

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

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

Uji aktivitas enzim protease hasil isolasi dari organ jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan untuk mengetahui pengaruh paparan Indometasin terhadap tingkat keparahan IBD. Hasil pengukuran aktivitas protease jejunum tikus *Rattus norvegicus*, didapatkan data seperti yang terdapat pada (Tabel 5.1) sedangkan hasil pengukuran aktivitas protease secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 2.

Tabel 5.1 : Aktivitas protease jejunum tikus *Rattus norvegicus*

Kelompok	Rataan aktivitas Protease ($\mu\text{mol/mL.menit}$)	Aktifitas Protease (%)	
		Peningkatan terhadap Kontrol Negatif	Penurunan terhadap Kontrol Positif
Kontrol negatif	$0,0790 \pm 0,0055^a$	-	-
Induksi indometasin	$0,2173 \pm 0,0056^d$	174,83	-
Terapi 100 mg/KgBB	$0,1702 \pm 0,0139^c$	-	21,68
Terapi 300 mg/KgBB	$0,1189 \pm 0,0098^b$	-	45,28

Keterangan : Notasi a,b,c,d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan.

Nilai aktivitas protease pada kelompok kontrol negatif digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan atau penurunan yang terjadi karena pengaruh perlakuan. Hasil analisis penghitungan aktivitas protease menggunakan uji statistika SPSS 2.1 for windows nilai *p-value* ($p < 0,05$) yang dilanjutkan dengan uji

BNJ (Beda Nyata Jujur) didapatkan adanya perbedaan yang nyata antara perlakuan (Tabel 5.1 dan Lampiran L15.4).

Enzim protease bekerja sebagai biokatalis dalam reaksi pemecahan molekul protein dengan cara hidrolisis, sehingga enzim protease selalu ada dalam tubuh. Enzim protease secara normal terdapat dalam jaringan tubuh yang berperan dalam pertahanan tubuh yaitu pemecahan protein asing yang masuk ke dalam tubuh. Enzim protease juga berperan dalam perbaikan sel yang mengalami kerusakan dan membunuh bakteri pada jaringan yang mengalami inflamasi. Akan tetapi peningkatan jumlah protease pada jaringan yang mengalami inflamasi dapat menyebabkan aktivitas protease berlebih dan tidak terkendali, sehingga menyebabkan kerusakan sel (Bratawidjaya, 2010). Hasil penelitian ini mendapatkan data bahwa nilai aktivitas protease jejunum tikus pada kontrol negatif (normal) adalah $0,0790 \pm 0,0055$ nmol/mL.menit. Aktivitas protease jejunum tikus yang diinduksi indometasin 15 mg/kgBB terjadi peningkatan sebesar 174,83% jika dibandingkan dengan tikus kontrol negatif.

Peningkatan aktivitas protease mengindikasikan bahwa telah terjadi inflamasi pada jejunum tikus yang diinduksi indometasin. Hal ini sesuai hasil penelitian Aulanni'am (2012) bahwa induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB dapat menyebabkan IBD akut pada jejunum. Indometasin merupakan jenis *Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs* (NSAIDs) yang mempunyai mekanisme kerja yaitu menghambat kerja enzim siklooksigenase (COX), yang merupakan enzim yang berfungsi sebagai sintesis prostaglandin. Produksi prostaglandin menurun menyebabkan berkurangnya perlindungan terhadap mukosa barrier jejunum,

sehingga memudahkan invasi bakteri patogen (Takeuchi *et al.*, 2003). Kondisi ini yang menyebabkan proses inflamasi menjadi lebih parah.

Pada kelompok tikus IBD terjadi peningkatan aktifitas protease. Hal ini diyakini karena induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB dapat mengaktifkan makrofag yang berperan dalam respon imun mukosa jejunum yang dikenali sebagai antigen luminal. Indometasin akan memicu peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) berupa radikal hidroksil (OH•), hidrogen peroksida (H₂O₂), dan radikal nitrit oksida (NO•). Senyawa reaktif ini memiliki elektron bebas yang tidak berpasangan dan bersifat reaktif dalam tubuh. Radikal bebas didalam tubuh secara normal akan diseimbangkan oleh antioksidan endogen tubuh yaitu *Superoksidase Dismutase* (SOD), banyaknya jumlah radikal bebas didalam tubuh menyebabkan ketidakseimbangan antara antioksidan endogen dengan jumlah radikal bebas sehingga terjadi stress oksidatif. Terjadinya stress oksidatif menyebabkan elektron yang bebas berusaha untuk menyeimbangkan dengan cara menyerang atom hidrogen pada makromolekul dalam jaringan seperti protein, lemak dan karbohidrat. Hilangnya atom hidrogen pada makromolekul sel dapat menyebabkan ketidakseimbangan sel sehingga zat - zat disekitar sel bisa keluar masuk yang dapat membuat kerusakan jaringan. Adanya kerusakan jaringan akan menyebabkan aktivasi neutrofil dan melepaskan enzim protease (Bures *et al.*, 2011).

Produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebih juga dapat pengaktifan NF-κB yang merupakan faktor transkripsi yang mengatur ekspresi sel - sel sitokin proinflamator seperti TNF-α, IL4, IL12, dan IL13. Adanya TNF-α yang

berlebih pada sel akan menyebabkan inflamasi dan meningkatkan aktivasi neutrofil. IL4 dan IL 13 akan mengaktifkan sel B, sehingga akan memproduksi IgE untuk 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.

Pemberian terapi ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens*) dosis 100 mg/KgBB dan 300 mg/KgBB menunjukkan penurunan aktifitas protease sebesar 21,68 % dan 45,28%. Hal ini menunjukkan bahwa dosis 300 mg/KgBB pada perlakuan merupakan dosis yang terbaik dalam menurunkan IBD. Namun dosis 300 mg/KgBB secara statistik masih berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan tikus kelompok kontrol negatif IBD. Maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis agar diperoleh dosis yang efektif. Perubahan aktifitas protease ini membuktikan bahwa terapi ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens*) mengandung antioksidan yang mampu menekan radikal bebas akibat induksi indometasin.

Penurunan kadar protease pada kelompok terapi menunjukkan adanya perbaikan inflamasi setelah pemberian terapi ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens*). Penurunan kadar aktivitas protease dikarenakan dalam ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens*) mengandung flavonoid yang berperan sebagai antioksidan dan anti - inflamasi yang mampu memperbaiki inflamasi. Antioksidan berupa flavonoid pada ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens*) berfungsi sebagai *scavenger* radikal bebas yang berlebih pada jejunum akibat induksi

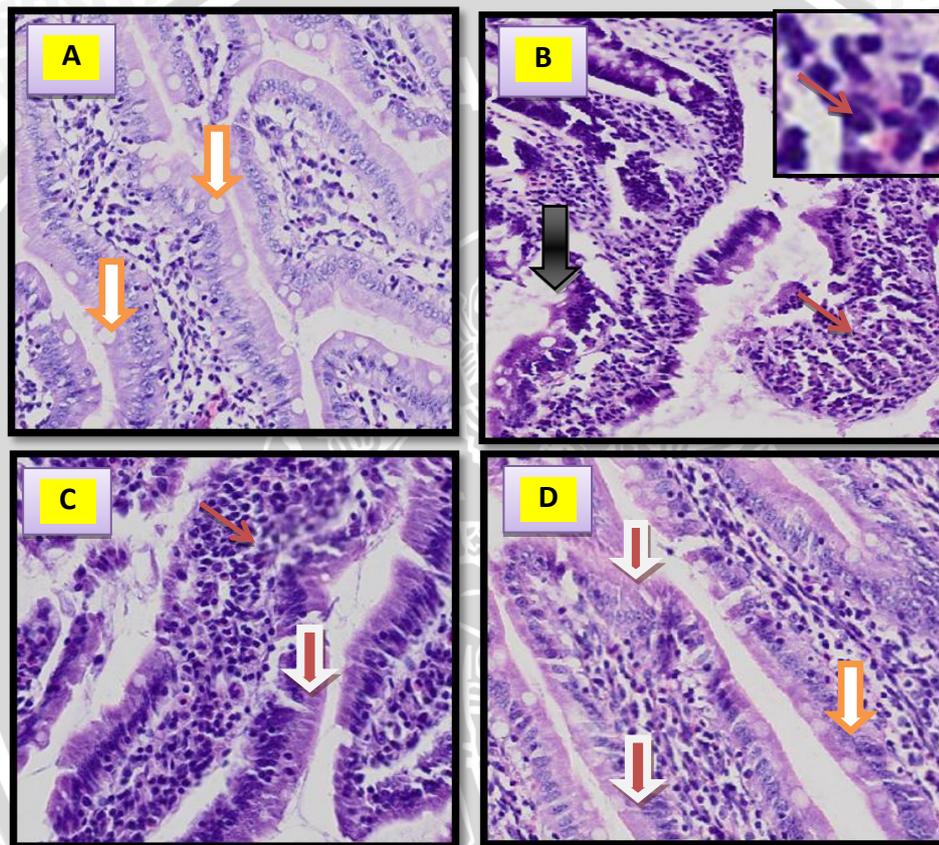
indometasin. Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat reaksi oksidasi atau zat yang mampu menetralkan radikal bebas (Widjaya, 2003).

Mekanisme kerja dari flavonoid (FI-OH) sebagai antioksidan yaitu dengan cara mendonasikan atom hidrogen (H) dari gugus hidroksil (OH) kepada radikal bebas (R•) sehingga flavonoid berubah menjadi radikal fenoksis flavonoid (FIO•) yakni $(FI - OH + R\bullet \rightarrow FIO\bullet + RH)$. 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 mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi maka dapat menyeimbangkan dengan cara delokalisasi elektron sehingga menjadi senyawa kuinon yang stabil.

Efek radikal bebas yang diredam oleh senyawa flavonoid, maka ROS dalam jejunum akan berkurang atau hilang. Hilangnya radikal bebas dapat menekan pembentukan NF-kB yang merupakan faktor transkripsi sejumlah gen penting dalam proses imunitas dan inflamasi, salah satunya untuk membentuk TNF- α (Chattopadhyay *et al.*, 2006). Tidak teraktivasinya TNF- α maka aktivasi neutrofil yang berfungsi sebagai imunitas pertama akan menurun. Penurunan neutrofil akan menekan aktifitas neutrofil untuk pelepasan protease, sehingga aktivitas protease pada jejunum dapat menurun.

5.2 Pengaruh Terapi Ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens*) Terhadap Perbaikan Gambaran Histopatologi Pada Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) IBD Hasil Induksi Indometasin

Dalam penelitian ini untuk mengetahui pengaruh terapi ekstrak etanol akar seledri juga dilihat berdasarkan gambaran histopatologi dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE) dengan hasil seperti Gambar 5.1



Gambar 5.1 : Gambaran Histopatologi jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan HE dengan perbesaran 400X.

Keterangan : (A) kelompok kontrol sehat (B) kelompok kontrol sakit (C) kelompok terapi 100 mg/KgBB (D) kelompok terapi 300 mg/KgBB.

Tanda :  : Deskuamasi epitel

 : Perbaikan epitel

 : Infiltrasi sel radang

 : Sel Goblet

Pada gambaran histologi jejunum normal memiliki ukuran vili lebih kecil, terdapat sel goblet pada tunika mukosa, serta susunan antar vili rapi dan rapat, (Gambar 5.1A). Secara umum struktur utama jejunum adalah membran mukosa,

lamina propia, submukosa, jaringan limfatik, serosa dan lapisan muskular. Sel epitel jejunum menutupi seluruh permukaan bebas dari membran mukosa dan berbentuk epitel silindris sebaris (Xu, 2003). Menurut (Geboes, 2003) jejunum normal memiliki mukosa dengan vili yang tersusun rapat, sel epitel kolumnar, lapisan submukosa, lapisan muskuler, dan lapisan serosa. Gambaran histologi ini dijadikan patokan adanya perubahan dan kerusakan yang terjadi pada kelompok perlakuan.

Hasil gambaran histopatologi pada kelompok yang diinduksi indometasin (Gambar 5.1 B) menunjukkan adanya abnormalitas struktur jejunum dan kerusakan sel epitel pada jejunum. Ditandai dengan infiltrasi sel radang, deskuamasi epitel sehingga jarak vili terlihat melebar dan berkurangnya sel goblet. Hal ini disebabkan karena jejunum mengalami inflamasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Geboes (2003) bahwa pada inflamasi pada jejunum ditandai dengan adanya kerusakan pada lapisan mukosa berupa kerusakan vili, deskuamasi epitel, pelebaran lamina propia, banyaknya infiltrasi sel radang dan hilangnya sel goblet. Menurut Lanan dan Scarpignato (2006) pemberian obat-obatan NSAIDs seperti indometasin dengan dosis 15 gram/kg BB dapat menyebabkan kerusakan vili dan mukosa di usus.

Deskuamasi epitel disebabkan karena pada vili terjadi erosi epitel dimana terjadi perlepasan epitel yang menempel pada membran basalis sehingga jarak antar vili terlihat melebar. Erosi epitel yang terjadi juga menyebabkan sel goblet rusak dan menghilang karena sel goblet berada pada epitel. Sel goblet berfungsi menghasilkan mukus sebagai proteksi terhadap bakteri patogen (Geboes, 2003).

Erosi epitel ini disebabkan karena berkurangnya sekresi mukus yang berfungsi melindungi mukosa jejunum sehingga epitel mudah mengalami kerusakan.

Menurut Lanas dan Scarpignato (2006) gambaran histopatologi jejunum yang diinduksi indometasin akan mengalami kerusakan pada vili dan lapisan mukosa. Histopatologi jejunum yang mengalami inflamasi juga memperlihatkan adanya ruang antar vili dan jarak antar vili menjadi lebih lebar, adanya kerusakan pada lapisan mukosa, pembesaran pembuluh darah, hilangnya sel goblet dan adanya ulcer (Geboes, 2003; Tamtomo, 2008).

Kerusakan yang terjadi pada jaringan mukosa organ jejunum tikus model IBD dikarenakan induksi indometasin dosis 15 mg/kg BB. Indometasin yang masuk dalam tubuh akan mengaktifkan makrofag, sel mast dan leukosit untuk pelepasan enzim protease dan radikal bebas yang mampu menyebabkan inflamasi dan kerusakan jaringan jejunum (Bratawidjaya, 2010).

Indometasin juga memiliki efek samping yaitu menurunkan sintesa prostaglandin sehingga akan mengurangi jumlah produksi mucus yang berfungsi sebagai proteksi terhadap bakteri patogen. Indometasin menyebabkan penurunan prostaglandin mukosa (inhibisi COX-1) sehingga tidak ada perlindungan terhadap barrier mukosa serta peningkatan motilitas usus yang dilanjutkan dengan adanya infeksi enterobakteri. Infeksi bakteri menyebabkan aktivasi makrofag, aktivasi neutrofil, induksi iNOS, produksi radikal NO^{\cdot} , pembentukan peroksi nitrit (RNS) dan pembentukan oksigen radikal (ROS) sehingga menyebabkan kerusakan usus. Penghambatan COX-1 sebenarnya dapat meningkatkan pengaturan ekspresi COX-2, tetapi karena indometasin dapat menghambat COX-2 maka produksi PG dapat

ditekan. Oleh karena itu, indometasin dapat meredakan gejala peradangan seperti nyeri, tetapi dapat menyebabkan kerusakan usus (Takeuchi *et al.*, 2003).

Menurut pernyataan Monsjoer (2003), bahwa sel - sel radang yang pertama keluar saat inflamasi adalah neutrofil. Hal ini bisa dilihat pada insert (Gambar 5.1) yang memperlihatkan adanya neutrofil. Neutrofil berfungsi sebagai fagosit partikel-partikel kecil dan bertindak sebagai antimikroba. Neutrofil juga dapat melepaskan enzim protease yang berperan dalam penyembuhan luka, membersihkan jaringan luka yang mengalami nekrosis. Protease yang tersimpan dalam neutrofil adalah protease serin neutrofil yang berfungsi menghancurkan mikroorganisme dalam sel radang tetapi juga dapat merusak sel maupun jaringan inang. Mekanisme enzim protease dalam merusak jaringan terjadi melalui 2 jalur yaitu melalui jalur respon langsung dan sel dendrit. Jalur pertama melalui respon langsung protease yang berikatan reseptor *Protease Activated Reseptor* (PAR) dan jalur yang kedua melalui sel dendrit yang mengaktifkan sel helper 2 yang akan mengaktifkan sel B untuk memproduksi sel mast. Sel mast yang aktif mampu mengeluarkan enzim proteolitik yang dapat merusak jaringan mukosa pada jejunum (Yamada, 2005).

Gambaran histopatologi jejunum pada kelompok kontrol positif IBD sebanding dengan peningkatan aktivitas protease yang terjadi terhadap kontrol negatif IBD. ini terjadi karena semakin meningkat nilai aktivitas protease pada kelompok kontrol positif maka berbanding lurus dengan terjadinya kerusakan epitel dan lapisan mukosa pada jejunum akibat pengaruh indometasin. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian indometasin mampu meningkatkan aktivitas protease dan menyebabkan kerusakan jejunum.

Gambaran histopatologi jejunum pada kelompok terapi 100 mg/KgBB dan 300 mg/KgBB pada pengamatan perbesaran 400x terlihat adanya perbaikan yang ditandai dengan perbaikan sel epitel yang teratur akan tetapi masih ada infiltrasi sel radang (Gambar 5.1C). Tingkat perbaikan lebih baik ditunjukkan pada terapi 300 mg/KgBB dimana terdapat perbaikan epitel yang lebih teratur, adanya sel goblet dan tidak ditemukan infiltrasi sel radang (Gambar 5.1D). Penurunan kerusakan pada jaringan jejunum dikarenakan pada ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens*) terdapat senyawa aktif flavonoid yang mampu mendonorkan atom hidrogen dari gugus hidroksil (OH) kepada radikal bebas (R) menjadi stabil (Rahmah, 2012). Jenis molekul flavonoid yang terkandung dalam akar seledri adalah diosmin. (Cuppett *et al.*, 1954). Menurut Tanaka *et al.*, (2013) Senyawa flavonoid mampu menghambat sel T helper 2 (Th2) sehingga TNF- α interleukin 4 (iL-4) dan interleukin 13 (IL-13) tidak teraktivasi. TNF- α yang tidak teraktivasi maka neutrofil menurun dan tidak teraktivasinya IL-4 dan IL-13 maka tidak terjadi mengaktifkan sel B, sehingga tidak memproduksi IgE untuk mengaktifkan sel mast. Sel mast dan neutrofil tidak teraktivasi maka akan menurunkan kadar protease dan menurunkan kadar radikal bebas sehingga kerusakan sel dapat berkurang dan terjadi perbaikan jaringan jejunum melalui proses regenerasi sel (Champbell *et al.*, 2006).

Gambaran histopatologi jejunum pada kelompok terapi 100 mg/KgBB dan 300 mg/KgBB sebanding dengan terjadinya penurunan aktivitas protease yang terjadi terhadap kontrol positif IBD ini terjadi karena semakin menurun nilai aktivitas protease pada kelompok terapi maka berbanding lurus dengan perbaikan

kerusakan epitel dan lapisan mukosa pada sel yang rusak karena pengaruh indometasin. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak etanol akar seledri (*Apium graveolens*) mampu menurunkan aktivitas protease dan memperbaiki kerusakan jejunum sehingga terapi ekstrak etanol akar seledri dapat digunakan sebagai terapi IBD pada jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) hasil induksi indometasin.

