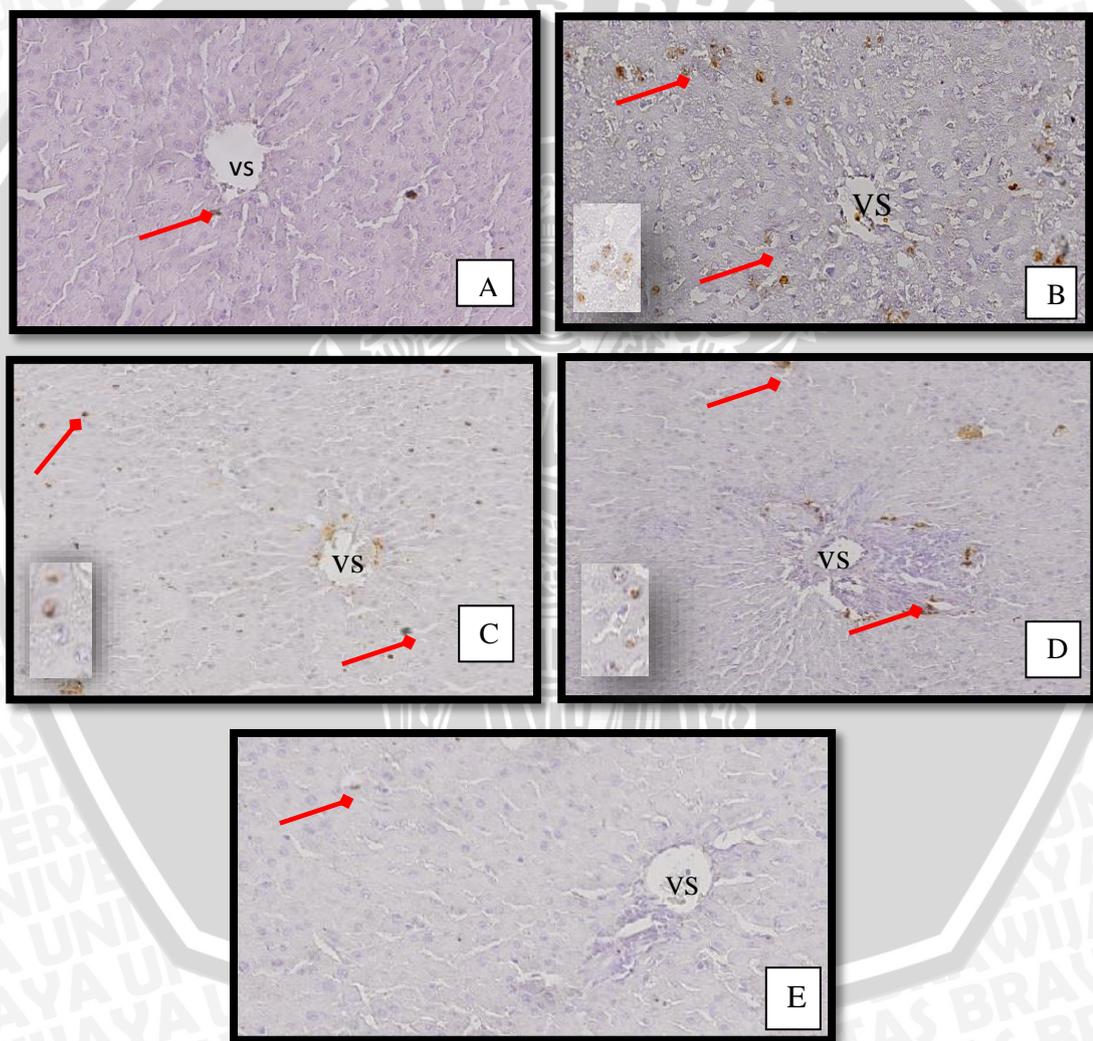


**BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN**

**5.1 Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF -  $\alpha$ ) pada Hepar Tikus hasil paparan Asap rokok dan diterapi Ekstrak Etanol Kulit Manggis**

Ekspresi TNF -  $\alpha$  pada hepar hewan tikus (*Rattus norvegicus*) hasil paparan asap rokok dan diterapi dengan ekstrak etanol kulit manggis ditunjukkan pada **Gambar 5.1**



**Gambar 5.1** Ekspresi TNF -  $\alpha$  jaringan hepar tikus (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan Imunohistokimia (perbesaran 400x)

Keterangan : VS: vena sentralis, (A) kontrol negatif. (B) kontrol positif. (C) terapi 1 (200 mg/kgBB). (D) terapi 2 (400 mg/kgBB). (E) terapi 3 (600 mg/kgBB). Panah merah menunjukkan ekspresi TNF -  $\alpha$ .

Ekspresi TNF –  $\alpha$  sebagai salah satu sitokin proinflamasi pada organ hepar yang ditunjukkan oleh gambaran jaringan hepar (**Gambar 5.1**). Ekspresi TNF –  $\alpha$  dengan teknik imunohistokimia ditunjukkan *spot* warna kecoklatan. Akumulasi bercak warna coklat menunjukkan adanya interaksi antara TNF –  $\alpha$  pada jaringan hepar dengan antibodi yang ditambahkan (antibodi primer anti TNF –  $\alpha$  dan anti *rabbit labeled biotin*). Menurut Duerr (2006) antibodi primer berikatan dengan antigen pada jaringan dan antibodi sekunder berlabel biotin. Pemberian antibodi sekunder diikuti penambahan *Streptavidin-Horseradish Peroxidase* (SA-HRP) dan substratnya berupa *Diaminobenzidine* (DAB). *Diaminobenzidine* (DAB) merupakan substrat dari peroksidase yang menghasilkan warna kecoklatan pada jaringan.

Ekspresi TNF –  $\alpha$  terlihat pada semua kelompok. Ekspresi TNF –  $\alpha$  tersebar pada bagian vena sentralis dan sel hepatosit yang ditunjukkan dengan tanda panah merah (**Gambar 5.1**). Kelompok kontrol negatif menunjukkan adanya ekspresi TNF –  $\alpha$  sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hal tersebut menunjukkan ekspresi TNF –  $\alpha$  muncul dalam kondisi normal dibutuhkan untuk pertahanan kondisi homeostasis dalam sistem imunitas (**Gambar 5.1 A**). Kelompok paparan asap rokok (P2) menunjukkan adanya ekspresi TNF –  $\alpha$  paling banyak dibandingkan dengan kontrol negatif, warna coklat pada bagian vena sentralis dan sel hepatosit (**Gambar 5.1 B**). Ekspresi TNF –  $\alpha$  banyak terdapat di vena sentralis, karena vena sentralis adalah pembuluh darah yang membawa darah dari seluruh tubuh ke hepar sehingga zat toksik akan terakumulasi di sekitar vena sentralis.

Kelompok tikus terapi ekstrak etanol kulit manggis dosis 200 mg/Kg BB (C) menunjukkan penurunan ekspresi TNF -  $\alpha$  yang lebih sedikit daripada kelompok tikus paparan asap rokok. Kelompok tikus paparan asap rokok yang diterapi ekstrak etanol kulit manggis dosis 400 mg/Kg BB (D) menunjukkan penurunan ekspresi TNF -  $\alpha$  yang lebih sedikit daripada kelompok tikus terapi 200 mg/Kg BB. Kelompok tikus paparan asap rokok yang diterapi ekstrak etanol kulit manggis dosis 600 mg/Kg BB (E) menunjukkan ekspresi TNF -  $\alpha$  yang lebih sedikit daripada kelompok tikus 400 mg/Kg BB. Ekspresi TNF -  $\alpha$  pada kelompok tikus paparan asap rokok yang diterapi ekstrak etanol kulit manggis dosis 600 mg/Kg BB mendekati kelompok tikus kontrol negatif. Hal ini didukung dengan analisis menggunakan program *Axiovision* dan diperoleh dalam satuan persentase area (Tabel 5.1). Ekspresi TNF -  $\alpha$  dianalisis dengan uji *statistic one - way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji BNJ (Tukey)  $\alpha = 5\%$  (**Lampiran 10**).

**Tabel 5.1** Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor (TNF -  $\alpha$ )

Perlakuan	Rata - rata Ekspresi TNF - $\alpha$	Ekspresi TNF - $\alpha$ (%)	
		Peningkatan terhadap kontrol negative	Penurunan Terhadap paparan asap rokok
Kontrol negatif (P1)	0,320 $\pm$ 0,116 <sup>a</sup>	-	-
Paparan asap rokok (P2)	3,410 $\pm$ 1,069 <sup>d</sup>	965,62	-
Terapi I 200mg/kgBB (P3)	2,835 $\pm$ 0,370 <sup>cd</sup>	-	16,86
Terapi II 400mg/kgBB (P4)	2,092 $\pm$ 0,459 <sup>bc</sup>	-	38,63
TerapiIII 600mg/kgBB (P5)	1,102 $\pm$ 0,429 <sup>ab</sup>	-	67,66

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

Hasil analisis statistika menunjukkan bahwa terapi ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana L*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) menyebabkan

penurunan ekspresi TNF –  $\alpha$  secara signifikan ( $P < 0,05$ ) yang ditunjukkan dengan adanya notasi yang berbeda hasil uji Tukey (**Tabel 5.1., Lampiran 10**). Paparan asap rokok (P2) menunjukkan ekspresi TNF –  $\alpha$  meningkat 965,62%. Namun setelah terapi dengan ekstrak etanol kulit manggis (*Garcinia mangostana L*) dengan dosis 600 mg/kg BB mampu menurunkan ekspresi TNF –  $\alpha$  sebesar 67,66%. Hal ini sesuai dengan hasil analisis statistik menunjukkan perbedaan yang efektif antara kontrol dengan terapi 600mg/kgBB (**Tabel 5.1**).

Ekspresi TNF –  $\alpha$  kelompok tikus P2 (paparan asap rokok) mengalami peningkatan sebesar 965,62 dan menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol negatif. Peningkatan ekspresi TNF –  $\alpha$  dikarenakan adanya akumulasi asap rokok pada hewan coba, sehingga adanya peningkatan radikal bebas menyebabkan ketidakstabilan metabolisme jaringan hepar. Produksi ROS meningkat tersebut akan mengaktifkan jalur NF $\kappa$ B. NF $\kappa$ B bertranslokasi dari sitoplasma ke dalam inti sel (nukleus) secara otomatis. Aktivasi NF $\kappa$ B menginduksi transkripsi gen diantaranya sitokin proinflamasi TNF –  $\alpha$ , dan akan terjadi proses inflamasi dalam hepar. Hal ini didukung oleh Epstein (2003) bahwa peningkatan radikal bebas dalam hepar mengaktifkan jalur NF $\kappa$ B (*nuclear factor kappa beta*) yang menginduksi sitokin proinflamatori TNF –  $\alpha$  beberapa molekul adhesi seperti leukosit dan neutrofil.

Kelompok tikus terapi ekstrak etanol kulit manggis dosis 200 mg/kg BB, 400 mg/kg BB, 600 mg/kg BB menunjukkan penurunan ekspresi TNF –  $\alpha$  secara berturut – turut sebesar 16,86%, 38,63%, dan 67,66%. Ekspresi TNF –  $\alpha$  pada kelompok terapi 600mg/kg BB menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan (P

> 0,05) terhadap kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa terapi ekstrak etanol kulit manggis dosis 600 mg/kg BB adalah dosis optimum dan efektif untuk terapi paparan asap rokok, yang ditunjukkan dengan notasi yang berbeda nyata dengan penurunan ekspresi TNF –  $\alpha$  sebesar 16,86%. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit manggis mengandung *xanthone* sebagai antioksidan dapat menurunkan ekspresi TNF –  $\alpha$  (mendekati kelompok tikus kontrol negatif) dengan menstabilkan radikal bebas pada organ hepar tikus (*Rattus norvegicus*). Antioksidan tersebut akan mendonorkan atom H<sup>+</sup> untuk berikatan dengan radikal bebas yang terdapat dalam asap rokok sehingga ikatan radikal bebas dan menghambat NF $\kappa$ B dalam mengendalikan ekspresi TNF –  $\alpha$  yang terlibat pada proses inflamasi (Nanji, 2003). Kandungan tersebut telah dikonfirmasi dengan hasil uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (**Lampiran 7**).

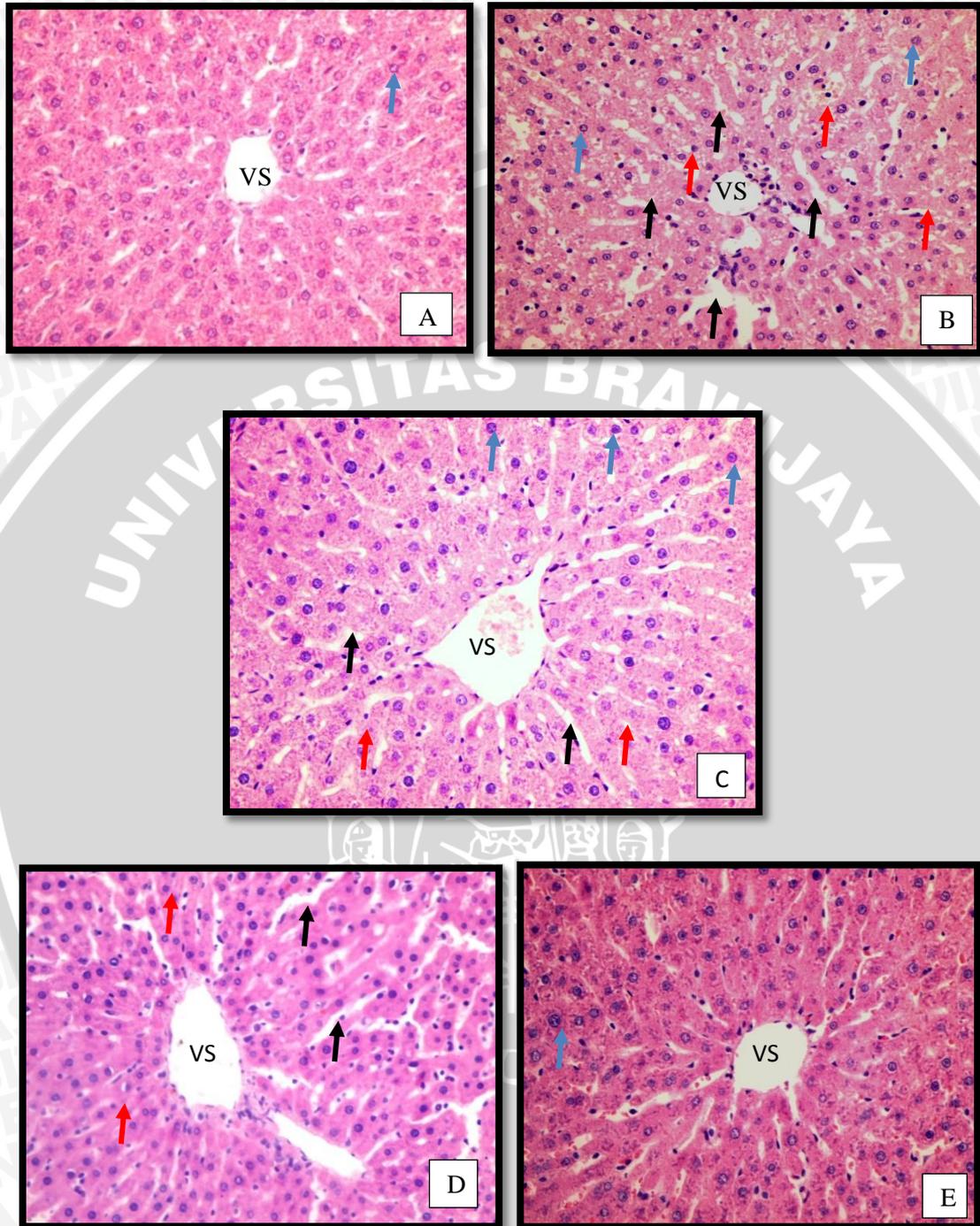
Terapi ekstrak etanol kulit manggis memiliki kandungan *xanthone* yang dapat menurunkan ekspresi TNF –  $\alpha$  dengan hambatan pada aktifitas NF $\kappa$ B. Dimana *xanthone* akan menghambat aktivasi NF $\kappa$ B dengan penghambatan degradasi I $\kappa$ B dan terjadinya fosforilasi ke dalam nukleus. Dengan penurunan aktivitas NF $\kappa$ B maka transkripsi gen dan sitokin proinflamatori TNF –  $\alpha$  serta mediator inflamasi leukosit dan neutrofil menjadi menurun. Hal ini sesuai Menurut Anindhita (2009), bahwa ekstrak etanol kulit manggis sebagai senyawa antioksidan menghambat pembentukan radikal bebas dengan bertindak sebagai donor H terhadap radikal bebas sehingga radikal bebas berubah menjadi bentuk yang lebih stabil. Aktivitas antioksidan erat kaitanya dengan kemampuan menyumbangkan elektron hidrogen pada gugus (OH<sup>-</sup>) reaktif, sehingga

penambahan antioksidan tersebut dapat menghambat atau memperlambat reaksi pembentukan peroksida. Antioksidan mentransfer atom hidrogen ke radikal bebas hasil oksidasi menjadi senyawa non – radikal.

## **5.2 Gambaran Histopatologi Jaringan Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Paparan Asap Rokok dan Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Manggis dengan Pewarnaan HE (Hematoksin Eosin)**

Perbandingan Gambaran histopatologi jaringan hepar tikus hasil paparan asap rokok dengan pemberian terapi ekstrak etanol kulit manggis dengan variasi dosis berbeda (**Gambar 5.2**).





**Gambar 5.2** Histopatologi Jaringan hepar tikus (*Rattus norvegicus*) dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (Perbesaran 400 kali)

Keterangan : VS : vena sentralis, (A) kontrol negatif. (B) kontrol positif. (C) terapi 1 (200 mg/kg BB). (D) terapi 2 (400 mg/kg BB). (E) terapi 3 (600 mg/kg BB). Panah biru menunjukkan sel hepatosit normal. Panah merah menunjukkan hepatosit mengalami degenerasi, Panah hitam menunjukkan sinusoid mengalami dilatasi

Keadaan sel hepatosit pada histopatologi hepar tikus kontrol negatif (**Gambar 5.2 A**) terlihat normal dan teratur dengan bentuk sel polihedral, inti terlihat bulat, sitoplasma terlihat cerah dan sinusoid terlihat jelas tampak putih dalam lobulus hepar. Histopatologi kelompok paparan asap rokok (**Gambar 5.2 B**) menunjukkan sel hepatosit mengalami degenerasi dan nekrosis. Sel hepatosit yang mengalami degenerasi tampak dengan pembengkakan sel, sedangkan sinusoid mengalami dilatasi dapat diketahui dengan perubahan pada celah antar sel. Kondisi sinusoid mengalami dilatasi menunjukkan adanya aktivasi sistem kinik menyebabkan pembentukan bradikinin yang berefek peningkatan permeabilitas pembuluh darah (dilatasi). Mediator inflamasi juga menyebabkan aliran darah melambat sehingga leukosit bergerak (marginasi) dan menempel ke dinding pembuluh darah (adhesi). Terjadinya adhesi dikarenakan reseptor leukosit (selektin) teraktivasi setelah distimulasi mediator tertentu (IL-1 dan TNF- $\alpha$ ). Adhesi yang kuat antara leukosit dan endotel menyebabkan pembuluh darah menjadi kaku kemudian leukosit masuk diantara endotel dan menuju ke jaringan sehingga terjadi infiltrasi leukosit (Arimbi dkk, 2013)

Perubahan gambaran histopatologi hepar tikus pada kelompok kontrol positif merupakan hasil paparan asap rokok. Terhirupnya asap rokok akan beredar dalam sirkulasi darah menuju ke hepar melalui vena hepatika dan menyebar dalam lobulus ke vena sentralis. Hasil pembakaran asap rokok yang tidak sempurna menyebabkan pembentukan radikal bebas yang merupakan produk samping dari hidrokarbon. Karbon monoksida menyebabkan iskemia melalui produksi karboksi – hemoglobin (ikatan antara CO<sub>2</sub> dan hemoglobin) dimana hemoglobin menjadi

tidak efisien mengikat O<sub>2</sub>. Ikatan antara hemoglobin dengan CO<sub>2</sub> jauh lebih kuat dibandingkan dengan O<sub>2</sub>. Akibat terjadinya gangguan suplai oksigen ke hepar maka menimbulkan efek iskemia. Produksi radikal bebas yang berlebihan mengakibatkan stress oksidatif dan memicu inflamasi. Hal ini disebabkan hasil paparan asap rokok mengandung senyawa radikal bebas. Radikal bebas berlebih yang masuk dalam hepar dapat mengakibatkan terbentuk radikal yang bersifat oksidator dengan oksigen yang reaktif. Reaksi ini akan mengoksidasi zat – zat yang ada di dalam tubuh, sehingga menyebabkan membrane sel mengalami kerusakan (Yatman, 2012). Hal ini didukung oleh Menurut Murray *et al.*, (2003), kerusakan pada membran dapat menonaktifkan ikatan membran dengan reseptor atau enzim yang dapat mengganggu fungsi normal sel.

Gambaran histopatologi hepar yang mengalami perbaikan terlihat pada kelompok terapi 1, 2, dan 3 ekstrak etanol kulit manggis dengan dosis 200mg/kg BB, 400mg/kg BB dan 600mg/kg BB menunjukkan terjadinya perubahan secara bertahap dengan berkurangnya sel hepatosit yang mengalami degenerasi dan sinusoid mengalami perubahan dalam kondisi normal (**Gambar 5.2 C, D, dan E**). Hal ini disebabkan dengan pemberian terapi ekstrak etanol kulit manggis mampu memperbaiki hepatosit dan inti tampak kembali seperti normal. Hal ini sesuai dengan pernyataan menurut Nurchasanah (2013), kandungan kulit manggis yang memiliki efek hepatoprotektor adalah *xanthone*. *Xanthone* merupakan senyawa *polifenol* yang memiliki aktifitas sebagai antioksidan dan antiinflamasi sehingga dapat menekan radikal bebas dan memperbaiki jaringan tubuh yang mengalami perubahan maupun kerusakan.

Dosis terapi ekstrak etanol kulit manggis yang memberikan perbaikan pada gambaran histopatologi yang menyerupai kondisi normal adalah kelompok tikus terapi 3 dengan 600 mg/kg BB (**Gambar 5.2 E**). Gambar E menunjukkan berkurangnya sel hepatosit yang mengalami degenerasi dan banyak sel hepatosit normal. Hal ini membuktikan ekstrak etanol kulit manggis mampu mengurangi degenerasi dan mengurangi sinusoid yang mengalami dilatasi dengan mendonorkan satu atom hidrogen. Hal ini sesuai dengan Christijanti *et al.*, (2010) dalam penelitiannya menyatakan bahwa *xanthone* memiliki kemampuan untuk menyumbangkan satu atom hidrogennya dari gugus OH kepada hepatosit sehingga dapat memperbaiki sel hepatosit yang rusak.

