

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

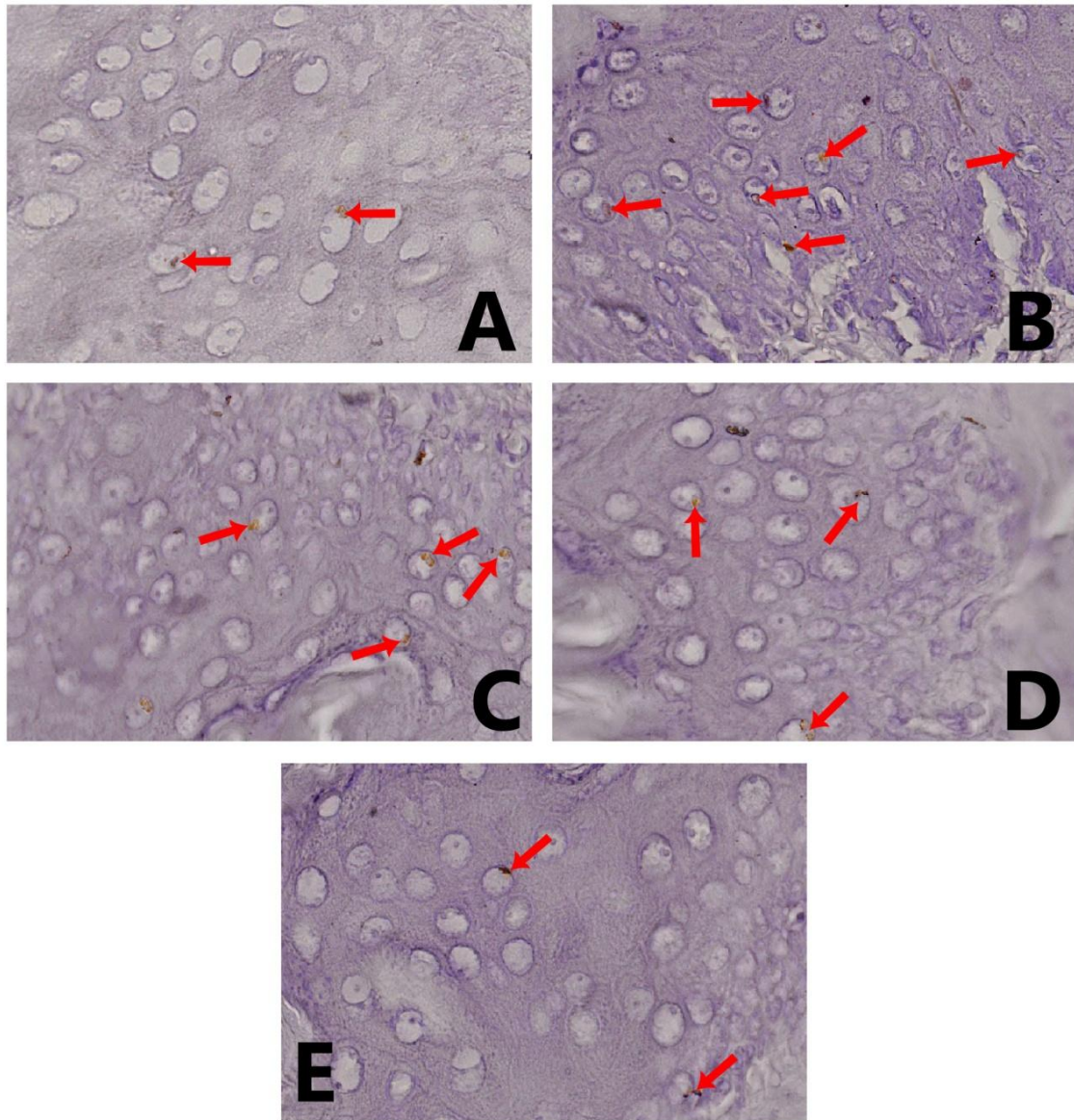
5.1 Pengaruh Terapi Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria accuminata L.*) terhadap ekspresi *Inducible Nitrit Oxide Synthase* (iNOS) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* yang diinduksi indometasin.

Pengaruh terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria accuminata L.*) terhadap ekspresi *Inducible nitrit oxide synthase* (iNOS) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* yang diinduksi indometasin diamati menggunakan metode *Imunohistokimia* (IHK). *Imunohistokimia* adalah metode untuk mendeteksi keberadaan antigen spesifik di dalam suatu sel jaringan menggunakan prinsip pengikatan antara antibodi (Ab) dan antigen (Ag). Pengukuran ekspresi iNOS menggunakan metode *imunohistokimia* dapat mengidentifikasi protein spesifik pada jaringan atau sel, sehingga apabila terjadi peningkatan ekspresi iNOS maka mengindikasikan adanya perubahan keadaan patologi dari suatu jaringan (Sukmadadari, 2012). Hasil pengamatan menunjukkan adanya ekspresi iNOS pada setiap perlakuan yang terlihat dengan munculnya warna coklat pada sitoplasma sel lambung, seperti yang ditunjukkan tanda panah merah pada

Gambar 5.1.

Timbulnya warna coklat pada proses *Immunohistokimia* (IHK) dikarenakan adanya ikatan antara antigen dengan antibodi primer (*anti rat iNOS*) yang kemudian dilabeli oleh antibodi sekunder (*Goat anti rat Ig G biotin labeled*). Setelah terjadi ikatan dilakukan penambahan substrat

Diaminobenzidine (DAB) yang berfungsi sebagai substrat kromogen sehingga menghasilkan warna coklat pada jaringan lambung.



Gambar 5.1 Ekspresi *Inducible Nitrit Oxide Synthase* (iNOS) pada lambung tikus perbesaran 400x.

Keterangan: (A) Tikus kontrol, (B) Tikus IBD, (C) Tikus terapi ekstrak metanol daun kamboja putih 500 mg/kg BB, (D) ekstrak metanol daun kamboja putih 750 mg/kg BB, (E) ekstrak metanol daun kamboja putih 1000 mg/kg BB. Tanda panah merah (→) menunjukkan ekspresi iNOS.

Inducible nitrit oxide synthase (iNOS) merupakan enzim penanda adanya inflamasi dan diinduksi oleh sitokin yang akan menghasilkan *Nitrit Oxide* (NO) dalam jumlah yang besar. Peningkatan ekspresi iNOS mengindikasikan keadaan patologi suatu jaringan (Kim *et al.*, 2009). Ekspresi iNOS pada kelompok kontrol negatif ditunjukkan dengan intensitas rendah yang ditunjukkan dengan warna kecoklatan pada sitoplasma sel lambung (**Gambar 5.1.A**), pada tikus kelompok kontrol positif ekspresi iNOS mengalami peningkatan intensitas warna coklat yang tersebar pada jaringan lambung (**Gambar 5.1.B**). Ekspresi iNOS pada setiap dosis terapi ekstrak metanol daun kamboja menunjukkan penurunan intensitas warna coklat yang terlihat pada kelompok tikus terapi ekstrak metanol daun kamboja dosis 500 mg/kg BB (**Gambar 5.1.C**). Penurunan ekspresi iNOS juga terjadi pada kelompok tikus dosis terapi 750 mg/kg BB (**Gambar 5.1.D**) dengan intensitas warna coklat yang lebih rendah daripada kelompok tikus dosis terapi 500 mg/kg BB. Kelompok tikus yang menunjukkan penurunan intensitas ekspresi iNOS terendah terjadi pada kelompok tikus dosis terapi 1000 mg/kg (**Gambar 5.1.E**).

Analisis kuantitatif ekspresi iNOS dilakukan menggunakan program *software immunoratio* dengan menghitung persen area ekspresi iNOS pada lima lapang pandang (**Lampiran 10**). Hasil pengamatan *imunoratio* tersebut dilanjutkan dengan uji statistik *One Way ANOVA* (*Analysis Of Variance*) menggunakan SPSS 16 yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan seperti yang disajikan pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Ekspresi iNOS pada jaringan lambung tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi Indometasin yang diterapi ekstrak metanol daun kamboja putih.

Kelompok	Rata-Rata Ekspresi iNOS	Ekspresi iNOS (%)	
		Peningkatan	Penurunan
A (Kontrol)	0,184± 0,023 ^a	-	-
B (IBD)	0,586± 0,057 ^d	21,84	-
C (Terapi 500 mg/kg BB)	0,466± 0,039 ^c	-	20,47
D (Terapi 750 mg/kg BB)	0,388± 0,017 ^b	-	33,78
E (Terapi 1000 mg/kg BB)	0,226± 0,033 ^a	-	61,43

Keterangan: Notasi a, b, c dan d menunjukkan adanya pengaruh yang berbeda nyata antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan nyata antar perlakuan

Hasil uji *One Way* ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada kelompok A (kontrol negatif) dengan kelompok B (kontrol positif), terjadi peningkatan ekspresi iNOS yang signifikan ditunjukkan dengan notasi yang berbeda. Kelompok C terjadi penurunan ekspresi iNOS yang signifikan, berbeda nyata dengan kelompok A dan B. Kelompok D terjadi penurunan iNOS yang signifikan dan berbeda nyata dengan kelompok A, B, C dan E. Kelompok E tidak berbeda signifikan dengan kelompok A (kontrol negatif).

Pada kelompok perlakuan A (kontrol negatif) menunjukkan rata-rata ekspresi iNOS sebesar (0,184± 0,023). Adanya ekspresi iNOS dalam jumlah rendah pada jaringan lambung dengan kondisi normal dibutuhkan sebagai regulator kalsium (Ca^{2+}) pada sel. Konsentrasi kalsium dalam sel akan diatur

oleh iNOS yang berikatan dengan protein membran *calmodulin*. iNOS berfungsi sebagai sistem pertahanan tubuh dari antigen dan berperan dalam pembentukan *Nitrit Oxide* (NO) (Ariesta, 2011).

Kelompok perlakuan B (IBD) yang diinduksi menggunakan indometasin menunjukkan rata-rata ekspresi iNOS sebesar $(0,586 \pm 0,057)$ yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol negatif yang ditunjukkan dengan notasi yang berbeda. Ekspresi iNOS tersebut mengalami peningkatan sebesar 21,84% apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini disebabkan karena pemberian indometasin 15 mg/kg BB secara peroral akan langsung menuju target yang dituju yaitu saluran pencernaan sehingga menyebabkan terjadinya ulser pada saluran cerna (Tanaka *et al.*, 2004). Indometasin mampu menghambat *sikloxygenase-1* (COX-1) dan *sikloxygenase-2* (COX-2) serta dapat meningkatkan sekresi HCL pada lambung tikus dan penurunan sekresi mucus yang dapat memicu aktifitas makrofag dalam memfagositosis sel debris dari sel nekrosis dan menginduksi keluarnya sitokin proinflamasi (IL-1 β , TNF- α dan IL-6) yang kemudian merangsang mediator inflamasi dan peningkatan produksi *Reactive Oxide Species* (ROS) sehingga dapat memicu terjadinya stress oksidatif pada jaringan lambung (Takeuchi, 2012).

Ekspresi iNOS pada jaringan lambung tikus kelompok C yang diterapi ekstrak methanol daun kamboja puth dengan dosis 500 mg/kg BB mampu menurunkan ekspresi iNOS sebesar 20,47% $(0,466 \pm 0,039)$ pada kelompok D yang diterapi dosis 750 mg/kg BB mengalami penurunan ekspresi iNOS

lebih besar 33,78% ($0,388 \pm 0,017$) dan tikus kelompok E yang diberikan terapi dosis 1000 mg/kg BB mengalami penurunan ekspresi paling besar 61,43% ($0,226 \pm 0,033$) dari kelompok B (kontrol positif). Hal ini menunjukkan bahwa setiap terapi ekstrak metanol daun kamboja putih memiliki efek penurunan ekspresi iNOS jaringan lambung. Pemberian terapi ekstrak metanol daun kamboja putih dosis 1000 mg/kg BB merupakan dosis terbaik dalam menurunkan ekspresi iNOS pada tikus ekstrak metanol daun kamboja putih dari pada dosis 500 mg/kg BB dan dosis 750 mg/kg BB.

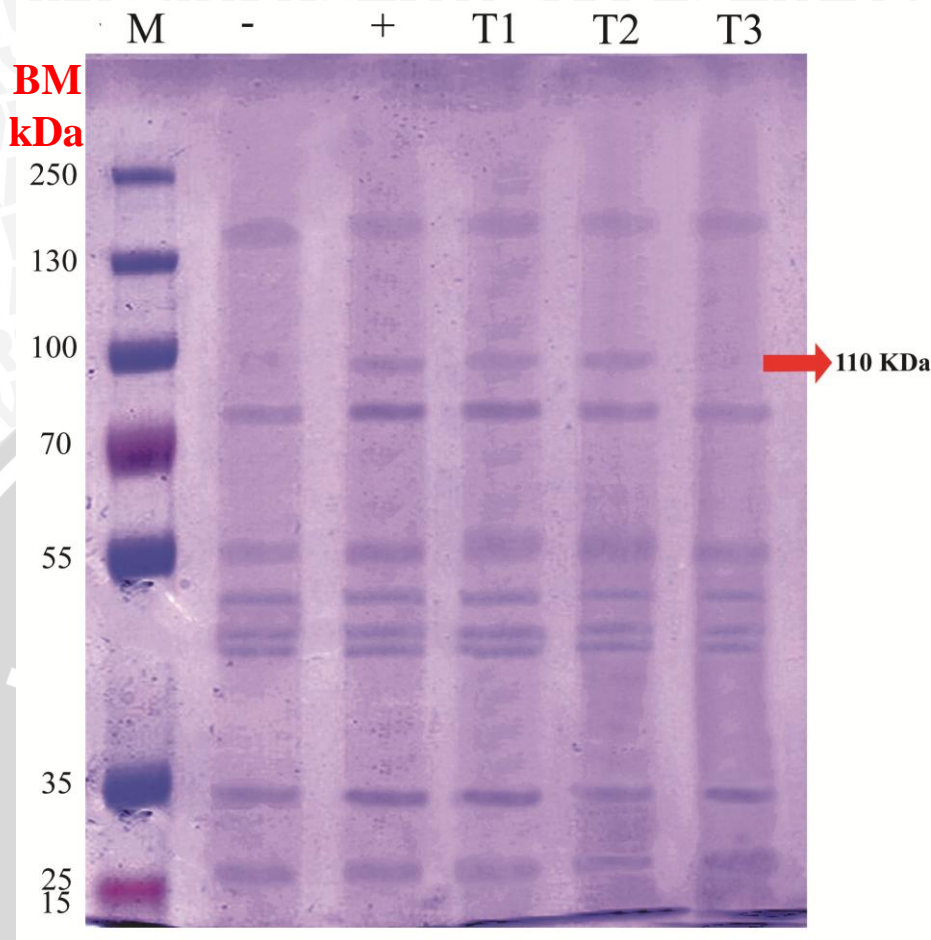
Penurunan ekspresi iNOS terjadi karena kandungan lupeol asetat dalam ekstrak metanol daun kamboja putih dapat bertindak sebagai antioksidan yang mampu mereduksi terhimpunnya senyawa oksidan berlebih dan produksi radikal bebas, sehingga dapat mencegah terjadinya stress oksidatif. Stres oksidatif yang dihambat oleh antioksidan akan mempengaruhi aktivasi NF- κ B. NF- κ B merupakan faktor transkripsi iNOS yang teraktivasi bila terjadi stress oksidatif pada jaringan. Turunnya NF- κ B akan menekan produksi sitokin proinflamasi (IL-1 β , TNF- α dan IL-6) serta mencegah keluarnya mediator inflamasi dan menurunkan produksi ROS (Takeuchi, 2012).

Pada uji *liquid chromatography-mass spectrometer* (LCMS) diketahui bahwa ekstrak metanol daun kamboja putih yang digunakan sebagai terapi terdapat kandungan lupeol asetat yang paling banyak dibandingkan senyawa lainnya. Lupeol asetat merupakan turunan dari Terpenoid (**Lampiran 18**). Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat reaksi oksidasi

atau zat yang mampu menetralkan radikal bebas (Halliwell *et al.*, 2004). Pemberian Indometasin pada penelitian ini akan meningkatkan kadar radikal bebas didalam tubuh sehingga terjadi ketidakseimbangan antara antioksidan endogen yang menyebabkan stres oksidatif, sehingga tubuh memerlukan antioksidan eksogen untuk menyeimbangkan kadar radikal bebas didalam tubuh diantaranya menggunakan lupeol asetat yang terkandung dalam ekstrak metanol daun kamboja putih.

5.2 Analisa Profil Protein Lambung

Pengaruh terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria accuminata L.*) terhadap gambaran Profil protein lambung tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* yang diinduksi indometasin dianalisa menggunakan metode *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). SDS-PAGE adalah sebuah metode untuk memisahkan molekul bermuatan berdasarkan tingkat migrasinya dalam medan listrik (Wilson and Walker, 2000). Pada hasil penelitian ini profil protein hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara profil protein lambung tikus kontrol, tikus IBD dan tikus yang diterapi ekstrak metanol daun kamboja putih dengan dosis 500 mg/kg BB, 750 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB yang diberikan selama 14 hari pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) seperti yang terlihat pada **Gambar 5.2**.



Gambar 5.2 : Profil Protein (12% SDS-PAGE) organ lambung tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Keterangan: M (marker); - (kontrol); + (IBD); T1 (terapi 1 dosis 500mg/kg BB); T2 (terapi 2 dosis 750mg/kg BB); T3 (terapi 3 dosis 100mg/kg BB)

Profil protein pada organ lambung muncul dengan berat molekul yang berbeda-beda pada tiap perlakuan. Pada kelompok tikus kontrol negatif (sehat) dan pada kelompok tikus terapi 3 dengan ekstrak metanol daun kamboja putih dosis 1000 mg/kg BB, pita protein dengan berat molekul 110 kDa tidak terekspresi. Hal ini berbeda dengan kelompok tikus kontrol positif (sakit), kelompok tikus terapi dengan dosis 500 mg/kg BB dan pada kelompok tikus terapi dengan dosis 750 mg/kg BB, dimana tampak adanya ekspresi pita protein dengan berat molekul 110 kDa (**Tabel 5.1**).

Tabel 5.2 Profil Protein Lambung Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Berdasarkan Berat Molekul Protein Hasil SDS-PAGE

BM Pita Protein	Kelompok Perlakuan				
	Kontrol (-)	IBD (+)	T1	T2	T3
170 kDa	✓	✓	✓	✓	✓
110 kDa	-	✓	✓	✓	-
96 kDa	✓	✓	✓	✓	✓
60 kDa	✓	✓	✓	✓	✓
52 kDa	✓	✓	✓	✓	✓
48 kDa	✓	✓	✓	✓	✓
44 kDa	✓	✓	✓	✓	✓
28 kDa	✓	✓	✓	✓	✓
23 kDa	✓	✓	✓	✓	✓

Keterangan: Tanda (-) menunjukkan pita protein dengan berat molekul tersebut tidak terekspresi

Menurut Nicchitta (2013), Protein 110 kDa merupakan suatu protein yang termasuk *high heat shock protein*. Ekspresi HSP 110 mempunyai fungsi utama sebagai *thermotolerance*, sitoproteksi dan sebagai dukungan dari kelangsungan hidup sel itu sendiri di bawah kondisi stress. HSP adalah suatu respon genetik untuk menginduksi gen-gen yang mengkode *molecular chaperon*, protease dan protein-protein lain yang penting dalam mekanisme pertahanan dan pemulihan terhadap kerusakan sel yang berhubungan dengan terjadinya kesalahan melipat dari protein target. Protein HSP juga berfungsi untuk mencegah agregasi dan kesalahan pelipatan protein target, dan menjaga protein dalam komponen lipatan yang benar, serta proteksi protein terhadap beberapa jenis stress. *Heat shock protein* (HSP) yang diekspresikan dalam

keadaan normal dapat juga meningkat jika ada *stressor*. Respon yang cepat ini merupakan mekanisme proteksi. Protein ini juga mempunyai fungsi penting pada sel yang tidak dalam keadaan *stress*, misalnya mengatur lipatan protein, penyusunan, dan peletakan protein intrasellular, dengan kata lain *heat shock protein* bertugas memastikan setiap protein dalam tubuh dalam bentuk yang seharusnya, di tempat yang seharusnya dan di waktu yang seharusnya, di samping itu juga *heat shock protein* menentukan sel yang sudah rusak atau yang sudah tua untuk dihancurkan dalam proses apoptosis (Walsh, 2003).

Tikus kontrol positif yang diberi paparan indometasin menunjukkan adanya *heat shock protein*. Hal ini diyakini karena induksi indometasin dapat mengakibatkan inflamasi yang berlanjut pada kerusakan sel lambung. Kondisi inflamasi ini diinisiasi oleh aktifitas makrofag dalam memfagositosis sel debris dari sel nekrosis dan akan mempengaruhi aktivasi NF- κ B sebagai faktor transkripsi iNOS. Peningkatan INOS yang terjadi akibat induksi indometasin menunjukkan bahwa indometasin mampu mengaktifasi sel-sel inflamatori seperti makrofag. Menurut Zhou *et al.*, (2003) aktivasi INOS diakibatkan oleh adanya sitokin proinflamasi seperti *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), interleukin-1 (IL-1) serta makrofag. Peningkatan INOS mengakibatkan peningkatan jumlah NO di dalam jaringan lambung yang merupakan radikal bebas. Ketika mukosa lambung terkena iritasi atau difusi asam, maka terjadi peningkatan kecepatan aliran darah mukosa. Peningkatan aliran darah mukosa dimediasi oleh pelepasan *Nitric Oxide* (NO). Sitokin pro-inflamasi spesifik yang dikeluarkan oleh makrofag akan menginisiasi

produksi protein penanda inflamasi sehingga menyebabkan sintesis *heat shock protein*. *Heat shock protein* bertugas memastikan setiap protein dalam tubuh kita berada dalam kondisi fungsional dan ditempat yang seharusnya. *Molecular chaperon* berpengaruh terhadap sintesis dan pelipatan protein yang penting untuk kelangsungan hidup sel itu sendiri dibawah kondisi stres. HSP akan menentukan sel yang sudah rusak untuk dihancurkan dalam proses kematian sel yang disebut dengan apoptosis (Ampie *et al.*, 2015).

Pemberian terapi ekstrak metanol daun kamboja putih dengan dosis 500 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB menunjukkan bahwa protein dengan berat molekul 110 kDa masih terekspresi, sedangkan pada dosis terapi 1000 mg/kg BB protein dengan berat molekul 110 kDa sudah tidak terekspresi. Tidak terekspresinya protein dengan berat molekul 110 kDa pada terapi 1000 mg/kg BB diduga karena pengaruh lupeol asetat pada ekstrak metanol daun kamboja putih yang berfungsi sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Antioksidan mempunyai peran penting untuk menstabilkan radikal bebas pada saluran pencernaan sehingga berpengaruh terhadap perbaikan profil protein dengan cara mengurangi penghambatan *sikloxygenase-1* (COX-1) dan *sikloxygenase-2* (COX-2) akibat induksi indometasin, yang mana keduanya menghasilkan prostaglandin yang fungsinya mendukung terjadinya proses inflamasi. Berkurangnya hambatan terhadap COX-1 akan mengurangi regulasi dari COX-2 yang mampu menekan terjadinya inflamasi pada sel lambung dan menekan produksi radikal bebas, sehingga menghambat terjadinya stress oksidatif. Stress oksidatif yang dihambat oleh antioksidan

akan mempengaruhi aktivasi NF- κ B yang akan menekan produksi sitokin proinflamasi (IL-1 β , TNF- α dan IL-6) serta mencegah keluarnya mediator inflamasi untuk mengeluarkan *Nitric Oxide* (NO) yang akhirnya dapat memperbaiki sintesis protein dan dapat memperbaiki profil protein pada jaringan lambung.

