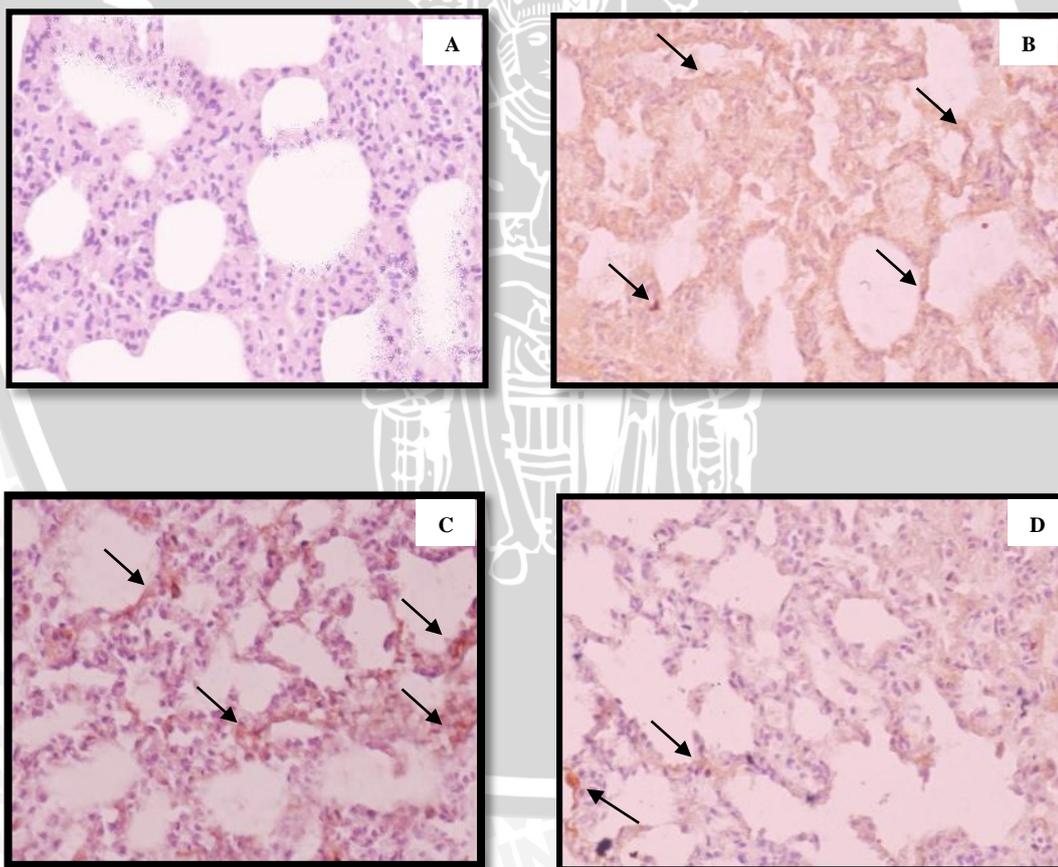
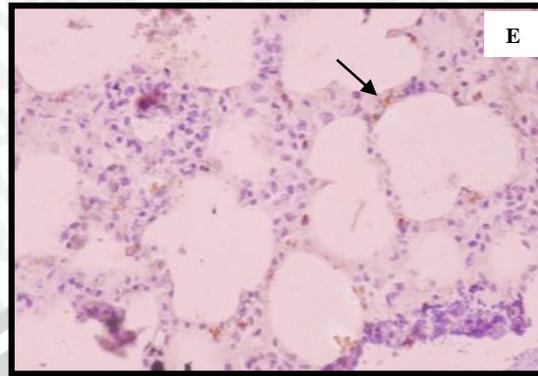


BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Ekspresi Interleukin-1 (IL-1) pada Organ Paru Tikus

Hasil ekspresi Interleukin-1 (IL-1) pada organ paru tikus model asma yang dipapar lipopoliskarida dan diterapi ekstrak daun sirih merah ditunjukkan oleh gambaran jaringan berwarna kecoklatan akibat ikatan antigen antibodi serta antibodi sekunder berlabel biotin dan pewarnaan dengan chromagen DAB. Adanya ekspresi IL-1 diamati dengan teknik imunohistokimia dan dihitung ekspresinya dengan *software* Immunoratio (Lampiran 9) (Gambar 5.1).





Gambar 5.1 Anak panah hitam menunjukkan ekspresi Interleukin-1 (IL-1) berwarna kecoklatan pada Organ Paru Tikus Model Asma yang dipapar LPS dengan Pewarnaan Imunohistokimia (Perbesaran 400x).

Keterangan : A : Negatif, B : Positif, C : Terapi 1 (25 mg/kg BB), D: Terapi 2 (50 mg/kg BB) dan E : Terapi 3 (75 mg/kg BB).

Hasil penelitian pengaruh ekstrak daun sirih merah terhadap ekspresi Interleukin-1 (IL-1) pada organ paru tikus model asma yang dipapar lipopolisakarida pada 5 kelompok, kelompok kontrol negatif, kontrol positif, terapi 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, 75 mg/kg BB, diuji dengan analisis statistika menggunakan uji ANOVA dan BNJ ditunjukkan pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Ekspresi Interleukin-1 (IL-1) pada Organ Paru Tikus

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Ekspresi IL-1	Ekspresi IL-1 (%)	
		Peningkatan	Penurunan
Kelompok A (kontrol negatif)	17,38±2,06 ^a	-	-
Kelompok B (kontrol positif)	95,25±0,96 ^d	448	-
Kelompok C (25 mg/kg BB)	93,40±2,36 ^d	-	1,94
Kelompok D (50mg/kg BB)	61,83±1,02 ^c	-	35,08
Kelompok E (75mg/ kg BB)	29,50±0,42 ^b	-	69,03

Keterangan : Angka dengan superscript (notasi) berbeda menunjukkan perbedaan $p < 0,05$. Kontrol negatif : tanpa perlakuan, kontrol positif : induksi Ovalbumin dan dipapar LPS, C : 25 mg/kg BB, D : 50 mg/kg BB dan E : 75 mg/kg BB. Peningkatan dibandingkan dengan kontrol negatif dan penurunan dibandingkan dengan kontrol positif.

Hasil uji *One-Way ANOVA* menggunakan SPSS 22 menunjukkan bahwa kelompok kontrol positif berbeda signifikan ($P < 0,05$) dengan kelompok kontrol negatif, sedangkan pada Kelompok terapi C (25 mg/kg BB) tidak terlihat perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kontrol positif. Kelompok terapi D (50 mg/kg BB) dan E (75 mg/kg BB) menunjukkan hasil berbeda signifikan ($P < 0,05$). Dosis 75 mg/ekor adalah dosis terbaik dalam menurunkan ekspresi IL-1. Berdasarkan tabel 5.1 tampak pada kontrol negatif (kelompok A) juga menunjukkan adanya ekspresi IL-1 rata-rata $17,38 \pm 2,06$. Interleukin 1 (IL-1) adalah mediator utama terhadap respon inflamasi yang dihasilkan oleh banyak sel yang berbeda, termasuk makrofag, sel-sel endotel, sel-sel B, fibroblas, sel-sel epitel, astrocytes, dan osteoblas. Interleukin-1 dihasilkan sebagai respon terhadap mikroorganisme, bakteri toksin, komponen komplemen atau injuri jaringan akan tetapi menurut Hadiwidjaja (2004) dalam keadaan normal, sitokin IL-1 β dan TNF- α dapat ditemukan dalam kadar yang rendah.

Ekspresi IL-1 pada organ paru tikus model asma yang dipapar lipopolisakarida tanpa terapi (kontrol positif) menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap tikus kontrol negatif yang ditandai dengan perbedaan notasi. Ekspresi IL-1 yang tinggi pada kontrol positif menunjukkan bahwa ovalbumin dan paparan LPS mengaktifkan mediator inflamasi yang kemudian menyebabkan peradangan pada organ paru tikus dan secara spesifik disebut sebagai kejadian asma. Peningkatan ekspresi IL-1 pada kelompok kontrol positif disebabkan oleh peningkatan aktivasi sel inflamatori organ paru sehingga IL-1 yang termasuk dalam sitokin proinflamasi dihasilkan dan mengalami peningkatan jumlah

di organ pernafasan (Byers and Dhupa, 2005). IL-1, IL-6 dan TNF- α merupakan sitokin pro inflamasi dan inflamasi spesifik, IL-1 berfungsi meningkatkan permeabilitas vaskular serta sebagai kemokin yang mengerahkan sel-sel fagosit (Baratawidjaja, 2013).

Kelompok terapi C (25 mg/kg BB) tidak menunjukkan penurunan ekspresi IL-1 yang berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok positif. Persentase penurunan ekspresi IL-1 pada kelompok C (25 mg/kg BB) terhadap kontrol positif adalah sebesar 1,94%, hal berbeda terlihat pada kelompok terapi D dan E yang menunjukkan penurunan ekspresi IL-1 yang berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Pada kelompok terapi D (50 mg/kg BB) penurunan ekspresi IL-1 sebesar 35,08% dibandingkan dengan kelompok kontrol positif serta dinyatakan berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif. Kelompok terapi E (75 mg/kg BB) merupakan kelompok terapi dengan penurunan ekspresi IL-1 tertinggi sebesar 69,03%, hasil pada tabel (5.1) juga menunjukkan bahwa kelompok terapi E menunjukkan hasil yang lebih mendekati kelompok kontrol negatif dibandingkan dengan kelompok terapi lain sehingga hal tersebut menunjukkan bahwa dosis terapi 75 mg/kg BB dalam penelitian ini adalah dosis terbaik dalam menurunkan ekspresi IL-1. Flavonoid diketahui dapat menghambat proliferasi sel T sehingga tidak menginduksi sel B untuk menghasilkan IgE, tidak adanya ikatan antara IgE dengan sel mast tidak akan menghasilkan mediator inflamasi seperti IL-1. Mediator inflamasi yang tidak lagi dihasilkan di organ paru akan mengurangi terjadinya inflamasi dan menghentikan terjadinya asma, sedangkan flavonoid dalam perannya sebagai antiinflamasi bekerja dengan

mengikat COX-1 dan COX-2 sehingga menyebabkan penurunan PG2 dan LTB4 di organ paru sehingga menekan kemampuan sel inflamatori dalam menghasilkan IL-1 dan TNF- α (Siriwardhana *et al.*, 2012).

Ekspresi IL-1 tertinggi ditunjukkan oleh Gambar 5.1 (B) dimana warna kecoklatan muncul pada jaringan paru, sedangkan efek terapi menunjukkan penurunan ekspresi IL-1 pada organ paru. Ekspresi IL-1 dihasilkan akibat induksi ovalbumin dan paparan LPS yang memicu aktivasi mediator khususnya histamin sehingga terjadi inflamasi yang secara spesifik kemudian disebut sebagai kejadian asma. Perbedaan rata-rata ekspresi IL-1 pada metode imunohistokimia membuktikan terjadinya penurunan sitokin proinflamasi setelah diberikan terapi ekstrak daun sirih merah. Penurunan ekspresi IL-1 disebabkan oleh aktivitas flavonoid sehingga tidak terjadi sensitasi sel mast yang kemudian tidak menghasilkan histamin pada organ paru.

Kelompok terapi C, D dan E memberikan hasil yang berbeda disebabkan variasi dosis ekstrak daun sirih merah yang diberikan, variasi dari dosis akan berpengaruh langsung pada kadar flavonoid yang akan diterima tubuh, dari ketiga variasi dosis kelompok terapi E menunjukkan hasil terbaik.

5.2 Aktivitas Protease Paru yang diinduksi Lipopolisakarida (LPS)

Protease merupakan enzim yang dapat menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Unit aktivitas protease dari organ paru *Rattus norvegicus* didefinisikan sebagai banyaknya unit tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis ikatan peptida pada

protein oleh protease hasil isolasi paru *Rattus norvegicus* pada kondisi optimum yaitu pH 6,5, suhu 37°C dan waktu inkubasi 60 menit.

Tabel 5.2 Aktivitas Protease Organ Paru Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Aktivitas Protease	Aktivitas Protease (%)	
		Peningkatan	Penurunan
Kelompok A (kontrol negatif)	0,110±0,007 ^a	-	-
Kelompok B (kontrol positif)	0,211±0,010 ^c	91,82	-
Kelompok C (25 mg/ekor)	0,195±0,018 ^c	-	7,6
Kelompok D (50 mg/ekor)	0,150±0,020 ^b	-	29
Kelompok E (75 mg/ekor)	0,112±0,003 ^a	-	47

Keterangan : Angka dengan superscript (notasi) berbeda menunjukkan perbedaan $p < 0,05$.
 Kontrol negatif : tanpa perlakuan, kontrol positif : induksi Ovalbumin dan dipapar LPS, C : 25 mg/kg BB, D : 50 mg/kg BB dan E : 75 mg/kg BB.
 Peningkatan dibandingkan dengan kontrol negatif dan penurunan dibandingkan dengan kontrol positif.

Nilai aktivitas protease pada kelompok A (0,110±0,007) digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan atau penurunan aktivitas protease yang terjadi karena pengaruh perlakuan. Aktivitas protease kelompok B lebih tinggi 91,82% dari kelompok A, Hal ini menunjukkan bahwa paparan antigen (Ovalbumin dan LPS) pada hewan coba dapat menyebabkan terjadinya proses inflamasi pada paru tikus sehingga akan mengaktifasi sel-sel inflamasi serta pelepasan enzim protease. Hasil tersebut sesuai dengan hasil penelitian (Allard, *et al.*, 2014) bahwa keadaan inflamasi akan meningkatkan infiltrasi sel-sel inflamasi yang dapat melepaskan enzim protease, hal ini juga didukung oleh penelitian Utomo (2012) bahwa induksi asma melalui paparan Ovalbumin dan LPS dapat direspon tubuh sebagai antigen sehingga meningkatkan respon inflamasi di dalam tubuh hewan coba. Ovalbumin dan LPS dapat menginduksi aktivasi makrofag, neutrofil, dan sel Th2 di dalam tubuh hewan coba (Nials, *et al.*, 2008). Paparan

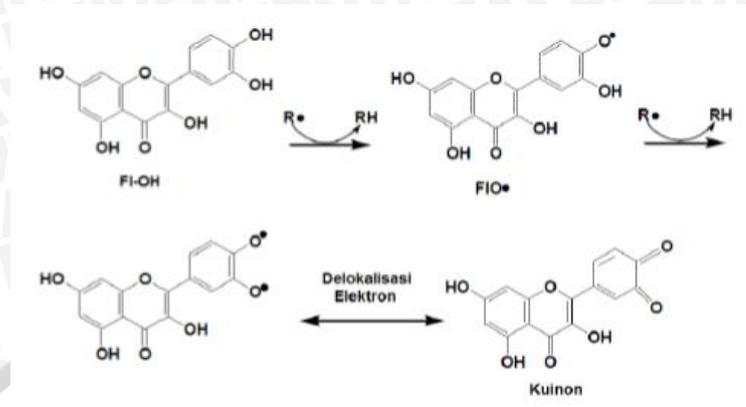
Ovalbumin dan LPS dapat mengaktivasi sel Th2 agar memproduksi sitokin proinflamasi berupa IL-4, IL-5, dan IL-13, hal tersebut merangsang proliferasi sel B menjadi sel plasma untuk memproduksi IgE. Ovalbumin dan LPS di dalam darah akan ditangkap oleh IgE yang berikatan dengan reseptor sel mast. Sel mast akan mengalami degranulasi dengan melepas mediator inflamasi berupa histamin, leukotrien, prostaglandin, dan utamanya protease sehingga terjadi peningkatan aktivitas protease (Endaryanto dan Harsono, 2006).

Aktifitas protease kelompok terapi C tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan hal tersebut ditandai dengan notasi yang sama antara kelompok C dan kelompok kontrol positif, hal tersebut dimungkinkan karena kadar flavonoid yang terdapat pada kelompok C cukup rendah sehingga belum mampu memberikan efek antiinflamasi yang signifikan. Hal yang berbeda ditunjukkan pada kelompok terapi D dan kelompok terapi E, dimana pada kedua kelompok ini menunjukkan penurunan aktifitas protease yang signifikan yang ditandai dengan perbedaan notasi. Kelompok terapi D menunjukkan penurunan aktifitas protease sebesar 29 % dan kelompok terapi E menunjukkan penurunan aktifitas protease sebesar 47 % serta pada tabel 5.2 ditunjukkan bahwa angka aktivitas protease kelompok E tidak jauh berbeda dengan kelompok kontrol negatif. Penurunan aktivitas protease pada penelitian ini akibat adanya kandungan flavonoid pada ekstrak daun sirih merah yang selain memiliki efek antiinflamasi juga memiliki efek sebagai antioksidan. Flavonoid berfungsi sebagai penangkap senyawa radikal bebas sehingga mampu menghambat pelepasan protease sebagai mediator inflamasi.

Data hasil pengukuran aktivitas protease yang disajikan pada table 5.2 menunjukkan bahwa adanya aktivitas protease pada kelompok kontrol negatif hal tersebut karena protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Protease dibutuhkan secara fisiologi untuk kehidupan organisme pada tumbuhan, hewan maupun mikroorganisme. Sedangkan menurut Frisca dkk. (2009), enzim protease ini dilepaskan dari sel endotel yang teraktivasi sebagai proses inisiasi angiogenesis. Angiogenesis merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru baik dalam keadaan sehat maupun patologi.

Flavonoid merupakan senyawa fenolik yang berkhasiat sebagai antioksidan. Flavonoid menghambat kerja enzim yang terlibat dalam reaksi produksi anion superoksida (O_2^*) dengan mengikat senyawa yang menghasilkan radikal bebas. Flavonoid dapat menangkap radikal bebas dengan jalan reduksi senyawa radikal bebas sehingga menjadi senyawa yang stabil. Mekanisme lain dengan menyediakan sisi untuk mengikat radikal bebas (Simamora, 2009).

Flavonoid mampu mendonasikan atom hidrogen dari gugus hidroskil (OH) kepada radikal bebas (R^*) sehingga flavonoid berubah menjadi radikal fenoksil flavonoid (Gambar 5.2). Sedangkan radikal fenoksil memiliki ikatan rangkap terkonjugasi sehingga tidak menimbulkan radikal bebas dan lebih stabil. Flavonoid juga efektif sebagai scavenger radikal peroksil (ROO^*) yang akan diregenerasi menjadi $ROOH$, dan radikal hidroskil (OH^*) akan diregenerasi menjadi H_2O . Hasil regenerasi tersebut bersifat lebih stabil (Astuti, 2008).



Gambar 5.2 Mekanisme flavonoid sebagai antioksidan (Rahmah, 2012)

Pengikatan radikal bebas oleh flavonoid akan mencegah reaksi radikal berantai yang merusak fungsi protein dan struktur jaringan normal. Flavonoid merupakan senyawa yang dapat dengan mudah bermodifikasi untuk menghentikan radikal sehingga mampu mencegah stres oksidatif di dalam sel dan peningkatan enzim protease pada jaringan (Danihelova, *et al.*, 2013). Hal tersebut didukung oleh penelitian (Alam, *et al.*, 2010) bahwa jika radikal bebas berkurang, maka tidak akan terjadi stres oksidatif dan aktivitas protease akan berkurang karena tidak terjadi perusakan protein dan fagositosis.

Flavonoid akan menghentikan radikal bebas sehingga akan menghambat aktivasi mediator inflamasi seperti neutrofil dan makrofag yang melepaskan protease (Theoharides, 2009). Hal tersebut sesuai dengan nilai aktivitas protease pada kelompok terapi D dan E yang lebih rendah dibanding aktivitas protease kelompok kontrol positif.