

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Akar Seledri (*Apium graveolens*) Terhadap Aktivitas Protease Pada *Duodenum* Tikus (*Rattus norvegicus*) IBD Hasil Induksi Indometasin

Uji aktivitas protease dilakukan untuk mengetahui tingkat keparahan inflamasi pada *duodenum* tikus (*Rattus norvegicus*) hasil induksi indometasin dan setelah pemberian terapi ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens L.*). Aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai banyaknya mikro mol (μmol) tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis ikatan peptida pada kasein oleh protease hasil isolasi dari organ *duodenum* tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada kondisi optimum yaitu pH 6,5, suhu 37°C dan waktu inkubasi 60 menit (Ranuh, 2008). Hasil pengukuran aktivitas protease *duodenum* tikus *Rattus norvegicus* model IBD hasil induksi indometasin yang diterapi ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens L.*) (Tabel 5.1).

Tabel 5.1 : Penurunan aktivitas protease pada *duodenum* tikus *Rattus norvegicus* IBD pasca terapi ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens L.*)

Kelompok	Rataan aktivitas Protease ($\mu\text{mol/ml.menit}$)	Aktivitas Protease (%)	
		Peningkatan	Penurunan
Kontrol Negatif	0,0882 \pm 0,0037 ^a	-	-
Kontrol Positif	0,2051 \pm 0,0024 ^d	132,54	-
Terapi 100 mg/kg BB	0,1736 \pm 0,0040 ^c	-	15,36
Terapi 300 mg/kg BB	0,1259 \pm 0,0043 ^b	-	38,57

keterangan : Perbedaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan dengan nilai $p < 0,05$

Hasil analisa statistik SPSS 16 menggunakan ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan ($p < 0,05$) terhadap aktivitas protease yang ditunjukkan dengan adanya notasi yang berbeda pada uji lanjut Tukey (Tabel 5.1, Lampiran 13 dan Lampiran 14).

Nilai aktivitas protease pada kelompok kontrol negatif merupakan nilai aktivitas protease terendah yang berbeda secara signifikan ($p < 0.05$) dengan kelompok tikus IBD hasil induksi indometasin. Kelompok kontrol negatif digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan aktivitas protease pada kelompok tikus IBD hasil induksi indometasin dan terapi. Nilai Aktivitas protease pada kelompok kontrol negatif merupakan hasil samping proses metabolisme sel secara normal.

Pada kelompok IBD hasil induksi indometasin terjadi peningkatan aktivitas protease yang signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol negatif ditunjukkan dengan notasi yang berbeda. Induksi indometasin menyebabkan peningkatan aktivitas protease sebesar 132,54% (**Tabel 5.1**). Meningkatnya aktivitas protease mengindikasikan terjadinya inflamasi pada *duodenum* tikus *Rattus norvegicus* hasil induksi indometasin. Hal ini sesuai dengan penelitian Bures *et al.*, (2011) bahwa induksi indometasin dengan dosis 15mg/kg BB digunakan untuk membuat hewan model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) akut. Peningkatan aktivitas protease pada kelompok tikus IBD di karenakan Indometasin merupakan jenis *Non Steroidal Anti-Inflammatory Drug* (NSAID) yang mempunyai mekanisme kerja yaitu menghambat kerja enzim siklooksigenase 1 (COX-1) yang berfungsi untuk sintesis prostaglandin. Prostaglandin berfungsi merangsang sekresi mukus untuk perlindungan pada mukosa usus halus (Sulistia, 2009). Indometasin yang diserap oleh *duodenum* akan dikenali sebagai antigen luminal yang akan memicu peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) berupa radikal hidroksil (OH•), hidrogen peroksida

(H₂O₂), dan radikal nitrit oksida (NO•), hal ini memicu makrofag melakukan proses fagositosis untuk menstabilkan ROS.

Produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebih dapat menstimulus pengaktifan PKC- α untuk menstimulus pengaktifan NF- κ B yang merupakan faktor transkripsi yang mengatur ekspresi sel-sel sitokin pro-inflamator seperti TNF- α dan interleukin (IL-4, IL-13). TNF- α dihasilkan oleh proses transkripsi NF- κ B yang terjadi didalam nukleus. TNF- α akan menyebabkan inflamasi dan meningkatkan aktivasi neutrofil sedangkan interleukin (IL-4, IL-13) akan mengaktifkan sel B untuk memproduksi IgE agar mengaktifkan sel mast. Sel mast dan neutrofil yang teraktivasi akan menghasilkan protease sebagai respon terhadap adanya inflamasi (Zhang *et al.*, 2001, Champbell *et al.*, 2006). Oleh karena itu pengukuran aktivitas protease bisa digunakan untuk mengukur tingkat keparahan inflamasi, semakin tinggi nilai aktivitas protease maka semakin parah keadaan inflamasinya. Enzim protease berperan dalam perbaikan sel yang mengalami kerusakan dan membunuh bakteri pada jaringan yang mengalami inflamasi. Peningkatan aktivitas protease yang tidak terkontrol pada jaringan yang mengalami inflamasi dapat merusak sel maupun jaringan. Jenis protease yang terlibat dalam kerusakan jaringan adalah protein serin (elastase neutrofil) yang disekresi oleh neutrofil selama inflamasi (Bratawidjaya, 2010).

Hasil berbeda ditunjukkan pada tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok terapi 100 mg/kg BB yang mampu menurunkan aktivitas protease sebesar 15,36% dan secara statistik berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok tikus IBD

hasil induksi indometasin, yang dinyatakan dengan notasi yang berbeda dari hasil uji Tukey (**Tabel 5.1**). Penurunan aktivitas protease pada kelompok terapi menunjukkan adanya perbaikan inflamasi setelah pemberian terapi ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens L.*).

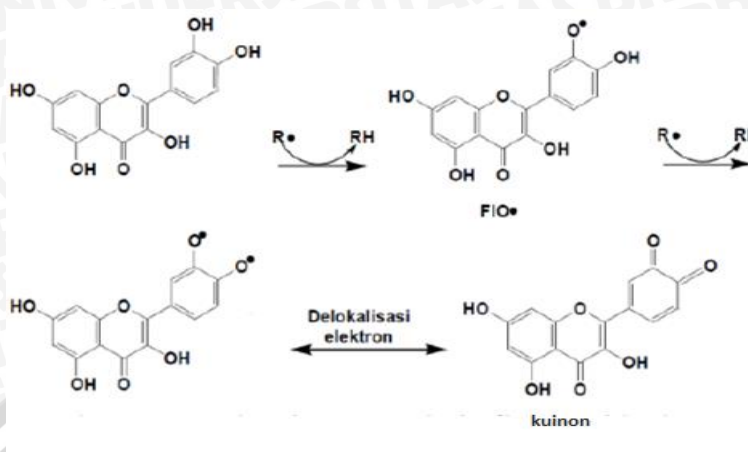
Kelompok terapi 300 mg/kg BB menunjukkan penurunan aktivitas protease sebesar 38,57% dan secara statistik berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok tikus IBD hasil induksi indometasin maupun kelompok terapi 100 mg/kg BB yang dinyatakan dengan notasi yang berbeda pada hasil uji Tukey (**Tabel 5.1**). Hasil tersebut menunjukkan terapi ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens L.*) dosis 300 mg/kg BB lebih efektif sebagai terapi *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dibandingkan terapi dosis 100 mg/kg BB, meskipun masih menunjukkan perbedaan yang nyata dengan Aktivitas protease tikus kelompok negatif.

Penurunan aktivitas protease pada kelompok terapi menunjukkan adanya perbaikan inflamasi setelah pemberian terapi ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens L.*). Penurunan aktivitas protease dikarenakan dalam ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens L.*) mengandung flavonoid yaitu *diosmin* yang bertindak sebagai antioksidan dan anti-inflamasi (**Lampiran 3**). Antioksidan berupa flavonoid *diosmin* pada ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens L.*) berfungsi sebagai *scavenger* radikal bebas yang berlebih pada *duodenum* akibat induksi indometasin.

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat reaksi oksidasi atau zat yang mampu menetralkan radikal bebas (Widjaya, 2003).

Antioksidan dibagi menjadi dua kelompok yaitu antioksidan non enzimatis yang didapat dari luar tubuh seperti flavonoid dan antioksidan enzimatis yang didapat di dalam tubuh. Produksi ROS dalam tubuh yang normal dapat diseimbangkan oleh enzim *Superoksida Dismutase* (SOD) (Droge, 2002). Radikal bebas (ROS) yang tinggi di dalam *duodenum* mengakibatkan antioksidan enzimatis endogen tidak dapat menyeimbangkan radikal bebas yang jumlahnya berlebih sehingga radikal bebas tersebut dapat menyebabkan kerusakan jaringan.

Antioksidan dalam ekstrak akar seledri (*Apium graveolens L.*) yang mengandung *diosmin* bertujuan sebagai non enzimatis yang berasal dari luar tubuh untuk menurunkan radikal bebas (ROS) pada usus halus dengan cara mendonasikan atom hidrogen (H) dari gugus hidroksil (OH) kepada radikal bebas (R•) sehingga flavonoid berubah menjadi radikal fenoksis flavonoid (FIO•) yaitu $(\text{Fl-OH} + \text{R}\bullet \rightarrow \text{FIO}\bullet + \text{RH})$. Radikal fenoksis flavonoid (FIO•) yang terbentuk akan diserang kembali oleh radikal bebas (R•) sehingga membentuk radikal fenoksis flavonoid yang kedua (FIO•), karena radikal fenoksis flavonoid punya ikatan rangkap yang terkonjugasi maka flavonoid mampu menyeimbangkan dengan cara delokalisasi elektron sehingga menjadi senyawa kuinon yang stabil seperti (**Gambar 5.1**) (Vermerris and Ralph, 2006; Meng *et al.*, 2010; Batutihe, 2010). Mekanisme tersebut menyebabkan penurunan pelepasan sitokin pro-inflamasi yang dilanjutkan dengan penurunan aktivitas protease pada *duodenum*.



Gambar 5.1 Mekanisme penghambatan ROS dan delokalisasi radikal elektron oleh Senyawa flavonoid (Vermeris and Ralph, 2006; Meng *et al.*, 2010; Batutihe, 2010).

5.2 Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Akar Seledri (*Apium graveolens L.*) Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) *Duodenum* Tikus (*Rattus norvegicus*) IBD Hasil Induksi Indometasin

Malondialdehida merupakan hasil akhir dari peroksidasi lipid serta penanda adanya stress oksidatif dalam tubuh. Terapi IBD menggunakan ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens L.*) dengan dosis 100 mg/kg BB dan 300 mg/kg BB mampu menurunkan kadar MDA pada *duodenum* tikus (*Rattus norvegicus*) hasil induksi indometasin (**Tabel 5.2**).

Tabel 5.2 : Penurunan kadar Malondialdehida pada *duodenum* tikus *Rattus norvegicus* IBD pasca terapi ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens L.*)

Kelompok	Rataan Kadar MDA ($\mu\text{mol/mL.menit}$)	Kadar MDA (%)	
		Peningkatan	Penurunan
Kontrol Negatif	2,412 \pm 0,367 ^a	-	-
Kontrol Positif	7,952 \pm 0,548 ^d	229,69	-
Terapi 100 mg/kg BB	5,966 \pm 0,569 ^c	-	24,97
Terapi 300 mg/kg BB	3,636 \pm 0,430 ^b	-	54,28

keterangan : Perbedaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan dengan nilai $p < 0,05$

Hasil analisa statistik SPSS 16 menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa terapi IBD dengan terapi ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens*

L.) pada *duodenum* tikus (*Rattus norvegicus*) dapat menurunkan kadar MDA secara signifikan ($p < 0,05$) ditunjukkan dengan notasi yang berbeda pada hasil uji lanjut Tukey (**Tabel 5.2, Lampiran 17 dan Lampiran 18**).

Pada kelompok kontrol negatif merupakan kadar MDA paling rendah yang berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok tikus IBD hasil induksi indometasin. Kadar MDA pada kelompok kontrol negatif digunakan untuk mengetahui keberhasilan terapi yang dilakukan. Hasil produk MDA dari kelompok sehat merupakan hasil samping proses metabolisme sel secara normal.

Pada kelompok kontrol positif terjadi kenaikan kadar MDA sebesar 229,69% dan secara statistik berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok negatif maupun kelompok terapi, yang dinyatakan dengan notasi yang berbeda dari hasil uji Tukey. Kadar MDA yang tinggi disebabkan oleh induksi indometasin yang mengakibatkan terjadinya peningkatan kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS). *Reactive Oxygen Species* terdiri atas radikal hidroksil (OH), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal nitrit oksida (NO). *Reactive Oxygen Species* merupakan senyawa yang bersifat reaktif karena mempunyai elektron yang tidak berpasangan (Halliwell and Whiteman, 2004). *Reactive Oxygen Species* (ROS) di dalam tubuh secara normal akan diseimbangkan oleh antioksidan endogen seperti *Superoksidase Dismutase* (SOD), namun dalam jumlah yang berlebih ROS dapat mengakibatkan terjadinya stress oksidatif, yaitu kondisi dimana tubuh melalui antioksidan endogen seperti SOD tidak mampu mengurai jumlah ROS yang berlebih di dalam tubuh (Winarsi, 2007). Kondisi ini mengakibatkan elektron tidak berpasangan dari ROS akan berusaha untuk menyeimbangkan

ikatan yang tidak stabil dengan cara mengikat atom hidrogen pada makromolekul seperti protein, karbohidrat dan lemak. Makromolekul yang paling rentan diikat oleh elektron tidak berpasangan ROS adalah *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) yang merupakan penyusun membran sel (Praptiwi, 2006).

Tingginya kadar MDA disebabkan oleh tingginya peroksidasi lipid yang secara tidak langsung menunjukkan tingginya kadar radikal bebas. Tingginya kandungan radikal bebas dalam jaringan yang tidak diimbangi oleh antioksidan akan menyebabkan stress oksidatif. Penelitian ini menunjukkan bahwa antioksidan pada ekstrak akar seledri (*Apium graveolens L.*) berperan sebagai zat yang mampu menetralkan radikal bebas dalam tubuh. Jadi semakin tinggi radikal bebas dalam jaringan akan berbanding lurus dengan tingginya stress oksidatif yang dapat memicu meningkatnya peroksidasi lipid dengan produk akhir MDA yang digunakan sebagai penanda (marker) kerusakan seluler akibat adanya radikal bebas. Prinsip pengukuran MDA adalah reaksi satu molekul MDA dengan dua molekul TBA (*Thiobarbituric acid*) membentuk senyawa kompleks MDA-TBA yang berwarna merah muda.

Menurut Retno (2012) dalam Prangdimurdi (2011), MDA merupakan produk akhir yang dapat digunakan untuk mengetahui derajat kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid hasil dari radikal bebas akan selalu membentuk reaksi berantai yang terus berlanjut sampai radikal bebas ini dihilangkan oleh sistem antioksidan dari tubuh. Terapi antioksidan yang digunakan adalah ekstrak etanol akar seledri (*Apium*

graveolens L.) yang memiliki kandungan flavonoid *diosmin* yang berfungsi untuk menurunkan kadar radikal bebas yang ada di dalam tubuh.

Pada kelompok terapi dosis 100 mg/kg BB terjadi penurunan kadar MDA sebesar 24,97% dan secara statistik berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok tikus IBD hasil induksi indometasin dan kelompok negatif, yang dinyatakan dengan notasi yang berbeda dari hasil uji Tukey (**Tabel 5.2**). Penurunan kadar MDA pada kelompok terapi 100 mg/kg BB menunjukkan adanya perbaikan inflamasi setelah pemberian terapi ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens* L.).

Pada Kelompok terapi 300 mg/kg BB terjadi penurunan kadar MDA sampai 54,28% dan secara statistik berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok tikus IBD hasil induksi indometasin maupun kelompok terapi 100 mg/kg BB yang dinyatakan dengan notasi yang berbeda pada hasil uji Tukey (**Tabel 5.2**). Hasil tersebut menunjukkan terapi ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens* L.) dosis 300 mg/kg BB lebih efektif sebagai terapi *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dibandingkan terapi dosis 100 mg/kg BB, meskipun masih menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kadar MDA tikus kelompok negatif. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa kandungan antioksidan dalam ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens* L.) yaitu *diosmin* mampu menurunkan radikal bebas yang pada penelitian ini terjadi pada penurunan kadar MDA.

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

ada dalam tubuh berpengaruh terhadap kerja antioksidan endogen. Tingginya stress oksidatif akan memicu terjadinya peroksidasi lipid, hal ini sama seperti yang dipaparkan dalam penelitian Evans (2000). Peroksidasi lipid merupakan proses oksidasi asam lipid tak jenuh rantai panjang (*Polyunsaturated Fatty Acid* atau PUFA) pada membran sel yang menghasilkan radikal peroksidasi lipid hidroperoksida dan produk aldehida misalnya MDA.

Antioksidan dalam ekstrak akar seledri (*Apium graveolen L.*) yang mengandung *diosmin* yang dapat menurunkan radikal bebas (ROS) pada usus halus dengan cara mendonasikan atom hidrogen (H) dari gugus hidroksil (OH) kepada radikal bebas (R•) sehingga flavonoid berubah menjadi radikal fenoksis flavonoid (FIO•) yaitu $(\text{Fl-OH} + \text{R} \cdot \rightarrow \text{FIO} \cdot + \text{RH})$. Radikal fenoksis flavonoid (FIO•) yang terbentuk akan diserang kembali oleh radikal bebas (R•) sehingga membentuk radikal fenoksis flavonoid yang kedua (FIO•), karena radikal fenoksis flavonoid punya ikatan rangkap yang terkonjugasi maka flavonoid mampu menyeimbangkan dengan cara delokalisasi elektron sehingga menjadi senyawa kuinon yang stabil. Mekanisme ini menyebabkan penurunan ROS yang diikuti dengan penurunan kadar MDA pada *duodenum*.