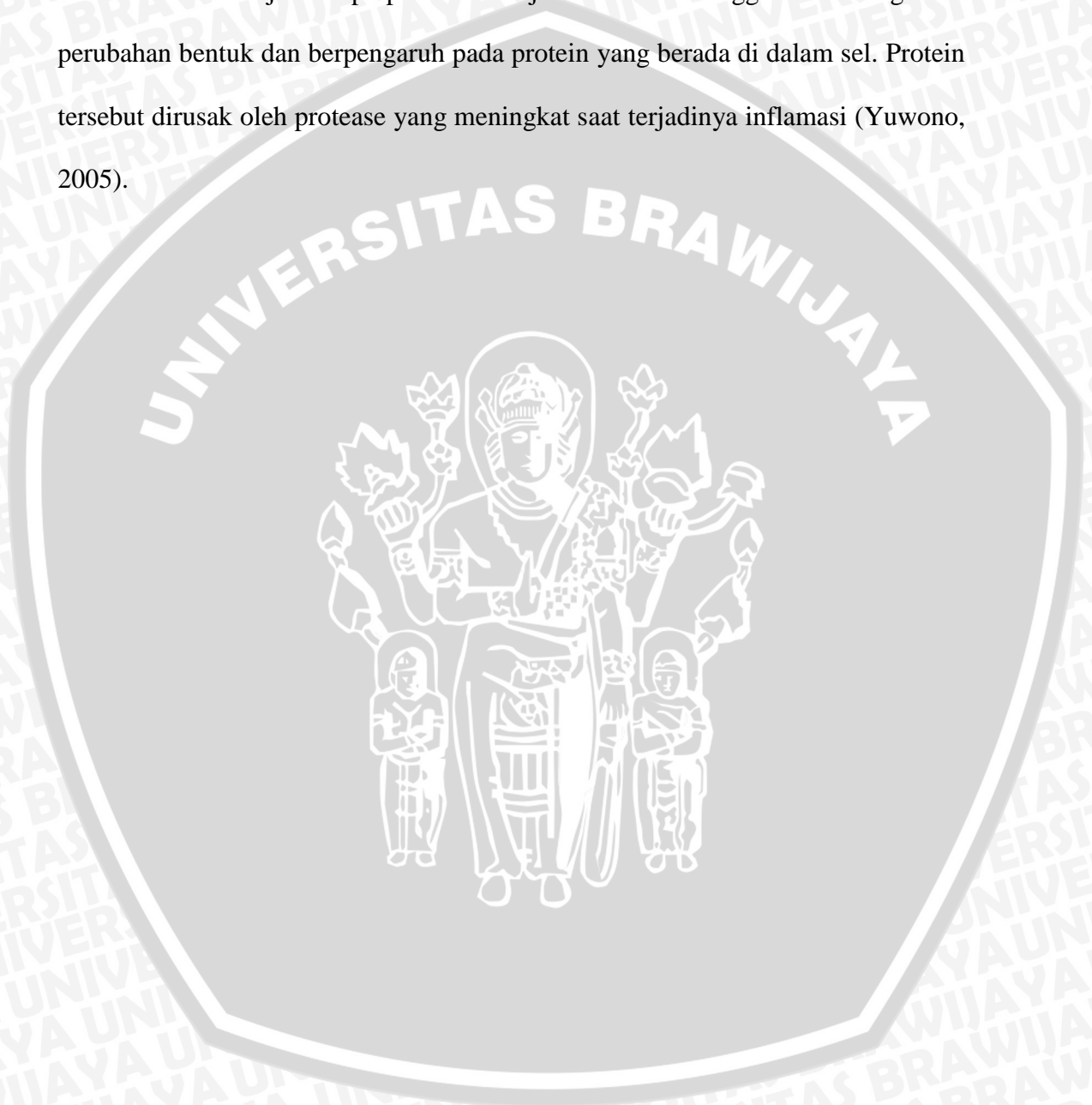
Proses *running* elektroforesis digunakan *Reducing Sampel Buffer/* buffer sampel dan diekstrak dengan sampel jaringan (Labra, 2006). Larutan buffer berfungsi memutus ikatan disulfida protein sehingga diperoleh protein dalam bentuk linier, yang nantinya akan memudahkan separasi protein pada saat *running*. Larutan buffer mengandung 1M Tris-HCl pH 6,8 dan SDS 10% berfungsi sebagai agen pereduksi yang memutuskan ikatan disulfida sehingga protein berbentuk linier yang memberi muatan negatif dan memudahkan separasi menuju kutub positif saat dilewatkan arus (Janson, 2008).



Gambar 2.5 Bentuk Skematis Unit Elektroforesis (Smith,1998)

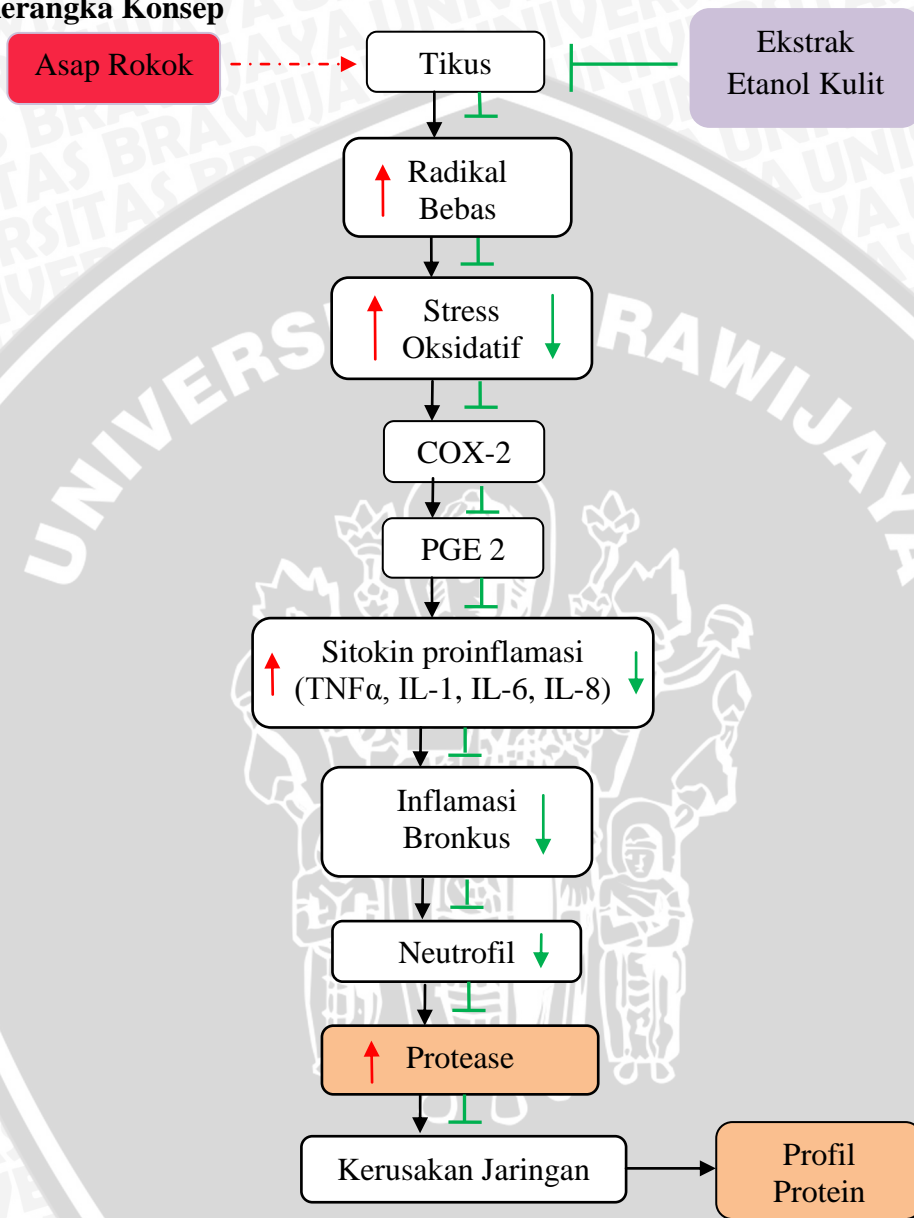
Fungsi SDS-PAGE adalah metode untuk mengetahui berat molekul protein. Sehingga bisa menentukan profil protein dari perlakuan yang kita lakukan apakah

terjadi perubahan profil protein antara yang kontrol, paparan asap rokok dan terapi. Keadaan bronkitis dapat mempengaruhi profil protein. Hal ini karena pada saat bronkitis terjadi hiperplasia kelenjar mukus sehingga sel mengalami perubahan bentuk dan berpengaruh pada protein yang berada di dalam sel. Protein tersebut dirusak oleh protease yang meningkat saat terjadinya inflamasi (Yuwono, 2005).



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

-.-> : paparan asap rokok

—| : menghambat / terapi

↑ : kenaikan respon akibat asap rokok

↓ : penurunan respon pasca terapi

Orange box : variabel terikat

Purple box : variabel bebas

Paparan asap rokok pada tikus akan menyebabkan bahan-bahan kimia berbahaya masuk ke dalam paru-paru. Asap rokok mengandung nikotin, karbon monoksida dan tar. Paparan pada organ paru-paru tersebut mengakibatkan terbentuknya radikal bebas dalam tubuh. Paparan asap rokok yang terus-menerus masuk dalam tubuh akan mengakibatkan radikal bebas dengan jumlah yang tinggi menyebabkan stress oksidatif. Stress oksidatif tersebut akan menginisiasi COX-2 dan munculnya PGE 2 sebagai mediator inflamasi. Inflamasi yang terjadi karena adanya asap rokok masuk ke dalam jaringan dan adanya sitokin proinflamasi yang terdiri dari TNF α , IL-1, IL-6 dan IL-8 sehingga mengaktifkan sel mast dan makrofag, makrofag akan menginisiasi keluarnya neutrofil. Neutrofil yang terinisiasi melepaskan protease dengan jumlah yang tinggi yang berakibat pada kerusakan organ bronkus (Karnen, dkk 2010). Kerusakan organ bronkus ditandai dengan perubahan profil protein.

Ekstrak etanol kulit manggis yang diberikan pada tikus sebagai terapi dari asap rokok. Terapi tersebut akan menghambat masuknya radikal bebas ke dalam tubuh. Antioksidan yang terkandung pada kulit manggis dapat menetralkan oksidan yang disebabkan asap rokok sehingga menurunkan stress oksidatif dan menghambat COX-2, hal tersebut akan menurunkan produksi PGE 2 sebagai mediator inflamasi yang akan mempengaruhi inflamasi brokus. Sitokin proinflamasi juga akan menurun dan inflamasi yang terjadi juga ikut menurun sehingga makrofag yang menginisiasi keluarnya neutrofil akan menurun dan pelepasan protease juga menurun sehingga tidak terjadi kerusakan organ.

3.2 Hipotesis

Berdasarkan kerangka konsep diatas maka hipotesis adalah sebagai berikut:

Pemberian ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana linn*) dapat mempengaruhi profil protein dan menurunkan aktivitas protease pada bronkus tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terpapar asap rokok.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2013 – Mei 2014 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), pakan tikus, ekstrak etanol kulit manggis, rokok filter, PBS Azida, NaN_3 , HCl, NaOH, etanol absolut 98%, etanol 50%, aquades, NaCl Fisiologi 0,9%, NaCl 2%, gelatin, PBST-PMSF, buffer Tris-HCl, pasir kuarsa, tirosin, tri chloroacetic acid (TCA 4%), buffer fosfat, enzim protease, kasein, *Reducing Sample Buffer* (RSB), *separating gel* (*Lower Gel Buffer* (LGB), T-Acryl, aquades, ammonium persulphate (APS), N,N,N',N'- tetramethyl ethylene diamine (TEMED), *stacking gel* (*Upper Gel Buffer* (UGB), T-Acryl, APS, TEMED) larutan *staining*, larutan *destaining*, buffer elektroforesis.

4.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain bak pemeliharaan hewan coba, pinset, scapel, gunting, labu ukur (500 ml, 1000 ml), *beaker glass* (250 ml, 500 ml, 1000 ml), tabung erlenmeyer, corong gelas, mortar dan pestle, mikro pipet (10 μL , 20 μL , 200 μL , 1000 μL), mikrotip (*yellow tips* dan *blue tips*) rak tabung reaksi, penangas air, cawan petri, eppendorf tube 1,5 ml, tabung polipropilen 15 ml, lemari pendingin, neraca analitik, sentrifugasi (*Hettich*

Zentrifugen D-7200 Tuttlingen), inkubator (Memmert), vortex (*Guo-Huq*), Sonikator (*Branson 200*), spektrofotometri UV (*Genesys 10 UV*), seperangkat alat elektroforesis, power supply, shaker, *magnetic stirrer*.

4.3 Tahapan Penelitian

1. Rancangan Penelitian
2. Persiapan Hewan Percobaan
3. Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Manggis
4. Persiapan Hewan yang Dipapar Asap Rokok
5. Persiapan Hewan Terapi
6. Pengambilan Organ Bronkus
7. Isolasi Protease
8. Pengukuran Aktivitas Protease
9. Pemisahan dan karakterisasi protein dengan SDS-PAGE
10. Profil protein hasil SDS-PAGE
11. Analisis Data

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Tikus dibagi menjadi lima kelompok perlakuan (Tabel 4.1)

Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan Penelitian

| Kelompok Tikus | Perlakuan |
|--------------------------------|--|
| Kontrol (-) | Tikus kontrol, yaitu tikus tanpa perlakuan |
| Paparan asap rokok (+) | Tikus dipapar dengan menggunakan asap rokok selama 30 hari |
| Terapi dengan dosis 200mg/kgBB | Tikus dipapar asap rokok dan diberi terapi dengan menggunakan ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 200 mg/kgBB selama 21 hari |
| Terapi dengan dosis 400mg/kgBB | Tikus dipapar asap rokok dan diberi terapi dengan menggunakan ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 400 mg/kgBB selama 21 hari |
| Terapi dengan dosis 600mg/kgBB | Tikus dipapar asap rokok dan diberi terapi dengan menggunakan ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 600 mg/kgBB selama 21 hari |

Sampel penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* berumur 3 bulan. Berat badan tikus 200 gram.

Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan Kusurningrum (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 25 ekor hewan coba. Tetapi dalam penelitian ini digunakan ulangan sebanyak 5 kali dalam setiap perlakuan sehingga dibutuhkan 25 ekor hewan coba.

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Dosis terapi ekstrak kulit manggis 200 mg/kg BB, 400 mg/kg BB, dan 600 mg/kg BB

Variabel terikat : Profil protein dan Aktivitas protease.

Variabel kendali : Tikus strain Wistar, umur, jenis kelamin, BB, perlakuan paparan asap rokok

4.4.2 Persiapan Hewan Percobaan

Tikus yang digunakan untuk penelitian diadaptasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian pakan yang disesuaikan dengan standar penyusunan ransum untuk hewan coba *Association of Abalytical Communities* (AOAC, 2005) yaitu mengandung karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, mineral, vitamin dan air 12%. Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol, kelompok positif, kelompok terapi dengan dosis 200 mg/kgBB, kelompok terapi dengan dosis 400 mg/kgBB, dan kelompok terapi dengan dosis 600 mg/kgBB. Kelompok kontrol merupakan tikus tanpa perlakuan. Kelompok positif merupakan tikus dipapar dengan asap rokok. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari empat ekor tikus sebagai ulangan.

4.4.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Manggis

Kulit manggis dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Kulit manggis dipotong kecil-kecil dengan ukuran 0,5 x 1 cm². Potongan kulit manggis

dikeringkan semalaman di dalam oven pada suhu 45°C. Kulit manggis yang telah kering dihancurkan dengan menggunakan alat penghalus untuk membuat serbuk.

Serbuk yang dihasilkan ditambahkan aquades dengan perbandingan 1:4 dipanaskan dengan penangas air pada suhu 70°C selama 15 menit. Pemanasan dilakukan terus menerus selama 4 kali kemudian disaring. Hasil dalam bentuk filtrat untuk uji tanin, sedangkan hasil dalam bentuk residu di oven pada suhu 40°-45°C sampai kering dan diperoleh ekstrak kering sebanyak 95 gram. Kemudian dilakukan maserasi dengan menggunakan etanol 50% didiamkan selama 7 hari dalam tabung erlemeyer dan ditutup dengan *aluminium foil*. Didapatkan cairan kental berwarna kuning. Kemudian dilakukan penguapan etanol atau destilasi dengan cara pemanasan. Didapatkan ekstrak kulit manggis dalam bentuk cairan sebanyak 27,6 ml.

4.4.4 Persiapan Hewan yang Dipapar Asap Rokok

Perlakuan pada tikus dilakukan pada 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terbagi 5 tikus setiap kelompok positif, 5 kelompok terapi dengan dosis 200 mg/kgBB, 5 kelompok terapi dengan dosis 400 mg/kgBB, dan 5 kelompok terapi dengan dosis 600 mg/kgBB. Setiap kelompok tikus diberi paparan asap rokok sebanyak 2 batang rokok setiap harinya. Paparan asap rokok menggunakan jenis rokok filter, pemberian paparan yaitu dengan menggunakan *smoking pump* asap rokok yang sudah ditampung pada *smoking pump* kemudian dihembuskan ke dalam kandang tertutup berbentuk kaca. Setelah 30 hari 5 tikus kelompok yang dipapar asap rokok dan 5 tikus kelompok kontrol dilakukan pembedahan untuk mendapatkan organ bronkus. Tikus kelompok terapi setelah diberi paparan asap

rokok dilakukan perlakuan dengan pemberian terapi ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 200mg/kgBB, 400mg/kgBB dan 600mg/kgBB.

4.4.5 Persiapan Terapi

Perlakuan terapi dengan menggunakan ekstrak etanol kulit buah manggis pada 15 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang terdiri dari 5 tikus kelompok terapi dengan dosis 200 mg/kgBB, 5 tikus kelompok terapi dengan dosis 400 mg/kgBB, dan 5 tikus kelompok terapi dengan dosis 600 mg/kgBB. Pemberian terapi itu dilakukan setelah tikus diberi paparan asap rokok selama 30 hari. Perhitungan dosis pada (Lampiran 4). Ekstrak etanol kulit manggis diberikan sebanyak 1 ml/hari/tikus selama 21 hari diberikan dengan cara sonde.

4.4.6 Pengambilan Organ Bronkus

Pengambilan organ bronkus pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan 2 kali yaitu hari ke 30 pada kelompok tikus kontrol dan pada kelompok tikus yang dipapar asap rokok setelah pemaparan asap rokok selama 30 hari. Pembedahan yang kedua hari ke 51 dilakukan pada kelompok tikus terapi dengan dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 600 mg/kgBB setelah pemberian terapi selama 21 hari. Langkah awal yang harus dilakukan adalah menyiapkan papan untuk bedah kemudian dislokasi hewan coba pada bagian leher. Setelah itu hewan coba diposisikan terlentang dengan menggunakan jarum pada bagian tangan dan kaki. Pembedahan pada bagian perut, diambil paru dari rongga dada untuk pemisahan bronkus. Bronkus yang diambil adalah bronkus kanan dan bronkus kiri. Bronkus dicuci dengan menggunakan NaCl-fis 0,9% kemudian dipotong dan dimasukkan dalam larutan PBS-Azida pH 7,4.

4.4.7 Isolasi Protein

Organ bronkus dipotong kecil-kecil dan ditambahkan larutan PBS-Tween : PMSF (9 : 1) sebanyak 1 mL, ditambahkan sedikit pasir kuarsa, dan digerus dengan mortar dingin dalam kondisi dingin. Setelah homogenat hasilnya ditambahkan dengan larutan PBS-Tween : PSMF (9:1) sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung polipropilen yang telah disterilisasi. Dilakukan homogenisasi dengan alat vorteks selama 10 menit, disonikasi selama 10 menit kemudian disentrifugasi dengan alat sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya hasilnya supernatan diambil dan ditambahkan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan pada freezer selama 24 jam hingga terbentuk endapan. Setelah itu disentrifus dengan alat sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit, diambil endapan dan dikeringkan di udara bebas hingga bau etanol hilang. Kemudian endapan ditambahkan dengan larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,5 dengan perbandingan volume 1:1.

4.4.8 Pengukuran Aktivitas Enzim Protease (Walter, 1984)

a. Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Disiapkan 10 labu ukur dan masing-masing diisi larutan baku tirosin 20 ppm 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 mL untuk konsentrasi 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 ppm. Setelah itu ditambahkan aquades sampai tanda batas kemudian tabung ditutup dengan aluminium foil lalu dikocok. Selanjutnya diukur serapannya

pada masing-masing konsentrasi larutan baku pada panjang gelombang maksimum yaitu 278 nm. Blanko yang digunakan adalah aquades.

b. Pengukuran Aktivitas Protease Hasil Isolasi dari Bronkus

Langkah awal yang harus dilakukan adalah mencampurkan kasein 500 ppm sebanyak 200 μL , larutan buffer fosfat pH 7 sebanyak 300 μL dan enzim protease sebanyak 100 μL lalu didiamkan 60 menit pada suhu 37°C di dalam inkubator. Kemudian ditambahkan larutan TCA 4% sebanyak 400 μL didiamkan selama 30 menit pada suhu 27°C (suhu kamar). Selanjutnya diputar dengan alat sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil sebanyak 100 μL dan diencerkan 5 kali volume sampel dengan buffer fosfat kemudian diukur nilai absorbansinya pada λ maksimal tirosin sebesar 280 nm. Blanko yang digunakan dibuat dengan prosedur sama dengan penentuan aktivitas, tetapi untuk perlakuan penambahan TCA dilakukan secepatnya setelah penambahan larutan enzim. Satu unit aktivitas adalah banyak tirosin dari pemecahan 1 mL enzim protease.

Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan berdasarkan metode walter (1984) menggunakan rumus :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{pq} \times fp$$

Dimana : v = volume total sampel (mL)

q = waktu inkubasi (mL)

f_p = faktor pengenceran

p = jumlah enzim (mL)

4.4.9 Pemisahan dan karakterisasi protein dengan SDS-PAGE

Profil protein dikarakteristikan dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poliacrilamide Gel Electrophoresis*) yang dilakukan dengan menggunakan metode standar. Sampel isolat protein sejumlah 10 μL ditambahkan dengan 10 μL Tris-Cl dan ditambahkan 20 μL RSB (*Reducing Sample Buffer*), kemudian dimasukkan ke dalam mikrotube, dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 200 Volt selama 45 menit. Untuk staining protein digunakan *Coomasive brilliant blue* 0,1%(w/v).

4.4.10 Profil protein hasil SDS-PAGE

Analisa berat molekul (BM) masing-masing protein hasil isolasi bronkus dengan menggunakan protein Marker sebagai standar. Hasil *scanning* pita-pita protein diplotkan ke dalam kurva BM marker dengan persamaan regresi linier sehingga didapatkan nilai BM protein pada masing-masing sampel (Lampiran 8).

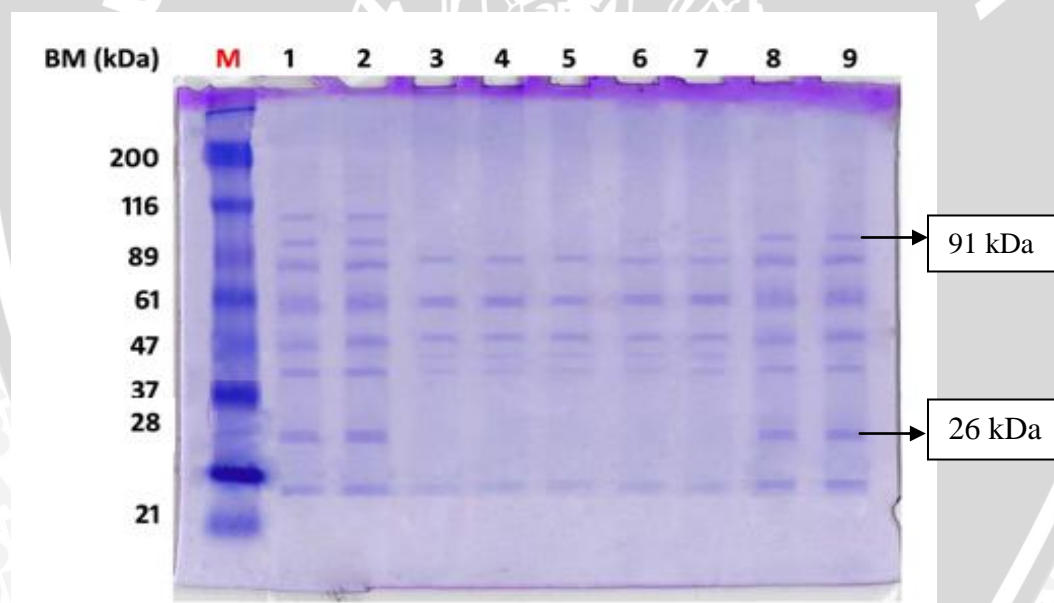
4.4.11 Analisis Data

Untuk mengetahui pengaruh pemberian asap rokok dan terapi ekstrak kulit manggis terhadap besarnya nilai aktivitas protease secara kuantitatif sedangkan pengamatan profil protein secara semi kuantitatif. Data pengaruh pemberian asap rokok dan terapi ekstrak kulit manggis terhadap aktivitas protease yang dianalisis dengan menggunakan *Analysis Of Variance* (ANOVA) yang dilanjutkan oleh uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan tingkat kesalahan 5% apabila ada perbedaan antar perlakuan.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Gambaran Profil Protein Bronkus Tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Pemberian ekstrak etanol kulit manggis pada bronkus tikus putih (*Rattus norvegicus*) hasil paparan asap rokok menyebabkan perubahan profil protein seperti yang terlihat pada Gambar 5.1. Profil protein hasil elektroforesis dengan menggunakan SDS PAGE menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pada tikus kontrol dengan kelompok tikus yang dipapar asap rokok dan tikus yang diberi terapi dengan ekstrak etanol kulit manggis terlihat jelas adanya perubahan profil pita protein.



Gambar 5.1 Profil pita protein jaringan bronkus tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Keterangan : M (marker); 1-2=Kontrol; 3-4=Paparan asap rokok; 5=terapi 1; 6-7=terapi 2; 8-9= terapi 3

Tabel 5.1 menunjukkan profil protein dengan berat molekul yang berbeda-beda muncul pada tiap perlakuan. Pada kelompok tikus kontrol (-) adanya pita protein dengan berat molekul 105 kDa, 91 kDa, 79 kDa, 62 kDa, 49 kDa, 47 kDa, 42 kDa, 26 kDa, dan 23 kDa. Pita protein dengan berat molekul 105 kDa dan 47

kDa yang ada pada kelompok kontrol (-) tetapi tidak muncul pada kelompok paparan asap rokok dan kelompok terapi. Pada kelompok tikus terpapar asap rokok (well 3-4) adanya pita protein dengan berat molekul 79 kDa, 62 kDa, 49 kDa, 42 kDa dan 23 kDa. Protein berat molekul tersebut diduga protease, karena berat molekul protease bekisar antara 80 kDa-20 kDa (Kamelia, 2005). Kelompok terapi dosis 200 mg/kgBB menunjukkan tidak adanya pita protein dengan berat molekul 91 kDa. Kelompok terapi dengan dosis 400 mg/kgBB sudah terlihat adanya protein dengan berat molekul 91 kDa tetapi tidak teralu jelas sedangkan kelompok terapi ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 600mg/kgBB terlihat jelas adanya pita protein dengan BM 91 kDa. Pita protein dengan BM 26 kDa muncul pada kelompok terapi dengan dosis 600 mg/kgBB dan tidak muncul pada kelompok paparan asap rokok dan terapi dengan dosis 200 mg/kgBB dan dosis dengan dosis 400 mg/kgBB.

Kelompok dengan terapi 200 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB diyakini belum dapat memperbaiki suatu pita protein 91 kDa dan 26 kDa. Protein dengan BM 91 kDa diyakini protein signal *transducers and activator of transcription 1* (STAT 1) (Anwar, 2010). Protein dengan BM 26 kDa diyakini protein *B cell lymphoma-2* (Bcl-2) Cha *et al.*, (2004).

Tabel 5.1 Berat Molekul Profil Protein Pada Bronkus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

| Kelompok | BM | | | | | | | | |
|------------------------------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 105 | 91 | 79 | 62 | 49 | 47 | 42 | 26 | 23 |
| (P0) Kontrol (-) | √ | √ | √ | √ | √ | - | √ | √ | √ |
| (P1) Paparan asap rokok (+) | - | - | √ | √ | √ | √ | √ | - | √ |
| (P2) Terapi dosis 200mg/kgBB | - | - | √ | √ | √ | √ | √ | - | √ |
| (P3) Terapi dosis 400mg/kgBB | - | √ | √ | √ | √ | √ | √ | - | √ |
| (P4) Terapi dosis 600mg/kgBB | - | √ | √ | √ | √ | - | √ | √ | √ |

Protein *Signal Transducer and Activator of Transcription 1* (STAT 1) merupakan faktor transkripsi yang dapat difosforilasi pada residu asam amino tirosin oleh enzim tirosin kinase *Janus Family of Tyrosine Kinase* (JAK). Proses transduksi sinyal diinisiasi oleh pengikatan IFN pada subunit reseptor yang sesuai. Pengikatan IFN akan mengaktifasi faktor transkripsi JAK dan STAT melalui fosforilasi tirosin. Kinase JAK 1 yang teraktivasi oleh IFN α dan β akan menghasilkan fosforilasi dan dimerisasi protein STAT 1 yang selanjutnya ditranslokasi bersama IRF9 ke inti sel. Komplek tiga protein disebut dengan *IFN-Stimulated Gene Factor 3 (ISGF 3)* yang dapat mengaktifkan gen-gen pengkode IFN α dan β melalui *IFN-Stimulated Response Element (ISRE)*. Pada IFN γ kinase JAK 1 dan JAK 2 yang teraktivasi akan memfosforilasi protein STAT 1 yang kemudian ditranslokasi ke inti sel. *Gamma Activation Factor* (GAF)

yang mengaktifkan gen-gen pengkode IFN γ . Kelompok GAF akan mengaktivasi gen-gen IFN γ melalui elemen *Gamma Activated Sequence* (GAS) (Samuel, 2001).

Interferon α dan β dibentuk oleh berbagai sel sebagai reaksi terhadap infeksi virus, bakteri, mikoplasma dan protozoa. Interferon α diproduksi oleh leukosit dan interferon β diproduksi oleh fibroblast. Interferon α dan β berfungsi sebagai virustatis yaitu mencegah infeksi lebih lanjut dengan cara menduduki reseptor-reseptor khas pada membran sel normal sehingga tidak dapat dipenetrasi oleh virus. Interferon gamma (IFN γ) diproduksi oleh limfosit T dan NK-cells. INF γ berfungsi sebagai immunostimulator (Tan, 2007).

Hilangnya protein STAT 1 salah satunya dikarenakan oleh radikal bebas. Radikal bebas tidak menyerang sasaran spesifik, sehingga radikal bebas juga akan menyerang asam lemak tidak jenuh ganda dari membran sel, organel sel, atau DNA (Winarsi, 2007). Apabila terjadi kerusakan sel, DNA yang mempengaruhi pembentukan RNA sehingga terbentuk molekul-molekul RNA yang tidak sempurna, ini dapat menyebabkan terjadinya kelainan protein STAT 1 sebagai protein transkripsi. Kelainan tersebut dapat mengganggu fungsi sel dan menyebabkan kerusakan atau kematian sel/organ yang bersangkutan (Cunningham, 2003). Akibat akumulasi ROS yang semakin banyak maka protein meningkatkan proses transkripsi hingga pada satu saat proses transkripsi akan mengalami penurunan, penurunan itu menyebabkan protein STAT 1 sebagai protein transkripsi menjadi hilang.

Pemberian terapi dengan ekstrak etanol kulit manggis yang mengandung xanton yang berperan sebagai antioksidan. Senyawa xanton yang telah teridentifikasi yaitu gamma mangostin dan alfa mangostin (Sudarsono, dkk. 2002). Menurut penelitian Nakatani *et al.*, (2004) bahwa gamma mangostin secara langsung menghambat aktivitas enzim *Ikappa B kinase*, untuk kemudian mencegah proses transkripsi gen COX-2 (gen target NF- kappaB), menurunkan produksi PGE2 dalam proses inflamasi. Gamma mangostin terhadap sintesa PGE2 dan *siklooksigenase* (COX) akan menghambat secara poten pelepasan PGE2. PGE2 dan jalur *siklooksigenase*, kedua senyawa dan enzim tersebut merupakan mediator terpenting dalam terjadinya reaksi inflamasi.

Paparan asap rokok selain menyebabkan hilang protein dengan berat molekul 91 kDa (protein STAT 1), namun juga meniadakan ekspresi dari protein dengan berat molekul 26 kDa. Protein dengan berat tersebut diduga merupakan protein Bcl-2. Protein *B cell lymphoma-2* (Bcl-2) merupakan protein yang memiliki berat molekul 26 kDa terletak pada bagian sitosolik dari amplop nuklear, retikulum endoplasma dan bagian luar mitokondria (Miguel, et al., 2008). Protein Bcl-2 berfungsi sebagai regulasi apoptosis. Protein Bcl-2 dan protein Bcl-x merupakan protein anti apoptosis yang pada keadaan normal protein tersebut terdapat pada membran mitokondria dan sitoplasma. Pada saat sel mengalami stress, Bcl-2 dan Bcl-x menghilang dari membran mitokondria dan digantikan oleh protein pro apoptosis seperti Bak, Bax dan Bim (Fitraini, 2008).

Sinyal penyebab apoptosis antara lain *reactive oxygen species* (ROS) (Deshpande *et al.*, 2000). Pemberian terapi dengan menggunakan ekstrak etanol

kulit manggis dapat menghambat ROS sebagai penyebab dari apoptosis. Terapi ekstrak etanol kulit manggis memiliki kandungan xanton. Menurut Tewtrakul dkk. (2009) menyebutkan bahwa derivat dari xanton yaitu alfa mangosti dapat menurunkan ekspresi COX-2.

Siklooksigenase 2 (COX-2) adalah enzim dalam bentuk inducibel, dan tidak terdeteksi dalam semua jaringan normal, akan tetapi COX-2 terinduksi oleh berbagai macam inflamasi, disamping itu COX-2 juga berperan sebagai immunosuppression yang menyebabkan penurunan aktivitas sitotoksik dari NK sel, COX-2 juga menghambat terjadinya apoptosis (Nilanjan Ghosh, 2010). Apoptosis berlangsung seumur hidup dan bersifat menguntungkan bagi tubuh. Apoptosis terjadi ketika sel mengalami kerusakan yang sudah tidak dapat diperbaiki, apabila sel kehilangan kemampuan untuk apoptosis, sel yang rusak dapat terus membelah tidak terkendali. Pemberian terapi tersebut dapat mengembalikan protein transkripsi STAT 1.

5.2 Aktivitas Protease Bronkus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Aktivitas protease merupakan kemampuan protease untuk memecah protein. Protease yang disekresikan ke dalam jaringan juga terlibat dalam mekanisme kerusakan jaringan (Erez, 2009). Aktivitas protease yang berlebihan dapat merusak sel-sel pada jaringan bronkus. Aktivitas protease dapat meningkat dipengaruhi akibat paparan asap rokok karena asap rokok dapat mengaktifasi makrofag dan sel epitel untuk melepaskan faktor kemotaktik yang merekrut lebih banyak makrofag dan neutrofil. Makrofag dan neutrofil ini melepaskan protease yang merusak elemen struktur pada bronkus. Aktivitas protease dalam satu unit,

dimana banyaknya jumlah mol tirosin yang dipecah dalam 1 mL enzim protease.

Hasil pengukuran aktivitas protease ditunjukkan pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Aktivitas Protease Bronkus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

| Kelompok | Rata-rata Aktivitas Protease ($\mu\text{mol/mL.menit}$) | Presentase Aktivitas Protease (%) | |
|-------------------------------------|---|-----------------------------------|-----------|
| | | Peningkatan | Penurunan |
| (P0) Kontrol (-) | 0,0332 \pm 0,019 ^a | - | - |
| (P1) Paparan asap rokok (+) | 0,1332 \pm 0,189 ^d | 301,2 | - |
| (P2) Terapi dengan dosis 200mg/kgBB | 0,1090 \pm 0,098 ^c | - | 18,16 |
| (P3) Terapi dengan dosis 400mg/kgBB | 0,0818 \pm 0,082 ^b | - | 38,58 |
| (P4) Terapi dengan dosis 600mg/kgBB | 0,0476 \pm 0,089 ^a | - | 64,26 |

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata pada masing-masing perlakuan ($p > 0,05$)

Tabel 5.2 menunjukkan bahwa pemberian terapi dengan menggunakan ekstrak etanol kulit manggis dengan variasi dosis 200mg/kgBB, 400mg/kgBB dan 600mg/kgBB dapat memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap penurunan aktivitas protease pada tikus yang diberi paparan asap rokok. Tabel 5.1 menunjukkan berbeda nyata antara perlakuan kontrol dengan perlakuan paparan asap rokok terjadi peningkatan sebesar 301,2%. Perlakuan terapi dosis 200mg/kgBB, 400mg/kgBB dan 600mg/kgBB berbeda nyata dengan perlakuan paparan asap rokok terjadi penurunan aktivitas protease berturut-turut sebesar 18,16%, 38,58% dan 64,26%. Perlakuan kontrol tidak berbeda nyata terhadap perlakuan terapi dengan dosis 600mg/kgBB namun hasil yang didapat tidak sama melainkan mendekati normal.

Peningkatan aktivitas protease sebesar 301,2% disebabkan adanya akumulasi asap rokok yang menyebabkan inflamasi pada bronkus (Price and Wilson, 2006). Asap rokok mengandung berbagai bahan kimia antara lain nikotin, karbon monoksida. Rokok merupakan sumber utama dari radikal bebas yang berasal dari lingkungan (Yunaewati, 2004). Rokok termasuk bahan iritan yang akan memicu hipersekresi kelenjar mukosa brokus dan menyebabkan hipertrofi kelenjar mukosa dan menyebabkan pembentukan metaplastik sel goblet penghasil mukus di epitel permukaan bronkus.

Radikal bebas dari asap rokok menyerang membran sel yang terdiri dari komponen lipid dan protein. Aktivitas radikal bebas yang berlebihan akibat paparan asap rokok mengakibatkan stress oksidatif, sehingga kapasitas proteksi antioksidan menjadi tertekan. Iritasi asap rokok akan menyebabkan peningkatan sel-sel radang pada saluran napas. Aktivasi dari neutrofil juga dapat meningkatkan pembentukan radikal bebas.

Oksidan dalam asap rokok menimbulkan respon inflamasi dalam saluran pernapasan. Jejas sel epitel dan aktivasi makrofag menyebabkan lepasnya faktor kemotaktik yang mengikat neutrofil, lepasnya TNF α , IL-8, LTB $_4$, dan ROS dalam sirkulasi. IL-8 dan LTB $_4$ dikenal sebagai faktor kemotaktik neutrofil yang akan mengaktifkan dan merekrut neutrofil ke saluran napas. Makrofag dan neutrofil yang telah teraktivasi lalu melepaskan protease dan juga anion superoksid (O_2) yang bersama dengan *matrix metalloproteinase* (MMPs) dan neutrofil elastase mengakibatkan hipersekresi mukus, fibrosis, dan proteolisis

pada jaringan paru. Sel T CD8+ sitotoksik juga terlibat dalam proses inflamasi ini (Hansel dan Barnes, 2004).

Sel inflamasi akan mensekresikan sitokin proinflamasi sehingga mengaktifasi neutrofil. Neutrofil yang teraktivasi akan memproduksi ROS dan melepaskan protease ke dalam sel dan jaringan bronkus sebagai bentuk respon seluler. Proses fagositosis dapat menstimulasi produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*), peningkatan produksi ROS yang secara berlebihan mampu mengakibatkan terjadinya inflamasi pada jaringan. ROS merupakan molekul yang terbentuk karena adanya reaksi reduksi pada oksigen (O_2) yang dapat bersifat radikal. ROS berfungsi untuk menghancurkan sel-sel yang terinfeksi virus ataupun bakteri.

Peningkatan jumlah sel epitel bronkus akibat stress oksidatif, stress oksidatif diawali oleh pembentukan anion superoksid (O_2^-) oleh metabolisme mitokondria, stress oksidatif mengakibatkan bronkitis melalui mekanisme aktivasi *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) dan inaktivasi antiprotease. Stress oksidatif yang disebabkan oleh aktivasi *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR). Aktivasi EGFR akan mencegah apoptosis sel bersilia dan mengirim sinyal pada IL-13 untuk mendiferensial sel-sel bersilia menjadi sel goblet (Tyner, *et al.*, 2006).

Protease dapat diatasi dengan antiprotease endogen yang disebut Alfa1-antitripsin (AAT) sangat penting menghambat aktivitas protease yang terbentuk secara alami. Protease dihasilkan oleh bakteri, PMN, monosit, dan makrofag, sewaktu proses fagositosis berlangsung dan mampu memecahkan elastin dan makromolekul lain pada jaringan paru. Oksidan yang terkandung pada asap rokok menghambat alfa1-antitripsin (AAT) (Wilson, 2005).

Ekstrak etanol kulit manggis mengandung salah satunya senyawa xanton (Lampiran 2). Kandungan xanton yang diketahui terdapat jumlah yang cukup banyak pada kulit manggis. Xanton berfungsi sebagai antioksidan dan anti-inflamasi.

Penurunan aktivitas protease sebesar 64,26% terjadi setelah pemberian ekstrak etanol kulit manggis terutama pada terapi dengan dosis 600mg/kgBB yang hasil rata-rata aktivitas protease tidak berbeda nyata dengan kontrol. Kandungan yang terdapat dalam kulit manggis antara lain xanton, tanin dan antosianin, pada penelitian ini diutamakan adalah kandungan kulit manggis yang berupa xanton. Hasil penelitian Kasma Iswari (2005) dan sejumlah penelitian lainnya menunjukkan bahwa komponen seluruh buah manggis yang manfaat paling besar adalah kulitnya 70-75% sedangkan daging buahnya hanya 10-15% dan bijinya 15-20%.

Xanton adalah antioksidan kuat, yang sangat dibutuhkan untuk penyeimbang *pro-oxidant* di dalam tubuh, yang dikenal sebagai radikal bebas. Sejumlah peneliti menjelaskan, kulit manggis matang mengandung *polyhydroxyxanton*, yang merupakan derivat *mangostin* dan β -*mangostin*, yang berfungsi sebagai antioksidan, antibakteri, antitumor dan antikanker. Sifat antioksidan xanton melebihi vitamin E dan vitamin C, yang selama ini terkenal sebagai antioksidan tingkat tinggi .

Xanton merupakan senyawa *polifenol* alami yang terdapat di dalam tanaman, dan memiliki efek antioksidan (Mahabusarakam, *et al.*, 2000). Mekanisme kerja senyawa xanton ini adalah dengan cara menghambat produksi *ROS* intraseluler

secara signifikan (Moongkarndi, *et al.*, 2004). Penelitian Chomnawang, *et al.* (2007) menyebutkan bahwa ekstrak etanol kulit buah manggis mempunyai aktivitas antioksidan yang signifikan yang diukur dengan penghambatan pembentukan radikal bebas. Ekstrak etanol kulit manggis mampu menghambat 50% pembentukan radikal dan juga mereduksi produksi ROS dengan menghambat radikal *superoxide* (O_2) dan dapat menangkap radikal hidroksil (OH), namun kerjanya lebih kuat dalam menghambat radikal *superoxide* (Kosem, *et al.*, 2007).

Sel yang normal terjadi keseimbangan antara prooksidan dan antioksidan. Keadaan stress oksidatif merupakan keadaan dimana keseimbangan bergeser ke arah prooksidan karena produksi spesies oksigen meningkat. Stres tersebut berlangsung lama dapat mengakibatkan kerusakan sel yang menyebabkan cedera irreversibel dan sel yang terkena akan mengalami kematian (Murray, *et al.*, 2003).

Dari Tabel 5.2 diketahui bahwa semakin tinggi dosis terapi yang diberikan maka semakin menurun aktivitas protease. Hasil tersebut ditunjukkan dengan jumlah presentase penurunan sebesar 64,26%. Penurunan yang terjadi menunjukkan tidak berbeda nyata antara perlakuan terapi dosis 600mg/kgBB dengan keadaan kontrol.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Terjadi perubahan profil pita protein tikus kelompok paparan asap rokok terdapat profil pita protein dengan BM 79 kDa, 62 kDa, 49 kDa, 47 kDa, 42 kDa dan 23 kDa. Terdapat profil protein pada kelompok kontrol dan terapi dengan dosis 600 mg/kgBB dengan BM 91 kDa yang diduga protein STAT 1 dan profil protein dengan BM 26 kDa yang diduga sebagai protein Bcl-2.
2. Terapi ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 200mg/kgBB terjadi penurunan aktivitas protease sebesar 18,16%, dosis 400mg/kgBB terjadi penurunan aktivitas protease sebesar 38,58% dan dosis 600mg/kgBB terjadi penurunan aktivitas protease sebesar 64,24%. Terapi yang terbaik adalah dosis 600mg/kgBB.

6.2 Saran

Perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut dengan menggunakan Western Blotting, untuk menentukan protein STAT 1 dan Bcl-2 yang diduga muncul akibat perlakuan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aditama, T.Y. 2001. *Masalah Merokok dan Penanggulangannya*. Yayasan Penerbitan IDI. Jakarta. 3-19
- Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil Buletin Plasma Nutfah. 9 (2): 38-44.
- Anonim. 2006. Global Initiative for chronis obstructive lung disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD.
- Anonim. 2008. Global Initiative for chronis obstructive lung disease (GOLD). 2008. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD.
- Anwar Maruf, Soetjipto dan H. Nove. 2007. Studi Protein SHP1 dan SHP2 Yang Berperan Dalam Terminasi Signaling STAT (*Signal Transducers And Activatrors Of Transcription*) Yang Diaktifkan Hormon Pertumbuhan Melalui Teknik Blotting. Report. Unair
- AOAC. International. 2005. *Officials Methods Of Analysis Of AOAC International*. 2 vols. 16 edition. Arlington VA. USA. Association of Analytical Community.
- Arif, M. 2008. *Kapita Selekta Kedokteran*. Jilid 2. Edisi III. Mansjoer, Arif (Eds). Jakarta: Penerbit Media Aesculapius FK. UI
- Balmes J.R, I.B Tager and M.D Eisner. 2005. Air pollutant. In: Manson JR, Murray JF, Broaddus VC, Nadel JA, eds. Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders : pp.1800-14
- Benowitz, N.L. 2010. Nicotine Addiction. *N Engl J Med*; 362:2295-303.
- Bergmeyer H.U, J. Bergmeyer and M. Grassl. 1983. *Methods of Enzymatic Analysis Vol 2*. Weinheim : Verlag Chemie.
- Buist, S. 2006. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of COPD. In : NHLBI/WHO Global Initiative for COPD Workshop Summary

- Caprette, D.R. 2005. Preparing SDS-Gels. *Experimental Biosciences. Introductory Laboratory-Bios.* 211. Rice University
- Christyaningsih, J. 2003. Pengaruh Suplementasi Vitamin E dan C terhadap Aktivitas Enzim Super Oxide Dismutase (SOD) dalam Eritrosit Tikus yang Terpapar Asap Rokok Kretek. Thesis. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Christians E.S, Y. Liang-Jun dan I.J Benjamin. 2002. Heat shock factor 1 and heat shock proteins: Critical partners in protection against acute cell injury. *Critical Care Medicine*; 30(1): S43-S50.
- Chomnawang M, Surassmo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W. 2007. Effect of *Garcinia mangostana* on inflammation caused by propioni bacterium acnes, *Fitoterapia* 78:401-408
- Cunningham, W. 2003, Aging and photo-aging. in: Baran R, Maibach HI, (eds). *Textbook of Cosmetic Dermatology*, 2nd edn. London: Martin dunitz, pp. 455-67.
- Deshpande, S.S., P. Angkeow, J. Huang, M. Ozaki and K. Irani. 2000. Rac1 Inhibits TNF- α -Induced Endothelial Cell Apoptosis: Dual Regulation by Reactive Oxygen Species. *The FASEB Journal* 14 : 1705-1714.
- Dekhuijzen PNR. 1998. The role of oxidative stress in the pathogenesis of pulmonary diseases. *P News*;1:3-4
- Dewi, S. 2003. Penentuan Kadar Nikotin dalam Asap Rokok. makara kesehatan.
- Erez, E., D. Fass and E. Bibi. 2009. How Intramembrane Protease Bury Hydrolytic Reactions in the Membrane. *Nature*. 459:371-378
- Ernst. 2008. The Role of Complementary and Alternative Medicine. *BMJ*. 321:1133-1135
- Eka, N.A. 2011. Analisis Trend Pasien Rawat Inap Bronchitis Di RSUD dr. Soediran Mangun Sumarso Kabupaten Wonogiri Periode Tahun 2011. *Jurnal Kesehatan*, ISSN.1979-9551, VOL. V. NO.1. Hal 60-71
- Fitriani, L. 2008. Apoptosis. Universitas Sumatra Utara.
- Hansel TT, Barnes PJ. 2004. An atlas of chronic obstructive pulmonary disease. London: The Parthenon Publishing group.

- Ho, C.K, Y.L Huang and C.C Chen. 2002. Chemical Studies on Antioxidant Mechanism of Garcinol: Analysis of Radical Reaction Products of Garcinol with Peroxyl Radical and Their Antitumor Activities. *Tetrahedron*. 58 (51): 10095-10102.
- Iswari, K. 2011. *Kulit Manggis Berkhasiat Tinggi*. PT. Gramedia Pustaka Utama . Jakarta. 13-14
- Janson, J.C and L. Ryden. 2008. Protein Purification Principles, High-Resolution Methods and Applications, Second Edition. John Wiley & Sons, Inc : Canada.
- Jordheim, M. 2007. Isolation, Identifikation and Poperties of Pyranoanthocyanins and Anthocyanin Form. Disertasi. Norway : Department of Chemistry University of Bergen
- Juanda dan Cahyono. 2000. *Manggis Budidaya Dan Analisis Usaha Tani*. Kanisius.Yogyakarta
- Jung H.A, B.N Su, W.J Keller, R.G. Mehta and A.D Kinghorn. 2006. Antioxidant xanthenes from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *J Agric Food Chem*. 54(6):2077-2082
- Kamelia, R., S. Muliawati. dan N. Dessy. 2005. Isolasi dan Karakterisasi Protease Intaselular Termotabil dari Bakteri *Bacillus stearothermophilus* RP 1. Departemen Kimia ITB. Bandung.
- Kurniati, V dan S.I Wanandi. 2000. Pemisahan Protein dengan Elektroforesis Gel Poliakrilamid (SDS-Page). Panduan Pelatihan. Bagian Biokimia. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Kurniawan, A.N. 2002. Patologi Lingkungan dan Penyakit Lingkungan dalam : Pringgoutomo, S., Himawan, S., Tjarta, A. Eds. Buku Ajar Patologi. 1st ed. Sagung Seto, Jakarta : 293-8
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya
- Labra, M., E. Gianazza, R. Waitt, I. Eberini, A. Sozzi, S. Regondi, F. Grassi, and E. Agradi. 2005. Zea mays L. Protein Changes In Response To Potassium Dichromate Treatments. *Chemosphere* . 62 : 1234–1244.
- Kosim M. dan S.R. Putra. 2010. Pengaruh Suhu Pada Protease Dari *Bacillus subtilis*. Tugas Akhir, Jurusan Kimia, ITS, Surabaya.

- Mahabusarakam W, Proudfoot J, Taylor W, Croft K., 2000, Inhibition of lipoprotein oxidation by prenylated xanthenes derived from mangostin, *Free Radic Res.* , 33(5) :643-659.
- Manurung, Santa dkk. 2008. *Asuhan Keperawatan pada Pasien dengan Gangguan Sistem Pernapasan*. Jakarta : Salemba Medika.
- Miguel, H.B., F. MaryAnn and G. Giuseppe. 2008. Genetic markers in sporadic tumors. *Principles of Molecular Oncology*, pp. 83-84.
- Moongkardi P, N. Kosem , S. Kaslungka , O. Luanratana , N. Pongpan and N. Neungton. 2004. The Antioxidant Acitivity and Free Radical Scavenging Potential of Two Different Solvent Extracts of *Camellia Sinensis L.*, *Ficus bengalensis L.* and *Ficus racemosa L.* *Food Chemistry*. 56: 1000-1007
- Muhammad, I. 2009. Efek Antioksidan Vitamin C Terhadap Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan Akibat Pemaparan Asap Rokok [dissertation]. Bandung
- Murray, R. K. 2003. *Biokimia Harper*. Alih bahasa: Andry Hartono. Ed.25, Jakarta: EGC. Hal 96
- Nakatani, K. N Nakahata , T. Arakawa , H. Yasuda and Y. Ohizumi 2002. Antioxidant Capacities of *Pueraria minifica*, *Stevia Rebaudiana bertonii*, *Curcuma longa Linn.*, *Andrographis paniculata (Burm.f.) Ness* and *Cassia alata Linn.* For the development of dietary supplement. *Food Chemistry*. 41 (3): 548-554
- Nakatani, K, T. Yamakuni, N. Kondo, T. Arakawa, K. Oosawa, S. Shimura, H. Inoue and Y. Ohizumi. 2004. Gamma-Mangostin Inhibits IkappaB Kinase Activity and Decreases Lipopolysaccharide-Induced Cyclooxygenase-2 Gene Expression in C6 Rat Glioma Cells. *Mol Pharmacol*.
- NHLBI. 2001. Pathogenesis, Pathology and Pathophysiology. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management and Prevention of COPD. NHLBI/WHO Report. NHLBI.
- Paramawati, R. 2010. *Dasyatnya Manggis Untuk Menumpas Penyakit*. AgroMedia Pustaka. Jakarta. 8,58.

- Pillette, C.Y. Quadrhiri, V. Godding, J.P. Vaerman and Y. Sibille . 2001. Lung Mucosal Immunity : Immunoglobulin-A revisited. *Eur Respir J.* 18 : 571-88
- Price. A. Sylvia dan Wilson. M. Lorraine. 2006. *Patofisiologi Volume 2*. Jakarta. EGC.
- Rahmat, A, V. Kumar, L.M Fong, S. Endrini, and H.A Sani. 2003. Determination of total antioxidant activity in three types of local vegetables shoots and the cytotoxic effect of their ethanolic extracts against different cancer cell lines. *Asia Pasific J Clin Nutr* 12(3) : 292-295
- Samuel, C.E. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev.*, 14 (4), 778-809
- Sulastris, S. 2008. Pemanfaatan Protease Dari Akar Nanas Pada Proses Pembuatan Virgin Coconut Oil (VCO). Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Seeff L.B, K.L Lindsay and B. Bacon. 2002. Complementary and Alternative Medicine in Chronic Liver Disease. *Hepatology.* 34: 1097-1103
- Sianturi, G. 2003. Merokok Dan Kesehatan. www.kompas.com. [20 Oktober 2013]
- Sitepoe, M. 2000. *Kekhususan Rokok Indonesia*. PT. Gramedia Widiasarana. Jakarta
- Silalahi, J. 2002. Senyawa Polifenol Sebagai Komponen Aktif yang Berkhasiat dalam Teh. *Majalah Kedokteran Indonesia.* 52(10):361-400
- Singh, J.M. 2002. Corticosteroid Therapy for Patients With Acute Exacerbations of COPD, Review Article, *Arch Intern Med*/vol 162: Pp 2527-2536
- Snoeck, L.H.E.H, R.N. Cornelussen, F.A. Van Nieuwenhoven, R.S. Reneman, and A.G.J. Van der Vusse. Heat shock Protein and Cardiovascular Pathophysiology. *Physiological Rev.* 2001; 81(4):1461-85.
- Sudarsono, D. Gunawan dan S. Wahyuono. 2002. *Tumbuhan Obat II : Hasil Penelitian, Sifat-Sifat dan Penggunaan*. 186. Pusat Studi Obat Tradisional UGM. Yogyakarta.
- Suhartono, M.T. 2000. *Pemahaman Karakteristik Biokimia Enzim Protease dalam Menunjang Industri Berbasis Bioteknologi*. Buku Orasi Ilmiah Guru Besar Ilmu Dasar-Dasar Biokimia Dasar. Fateta IPB. Bogor.

- Suryo, J. 2010. Herbal *Penyembuh Gangguan Sistem Pernapasan*. B First. Yogyakarta. 15
- Susanna, D. 2003. Penentuan Kadar Nikotin dalam Asap Rokok. *Jurnal Ekologi Kesehatan*. 2(2).
- Tan Hoan Tjay, dan K. Rahardja. 2007. Obat-Obatan Penting Khasiat, Penggunaan, dan Efek-Efek Sampingnya. PT. Elex Media Komputindo. Jakarta
- Tashkin, D.P and C.B Cooper. 2004. The Role of Long-Acting Broncodilators in the Management of COPD. *Chest*; Pp 249-259
- Tewtrakul S., C. Wattanapiromsakul and W. Mahabusarakam. 2009. Effects of compounds from *Garcinia mangostana* on inflammatory mediators in RAW264.7 macrophage cells, *J Ethnopharmaco*, 121:379-382
- Tyner, J.W, E.Y. Kim and K. Ide. 2006. Blocking Airway Mucous Cell Metaplasia by Inhibiting EGFR Antiapoptosis and Il-13 Transdifferentiation Signals. *The Journal of in Airways Clinical Investigation*.116(2): 309-321.
- Walter, H.E. 1984. *Method with haemoglobin, casein, and azocoll as substrate* In. Bergmeyer. HU (ed). *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie. Deefield Beach Florida Basel.
- Weecharangsan, W, P. Opanasopit, M. Sukma, T. Ngawhirunpat, U. Sotanaphun and P. Siripong. 2006. Antioxidative and neuroprotective activities of extracts from the fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn). *Med Princ Pract*. 15(4):281-287.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta
- Williams, P, M. Ongsakul, J. Proudfoot, K. Croft and L. Beilin. 1995. Mangostin inhibits the oxidative modification of human low density lipoprotein. *Free Radic Res*. 23(2):175-184.
- Yuneawati, Y dan M. Ali. 2004. Pengaruh Paparan Asap Rokok Kretek Terhadap Peroksidasi Lemak dan System Proteksi Superoksid Dismutase Hepar Tikus Wistar. *Jurnal Kedokteran Yarsi*.
- Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekuler*. Jakarta: Erlangga.

LAMPIRAN

LAMPIRAN 1 SERTIFIKAT LAIK ETIK



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK

No: 187-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 : PENGARUH EKSTRAK ETANOL KULIT BUAH MANGGIS
(*Garcinia mangostana Linn*) TERHADAP PROFIL
PROTEIN DAN AKTIVITAS ENZIM PROTEASE DARI
BRONKUS TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG TERPAPAR
ASAP ROKOK

PENELITI : WISDIANI PUTRI

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

DINYATAKAN : LAIK ETIK

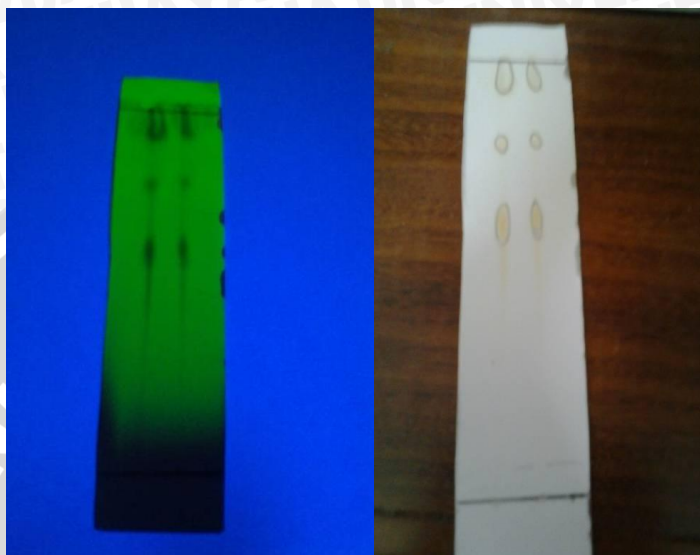
Malang, 6 Desember 2013
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

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



LAMPIRAN 2 HASIL UJI KLT

Hasil KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dan IR pada ekstrak etanol kulit manggis

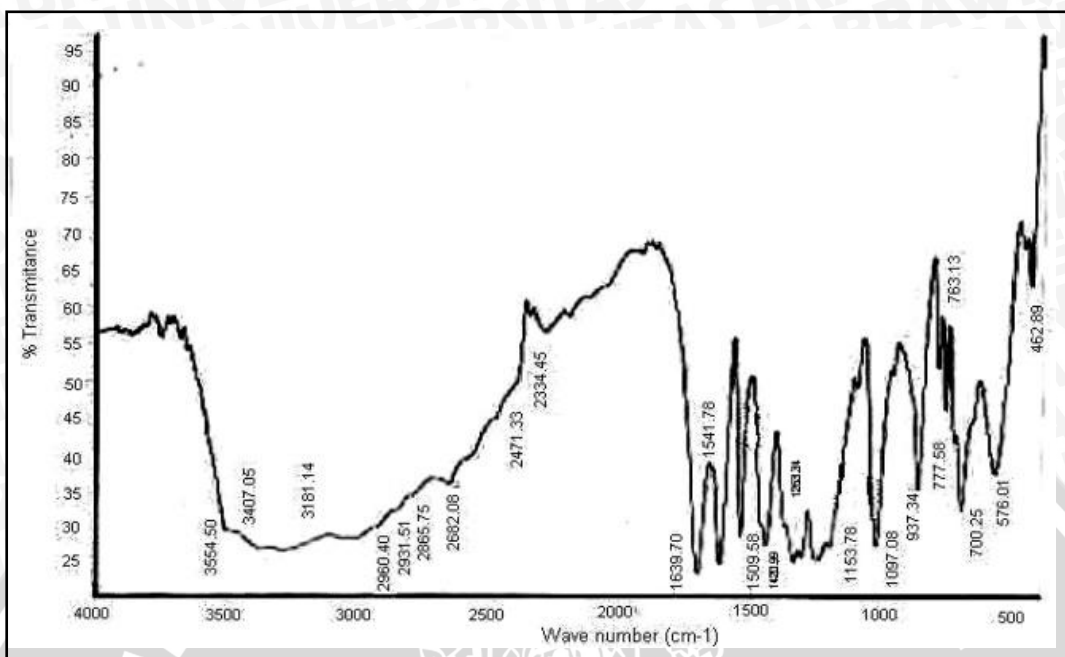


Gambar 14.1 Hasil KLT

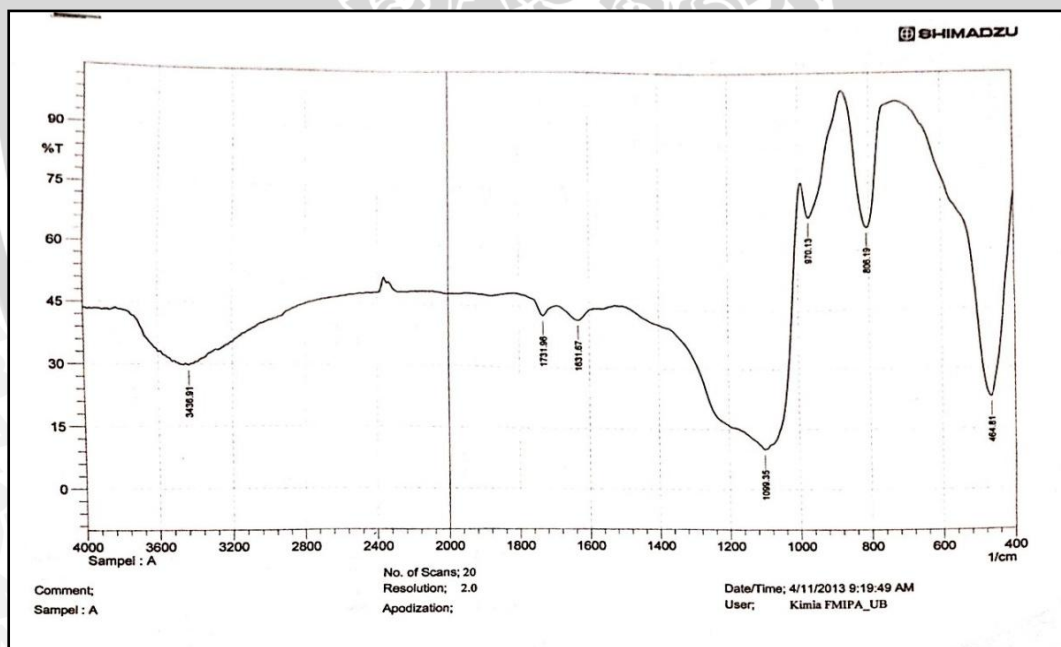
Table 14.1 Nilai Rf setiap titik ekstrak kulit manggis dengan metode TLC

| Spot | Distance of spot from the initial movement | | Rf Value |
|------|--|-------|----------|
| | Spot | Eluen | |
| A | 4,5 | 8 | 0,56 |
| B | 6,2 | 8 | 0,77 |
| C | 7,6 | 8 | 0,95 |

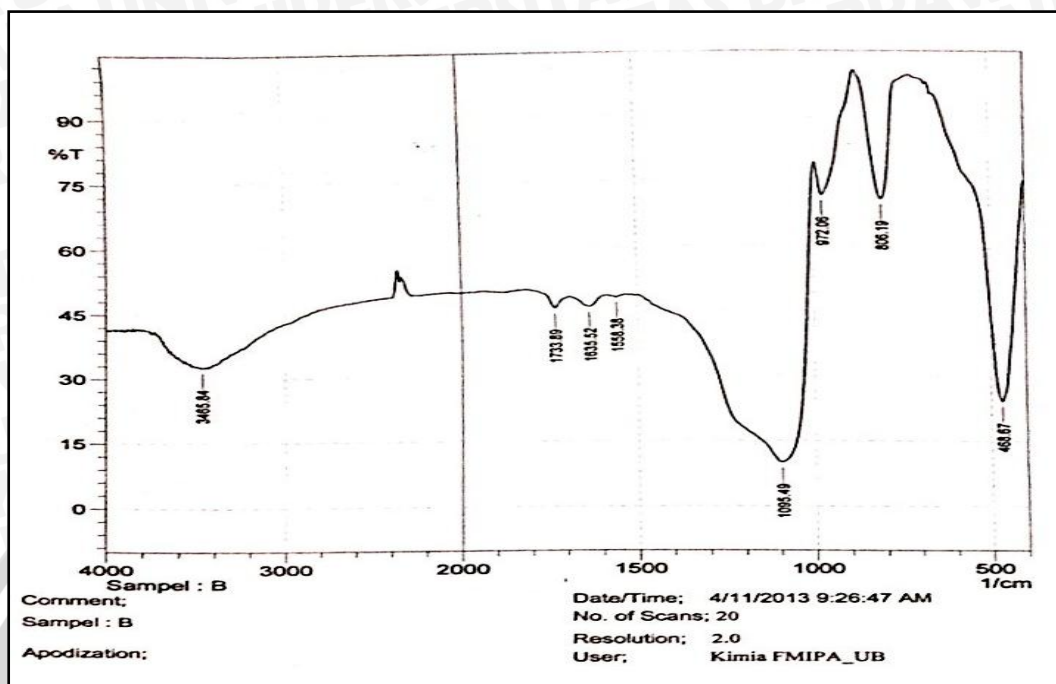
Untuk mengkonfirmasi gugus-gugus fungsi dari senyawa yang terkandung digunakan spektrum standar asam galat sebagai standar karena asam galat memiliki kerangka dasar sama dengan senyawa polifenol. Standar asam galat mempunyai range spektrum dengan absorbansi berkisar antara $426,89 \text{ cm}^{-1}$ sampai $3.554,50 \text{ cm}^{-1}$. Asam galat biasanya mengandung gugus-gugus fungsi seperti O-H, C-H, C=C, dan C-O.



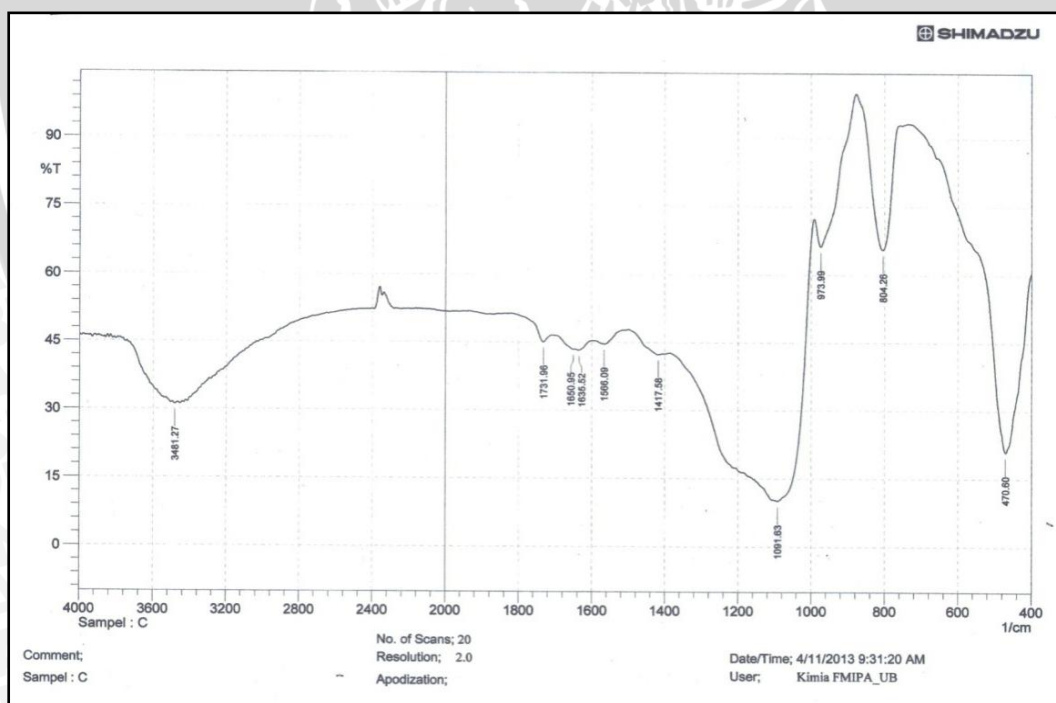
Gambar 14.2 Spektrum IR standar asam galat



Gambar 14.3 spektrum IR noda A hasil KLT ekstrak kulit buah manggis



Gambar 14.4 Spektrum IR noda B hasil KLT ekstrak etanol kulit buah manggis



Gambar 14.4 Spektrum IR noda C hasil KLT ekstrak etanol kulit buah manggis

Tabel 14.2 Interpretasi infrared absorption (IR) sample dan standar.

| No. | Wavelength (cm ⁻¹) | | | | | Interpretation |
|-----|--------------------------------|----------|----------------------|----------------------------------|--------------------------|---|
| | Spot A | Spot B | Spot C | Gallic acid standard | Reference | |
| 1. | 3.436,91 | 3.495,86 | 3.481,27 | 3.407,05 3.554,50 | 3200-365 | O-H (alcohol, phenol) |
| 2. | - | - | - | 2.960,40 2.931,51 2.865,75 | 2.850-3.000 | C-H aliphatic |
| 3. | 1.731,96 | 1.733,89 | 1.731,96 | - | 1.705-1.750 | C=O aldehyde, ketone, carboxylic acid and 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 aromatic |
| 6. | | 1.558,38 | 1.566,09 | 1.420,99 | 1.370-1.465 | C-H aliphatic |
| 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 (alcohol, eter, e3ster, and carboxylic acid) C-N amina |
| 8. | 806,19 | 806,19 | 804,26 | 777,58 763,13 | 690-900 | C-H aromatic |

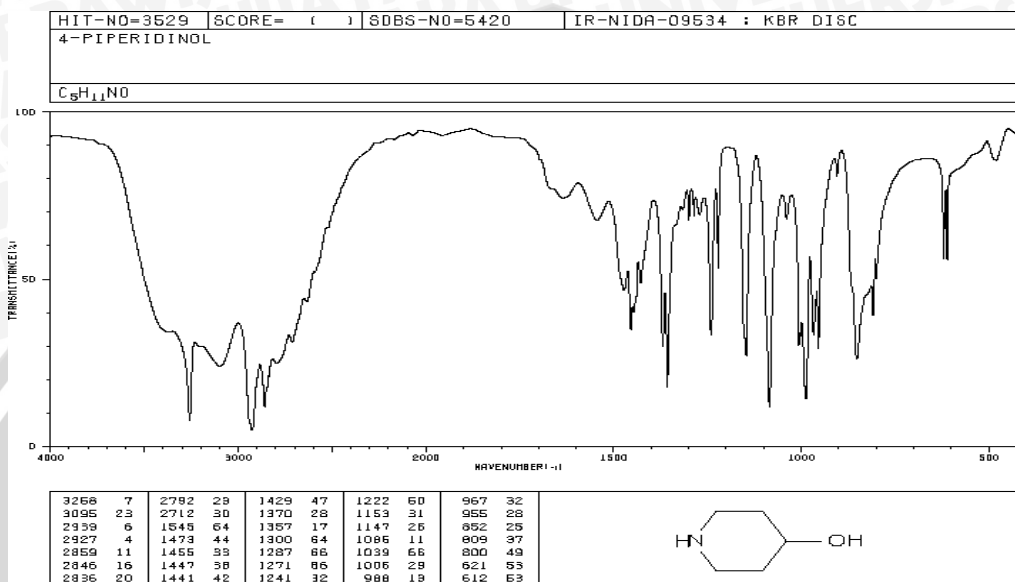
IR spektra dari spot A menunjukkan adanya absorpsi pada panjang gelombang $3.436,91\text{ cm}^{-1}$ yang mengindikasikan adanya gugus -OH . Absorpsi $1.731,96\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan C=O aldehyde, ketone, carboxylic acid and ester (Fig. 2). Absorpsi pada $1.631,67\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C=C alkena, $1.099,35\text{ cm}^{-1}$ meengindikasikan adanya C-O (alcohol, eter, ester, and carboxylic acid) & C-N amina, dan pada $806,19\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C-H aromatic. Jadi dapat disimpulkan bahwa isolat A mengandung beberapa komponen antara lain gugus -OH , C=O , C-O , C=C alkena dan C-H aromatik.

IR spektra dari spot B menunjukkan adanya absorpsi pada panjang gelombang $3.495,86\text{ cm}^{-1}$ yang mengindikasikan adanya gugus -OH . Absorpsi $1.733,89\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan C=O aldehyde, ketone, carboxylic acid and ester. Absorpsi pada $1.635,52\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C=C aromatik, $1.558,38\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C-H alifatik, $1.095,49\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C-O (alcohol, eter, ester, and carboxylic acid) & C-N amina, dan pada $806,19\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C-H aromatic. Jadi dapat disimpulkan bahwa isolat B mengandung beberapa komponen antara lain gugus -OH , C=O , C-O , C=C aromatik, C-H alifatik, dan C-H aromatik.

IR spektra dari spot C menunjukkan adanya absorpsi pada panjang gelombang $3.481,27\text{ cm}^{-1}$ yang mengindikasikan adanya gugus -OH . Absorpsi $1.731,96\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan C=O aldehyde, ketone, carboxylic acid and ester. Absorpsi pada $1.650,95\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C=C alkena, $1.635,52\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C=C aromatik, $1.566,09\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C-H alifatik. Serapan pada $1.417,58$ dan $1.091,63$ menunjukkan adanya C-O (alcohol, eter, ester, and carboxylic acid) & C-N amina dan pada $804,26\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C-H aromatic. Jadi dapat disimpulkan bahwa isolat C mengandung beberapa komponen antara lain gugus -OH , C=O , C-H alifatik, C-O , C=C alkena, C=C aromatik dan C-H aromatik.

Untuk mengkonfirmasi adanya golongan senyawa alkaloid, digunakan spektrum standar dari 4-piperidiniol karena senyawa ini merupakan senyawa golongan alkaloid sehingga dapat digunakan sebagai standar untuk senyawa alkaloid Alkaloid dapat mengandung satu atau lebih atom nitrogen. 4-piperidiniol.

Pada Gambar 4.5 terlihat serapan pada bilangan gelombang antara 612-3268 cm^{-1} . Gugus fungsi yang dimiliki alkaloid pada umumnya yaitu C-H alifatik dan C-N alkil amina.

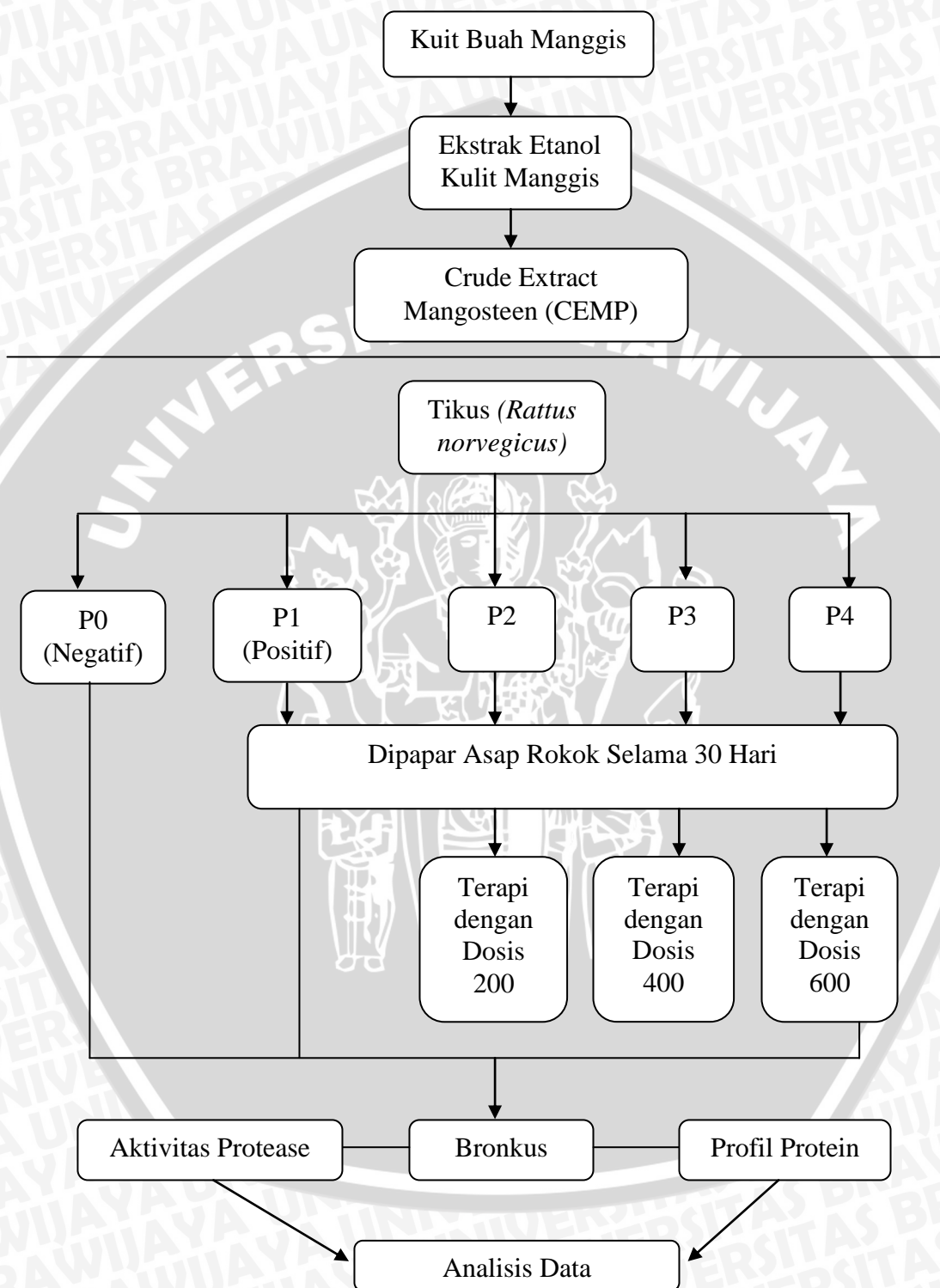


Gambar 14.5 IR spectra dari 4-piperidiniol standar

Berdasarkan hasil spektrum IR pada ketiga noda dibandingkan dengan spektrum standar 4-piperidiniol merupakan senyawa golongan alkaloid. Didapatkan C-H alifatik pada bilangan gelombang 1.558,38 dan 1.566,09, sedangkan C-N alkil amina pada bilangan gelombang 1.099,35; 1.095,49 dan 1.091,63.

Berdasarkan spectrum IR yang telah diperoleh, maka dapat disimpulkan bahwa senyawa yang terdapat dalam ekstrak dari kulit manggis mengandung komponen antara lain gugus -OH, C=C aromatik, C=C alkena, C-H aromatik, C-H alifatik, dan gugus C-O yang juga dikandung oleh kelompok senyawa phenolik/polifenol (flavonoid) dan C-N amina (alkaloid). berdasarkan spektrum IR noda B merupakan senyawa yang memiliki kemiripan gugus fungsi dengan standar asam galat yaitu senyawa polifenol dengan intensitas noda lebih besar dari noda A yang memiliki gugus fungsi O-H, C=C alkena, C=C aromatik, C-H alifatik, C-O dan C-H aromatik.

LAMPIRAN 3 SKEMA KERJA PENELITIAN



LAMPIRAN 4 PERHITUNGAN DOSIS

Rata – rata berat badan tikus adalah 200 gram

Jadi :

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

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

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

Dosis ekstrak :

Dengan bahan 95 gram didapatkan ekstrak sebanyak 27,6 mL

$$1 \text{ mL} = 3,442 \text{ gram} = 3,442 \text{ mg}$$

Konsentrasi CEMP adalah 3,44 gram/mL dan CEMP yang harus diambil :

$$[\text{CEMP}] = 3,44 \text{ gram/mL}$$

$$\text{Dosis 200} = \frac{0,04 \text{ mg}}{3,44 \text{ gr}} \times 1 \text{ mL} = 0,01163 \text{ mL}$$

$$\text{Dosis 400} = \frac{0,08 \text{ mg}}{3,44 \text{ gr}} \times 1 \text{ mL} = 0,02326 \text{ mL}$$

$$\text{Dosis 600} = \frac{0,12 \text{ mg}}{3,44 \text{ gr}} \times 1 \text{ mL} = 0,03488 \text{ mL}$$

Pemberian ekstrak untuk terapi dengan metode sonde

Pembuatan ekstrak untuk persediaan 15 ekor tikus/1 kelompok terapi :

$$\text{Dosis 200} = 0,01163 \text{ mL} \times 15 \text{ tikus} = 0,1745 \text{ mL (ekstrak)}$$

$$\text{Dosis 400} = 0,02326 \text{ mL} \times 15 \text{ tikus} = 0,3489 \text{ mL (ekstrak)}$$

$$\text{Dosis 600} = 0,03488 \text{ mL} \times 15 \text{ tikus} = 0,5232 \text{ mL (ekstrak)}$$

Pegenceran dilakukan dengan penambahan aquades :

$$\text{Dosis 200} = 14,825 \text{ mL}/15 \text{ tikus} \rightarrow 0,9883 \text{ mL/ekor}$$

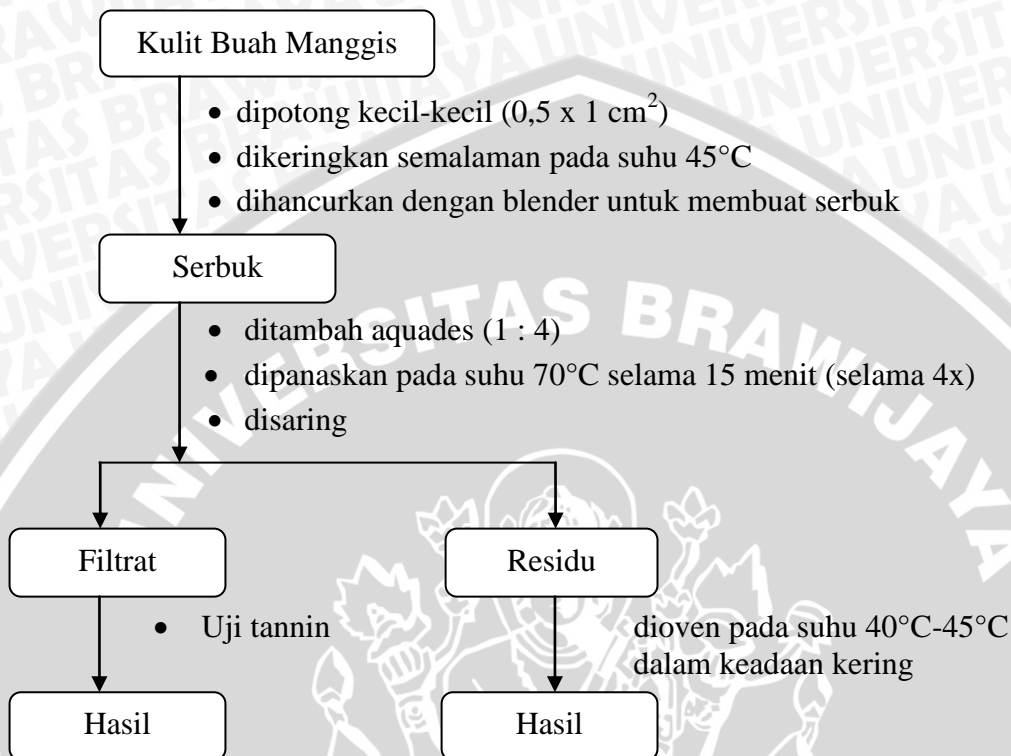
$$\text{Dosis 400} = 14,651 \text{ mL}/15 \text{ tikus} \rightarrow 0,9767 \text{ mL/ekor}$$

$$\text{Dosis 600} = 14,477 \text{ mL}/15 \text{ tikus} \rightarrow 0,9651 \text{ mL/ekor}$$

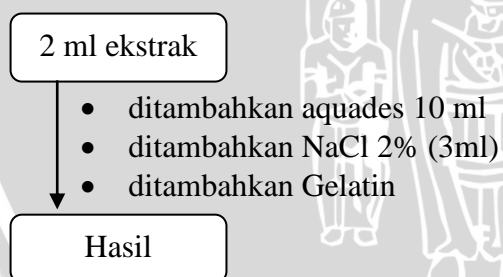
Pemberian terapi sebanyak 1 ml/ekor

LAMPIRAN 5

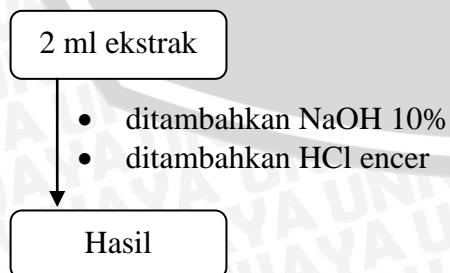
L.5.1 Pembuatan Ekstrak Kulit Manggis



L.5.2 Uji Tanin



L.5.3 Uji Flavonoid



L.5.4 Uji Terpenoid

0,5 ml ekstrak

- ditambahkan 2ml klorofom (CHCl_3)
- ditambahkan 2ml asam sulfat pekat

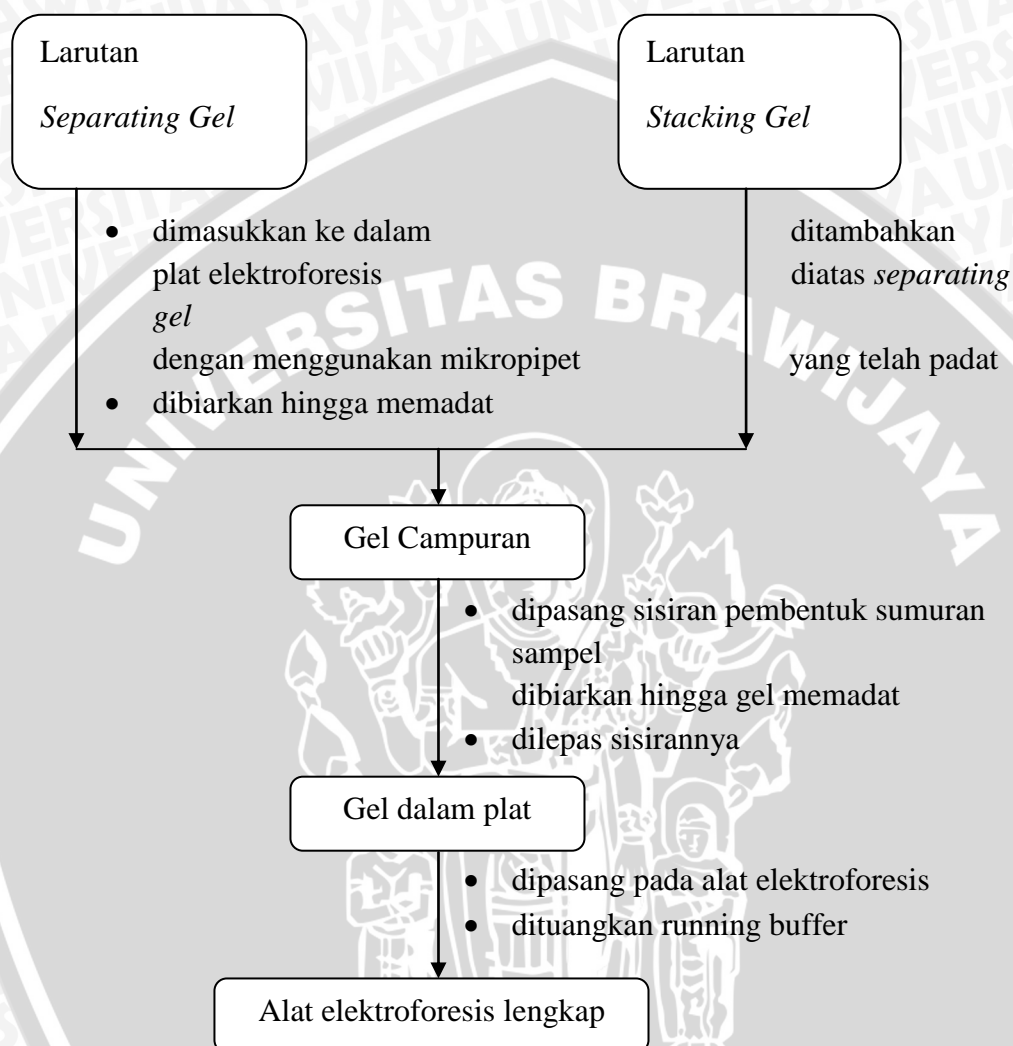
Hasil

L.5.5 Uji Alkaloid

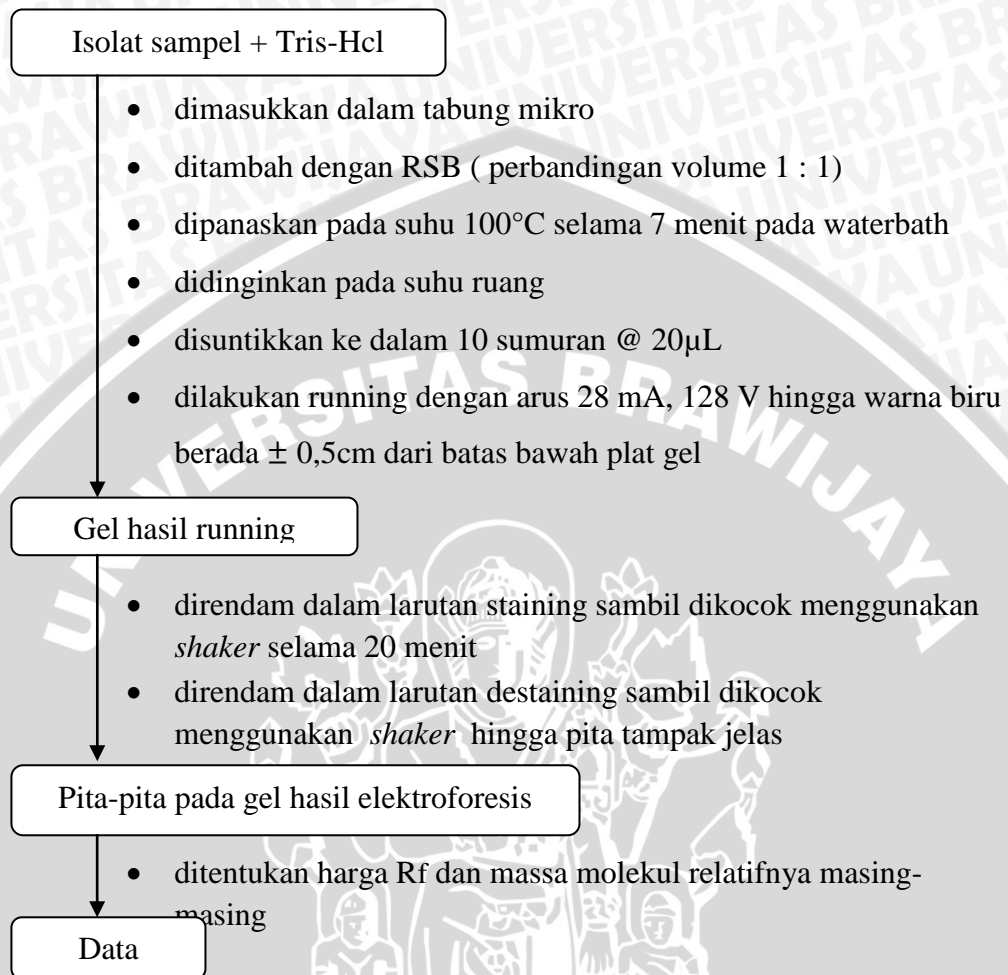
0,5 ml ekstrak

- ditambahkan 10 ml klorofom
- ditambah 10ml amonia 0,05 μl
- ditambah 1ml asam sulfat 2 μl
- dikocok hingga terbentuk 2 lapisan
- lapisan asam sulfat diambil dan ditambah pereaksi wagner

Hasil

LAMPIRAN 6 PROSEDUR PENENTUAN PROFIL PROTEIN**L.6.1 Persiapan Gel**

L.6.2 Injeksi Sampel dan Running



L.6.3 Penentuan Berat Molekul (BM)

Penentuan berat molekul dilakukan cara menghitung *Retardation factor* (Rf) atau *Mobilitas rate* (Mr) menggunakan rumus sebagai berikut :

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal (a)}}{\text{jarak pergerakan warna dari tempat awal (b)}}$$

Nilai Rf sebagai sumbu x dan massa molekul relative sebagai sumbu y sehingga diperoleh persamaan regresi linier $Y=ax+b$. Persamaan ini digunakan untuk menghitung massa molekul relative dari protein sampel. Berat molekul protein sampel didapatkan dengan menggunakan rumus $BM= \text{Antilog } Mr$ protein sampel.

LAMPIRAN 7 PENENTUAN AKTIVITAS PROTEASE

L.7.1 Pembuatan Larutan Kasein

0,025 g kasein

- dilarutkan dengan 25 mL aquades dan ditambah beberapa tetes larutan NaOH 1N
- diaduk dengan pengaduk magnetic
- dipindahkan dalam labu ukur 50 mL
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Larutan stok kasein 500 ppm

L.7.2 Pembuatan Larutan Stok Tirosin

0,025 g kasein

- dilarutkan dengan 25 mL aquades
- diaduk dengan pengaduk magnetic
- dipindahkan dalam labu ukur 50 mL
- diencerkan hingga tanda batas
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Larutan stok tirosin 500 ppm

L.7.3 Pembuatan Larutan Tirosin Standar

4 mL larutan baku tirosin 500 ppm

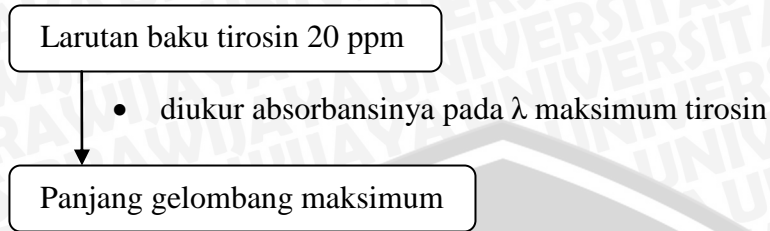
- dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Larutan baku tirosin 20 ppm

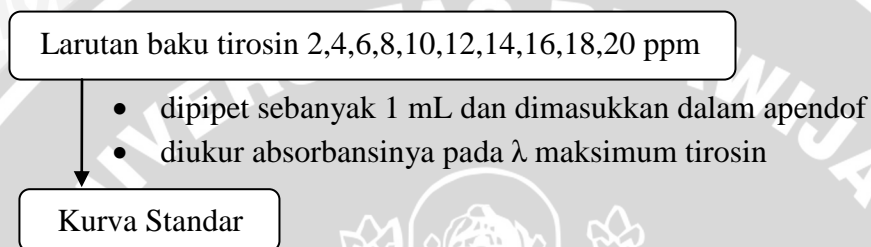
- dipipet berturut-turut 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 mL
- dimasukkan masing-masing larutan ke dalam labu ukur 10 mL
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Larutan baku tirosin 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20

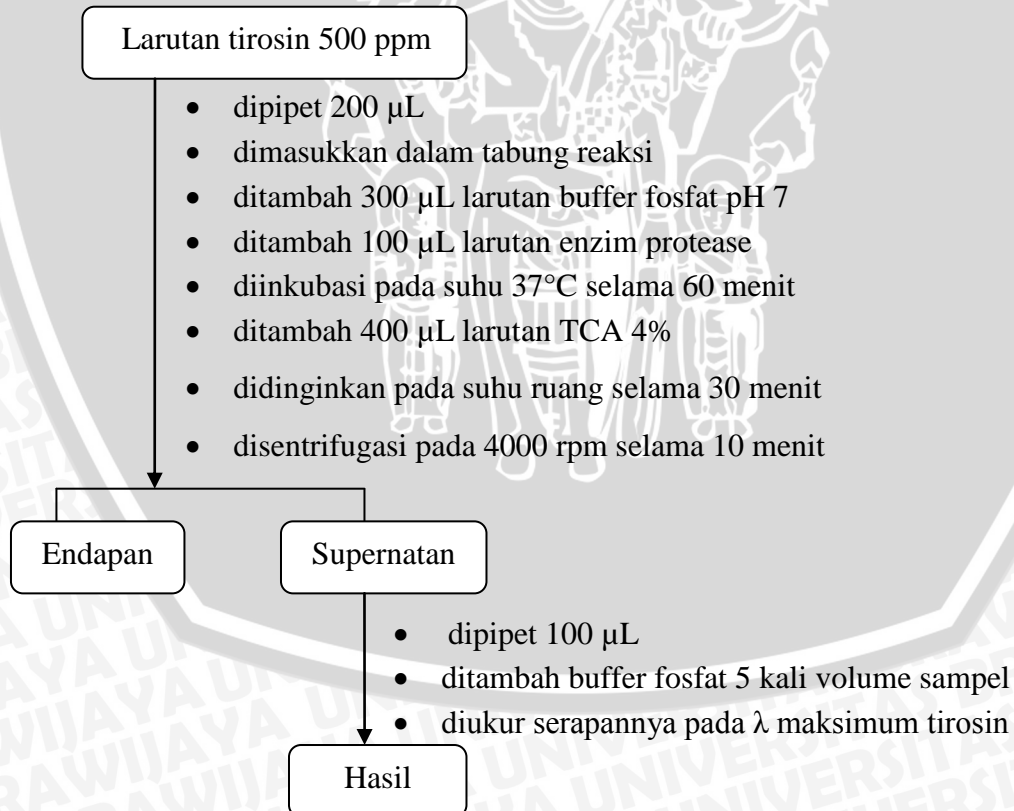
L.7.4 Penentuan λ maksimum Tirosin



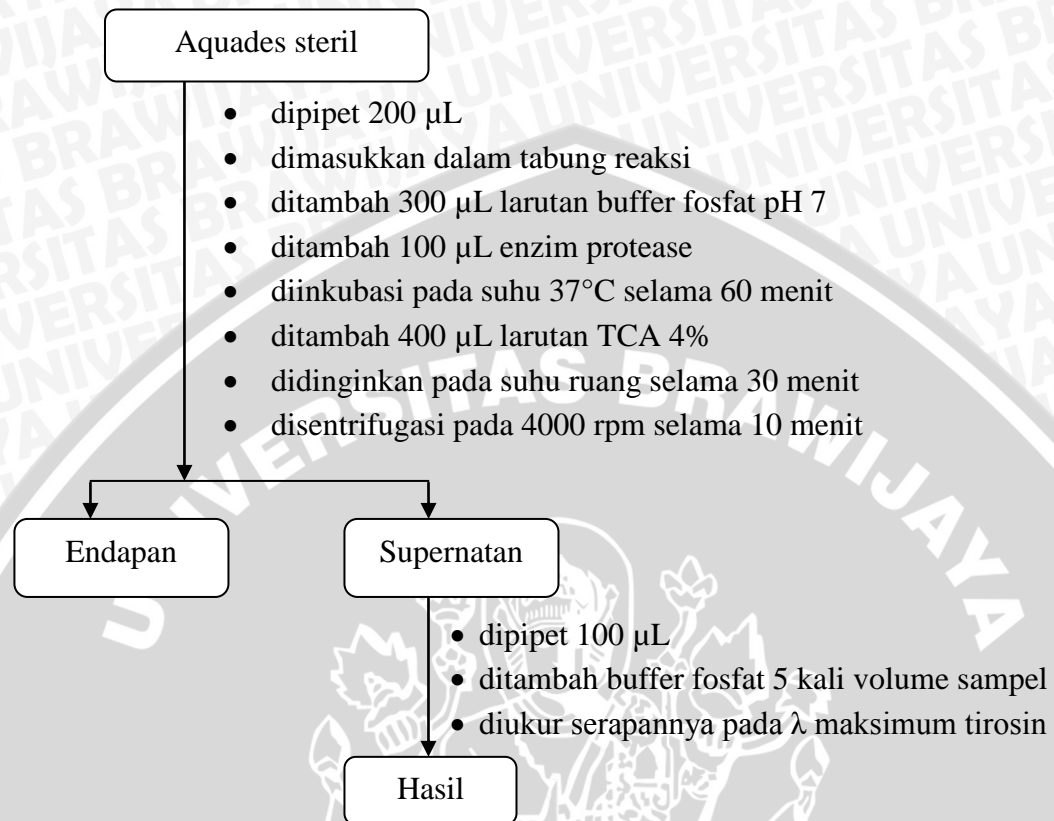
L.7.5 Pembuatan Kurva Standar



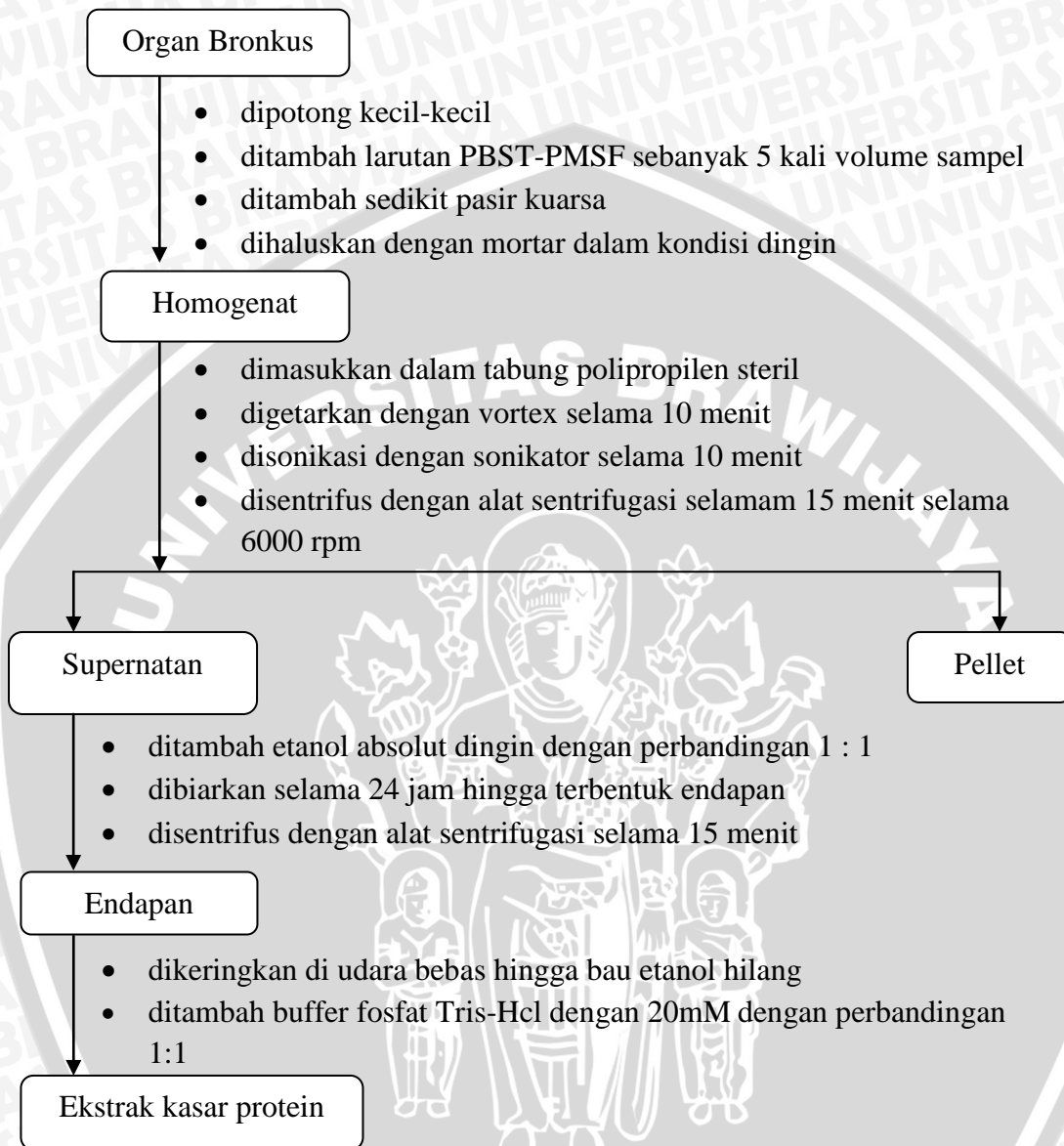
L.7.6 Pengukuran Aktivitas Protease



L.7.7 Pembuatan Larutan Blanko



L.7.8 Isolasi Protein

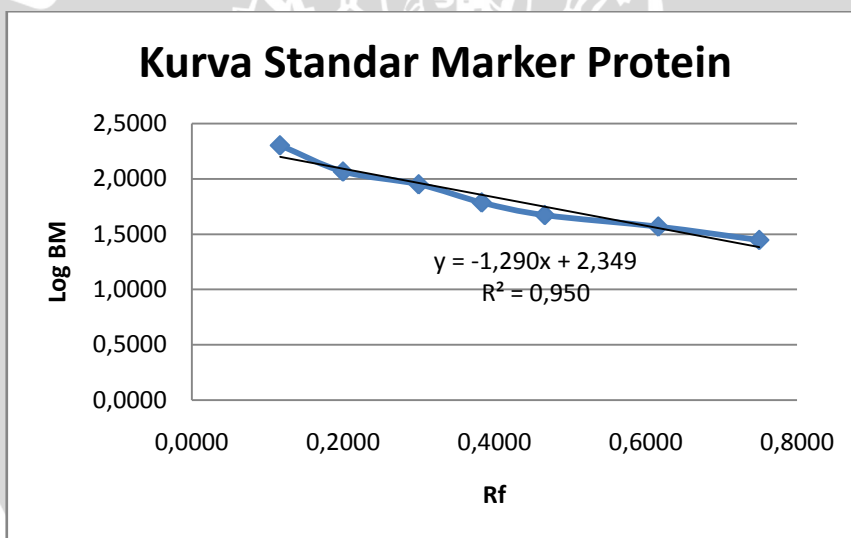


LAMPIRAN 8 PERHITUNGAN BERAT MOLEKUL

Untuk mengetahui Berat Molekul Marker (Tabel 8.1), terlebih dahulu membuat kurva baku protein standar (Marker).

Tabel 8.1 Berat Molekul Marker

| Pita ke | BM | log BM (y) | a | b | Rf (x) |
|---------|-----|------------|-----|---|--------|
| 1 | 200 | 2,3010 | 0,7 | 6 | 0,1167 |
| 2 | 116 | 2,0645 | 1,2 | 6 | 0,2000 |
| 3 | 89 | 1,9494 | 1,8 | 6 | 0,3000 |
| 4 | 61 | 1,7853 | 2,3 | 6 | 0,3833 |
| 5 | 47 | 1,6721 | 2,8 | 6 | 0,4667 |
| 6 | 37 | 1,5682 | 3,7 | 6 | 0,6167 |
| 7 | 28 | 1,4472 | 4,5 | 6 | 0,7500 |



Gambar 6.3.1 Kurva Standar Marker Protein

| pita ke- | Jarak Yang Ditempuh Oleh Pita (a) | | | | | b | Rf | | | | |
|----------|-----------------------------------|-----|-----|------|------|-----|------|------|------|------|------|
| | P0 | P1 | P2 | P3 | P4 | | P0 | P1 | P2 | P3 | P4 |
| 1 | 1,6 | | | | | 6,3 | 0,25 | | | | |
| 2 | 1,9 | | | 1,9 | 1,9 | 6,3 | 0,30 | | | 0,30 | 0,30 |
| 3 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 6,3 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 | 0,35 |
| 4 | 2,7 | 2,7 | 2,7 | 2,7 | 2,7 | 6,3 | 0,43 | 0,43 | 0,43 | 0,43 | 0,43 |
| 5 | 3,2 | 3,2 | 3,2 | 3,2 | 3,2 | 6,3 | 0,51 | 0,51 | 0,51 | 0,51 | 0,51 |
| 6 | | 3,3 | 3,3 | 3,3 | | 6,3 | | 0,52 | 0,52 | 0,52 | |
| 7 | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 6,3 | 0,56 | 0,56 | 0,56 | 0,56 | 0,56 |
| 8 | 4,55 | | | 4,55 | 4,55 | 6,3 | 0,72 | | | 0,72 | 0,72 |
| 9 | 4,8 | 4,8 | 4,8 | 4,8 | 4,8 | 6,3 | 0,76 | 0,76 | 0,76 | 0,76 | 0,76 |

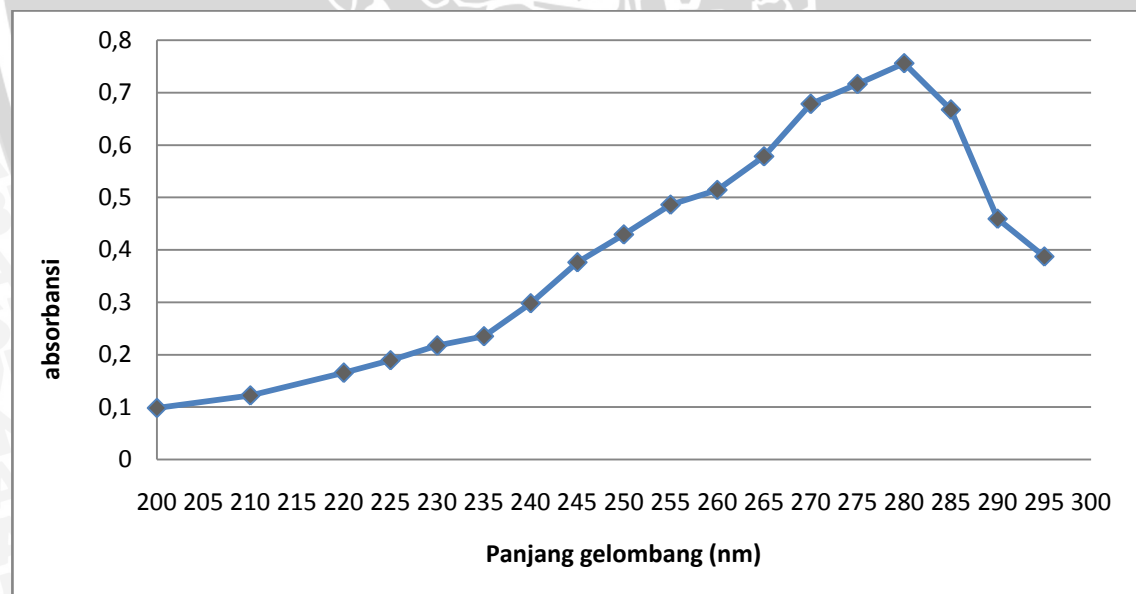
| LOG BM | | | | | BM | | | | |
|--------|------|------|------|------|--------|-------|-------|-------|-------|
| P0 | P1 | P2 | P3 | P4 | P0 | P1 | P2 | P3 | P4 |
| 2,02 | | | | | 105,06 | | | | |
| 1,96 | | | 1,96 | 1,96 | 91,20 | | | 91,20 | 91,20 |
| 1,90 | 1,90 | 1,90 | 1,90 | 1,90 | 79,17 | 79,17 | 79,17 | 79,17 | 79,17 |
| 1,80 | 1,80 | 1,80 | 1,80 | 1,80 | 62,54 | 62,54 | 62,54 | 62,54 | 62,54 |
| 1,69 | 1,69 | 1,69 | 1,69 | 1,69 | 49,40 | 49,40 | 49,40 | 49,40 | 49,40 |
| | 1,67 | 1,67 | 1,67 | | 47,12 | 47,12 | 47,12 | | |
| 1,63 | 1,63 | 1,63 | 1,63 | 1,63 | 42,88 | 42,88 | 42,88 | 42,88 | 42,88 |
| 1,42 | | | 1,42 | 1,42 | 26,13 | | | | 26,13 |
| 1,37 | 1,37 | 1,37 | 1,37 | 1,37 | 23,23 | 23,23 | 23,23 | 23,23 | 23,23 |



LAMPIRAN 9 PENENTUAN PANJANG GELOMBANG

Tabel 9.1 Absorbansi Larutan Standar Tirosin pada Berbagai Panjang Gelombang

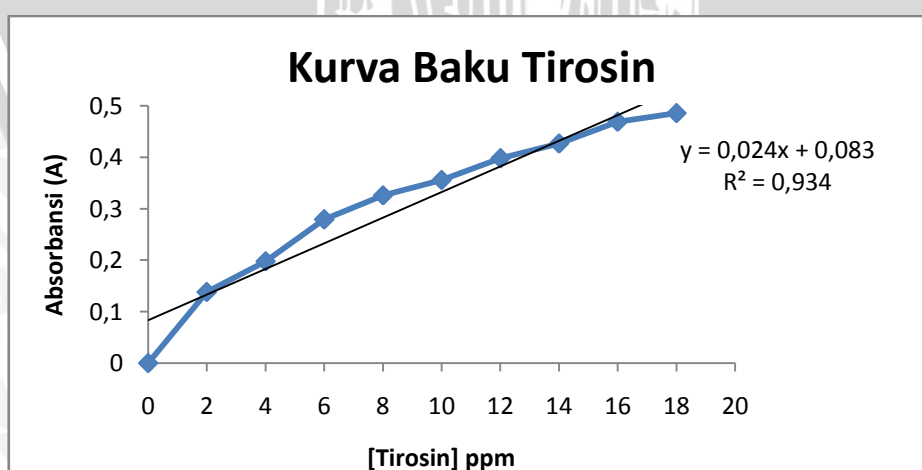
| λ (nm) | Absorbansi |
|----------------|------------|
| 200 | 0,098 |
| 210 | 0,122 |
| 220 | 0,165 |
| 225 | 0,189 |
| 230 | 0,217 |
| 235 | 0,235 |
| 240 | 0,298 |
| 245 | 0,376 |
| 250 | 0,429 |
| 255 | 0,486 |
| 260 | 0,514 |
| 265 | 0,578 |
| 270 | 0,678 |
| 275 | 0,716 |
| 280 | 0,756 |
| 285 | 0,667 |
| 290 | 0,459 |
| 295 | 0,387 |



Gambar 9.1 Kurva Panjang Gelombang

LAMPIRAN 10 PEMBUATAN KURVA STANDAR**Tabel 10.1** Absorbansi Larutan Standar Tirosin λ 280 nm

| Konsentrasi Tirosin (ppm) | Absorbansi |
|---------------------------|------------|
| 0 | 0 |
| 2 | 0,138 |
| 4 | 0,198 |
| 6 | 0,279 |
| 8 | 0,326 |
| 10 | 0,356 |
| 12 | 0,398 |
| 14 | 0,427 |
| 16 | 0,469 |
| 18 | 0,486 |
| 20 | 0,572 |

**Gambar 10.1** Kurva Standar Tirosin

LAMPIRAN 11 DATA HASIL AKTIVITAS ENZIM PROTEASE

| Kelompok | Ulangan | | | | |
|----------------------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | kontrol | 0,03 | 0,034 | 0,034 | 0,035 |
| paparan asap rokok | 0,12 | 0,121 | 0,166 | 0,127 | 0,132 |
| terapi dosis 200mg/kgBB | 0,109 | 0,111 | 0,124 | 0,098 | 0,103 |
| terapi dosis 400mg/kgBB | 0,078 | 0,085 | 0,094 | 0,072 | 0,08 |
| terapi dosis 600mg/kgBB | 0,056 | 0,05 | 0,055 | 0,042 | 0,035 |

LAMPIRAN 12 DATA DAN UJI STATISTIK AKTIVITAS ENZIM PROTEASE

Tabel 12.1 Uji Normalitas Data (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test)

| One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test | | |
|------------------------------------|----------------|----------|
| | | protease |
| N | | 25 |
| Normal Parameters ^a | Mean | .0810 |
| | Std. Deviation | .03926 |
| Most Extreme Differences | Absolute | .138 |
| | Positive | .138 |
| | Negative | -.097 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | .688 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | .731 |

Hasil pengujian normalitas nilai menunjukkan nilai signifikan (p) sebesar 0,731. Oleh karena nilai $p > 0.05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar dengan normal.

Tabel 12.2 Uji Homogenitas Varian

| protease | | | |
|------------------|-----|-----|------|
| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
| 1.996 | 4 | 20 | .134 |

Tabel 12.3 Uji statistik ANOVA untuk pengaruh asap rokok dan terapi ekstrak etanol kulit manggis terhadap aktivitas protease

| protease | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | .035 | 4 | .009 | 70.984 | .000 |
| Within Groups | .002 | 20 | .000 | | |
| Total | .037 | 24 | | | |

Tabel 12.4 Uji Tukey

| protease | | | | | |
|-------------|---|-------------------------|-------|-------|-------|
| Tukey HSD | | | | | |
| perlakuan | N | Subset for alpha = 0.05 | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| kontrol (-) | 5 | .0332 | | | |
| terapi 3 | 5 | .0476 | | | |
| terapi 2 | 5 | | .0818 | | |
| terapi 1 | 5 | | | .1090 | |
| kontrol (+) | 5 | | | | .1332 |
| Sig. | | .273 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |