

**STUDI PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN BELIMBING
WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) PADA HEWAN COBA TIKUS
(*Rattus norvegicus*) YANG DI INDUKSI SIPERMETRIN
TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI
GINJAL DAN EKSPRESI TNF- α**

SKRIPSI

**Oleh :
BASOFI ANDRA ADITAMA
125130100111016**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

**STUDI PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN BELIMBING
WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) PADA HEWAN COBA TIKUS
(*Rattus norvegicus*) YANG DI INDUKSI SIPERMETRIN
TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI
GINJAL DAN EKSPRESI TNF- α**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :
BASOFI ANDRA ADITAMA
125130100111016



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Studi Pemberian Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi* L.) Pada Hewan Coba Tikus (*Rattus Norvegicus*)
Yang Di Induksi Sipermetrin Terhadap
Gambaran Histopatologi Ginjal
Dan Ekspresi Tnf- α**

**Oleh :
BASOFI ANDRA ADITAMA
125130100111016**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 2 September 2014
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dra. Anna Roosdiana, M. App.,Sc
NIP. 19580711 199203 2 002

drh. Herlina Pratiwi, M.Si
NIP. 19870518 201012 2 010

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof.Dr. Aulanni'am, drh, DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : BASOFI ANDRA ADITAMA
 NIM : 125130100111016
 Program Studi : Kedokteran Hewan
 Penulis Skripsi berjudul : Studi Pemberian Ekstrak Etanol Daun Blimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi* L.) Pada Hewan Coba Tikus (*Rattus Norvegicus*) Yang Di Induksi Sipermetrin Terhadap Gambaran Histopatologi Ginjal Dan Ekspresi Tnf- α

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 2 Sepetember 2016
 Yang menyatakan

(BASOFI ANDRA ADITAMA)
NIM. 125130100111016

**STUDI PEMBERIAN EKSTRAK DAUN BLIMBING WULUH
(*Averrhoa bilimbi* L.) PADA HEWAN COBA TIKUS (*Rattus
norvegicus*) YANG DI INDUKSI SIPERMETRIN
TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI
GINJAL DAN EKSPRESI TNF- α**

ABSTRAK

Penggunaan pestisida rumah tangga mengalami peningkatan dari waktu ke waktu. Beberapa dampak negatif yang mungkin timbul diantaranya adalah masalah keracunan, pencemaran lingkungan, dan terjadinya residu pestisida pada rantai makanan. Sipermetrin merupakan salah satu jenis pestisida golongan piretroid yang biasa digunakan di kalangan rumah tangga yang dapat mempengaruhi sistem saraf serta dapat menjadi radikal bebas jika teroksidasi. Daun belimbing wuluh memiliki kandungan katekin yang bersifat sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pemberian terapi ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap perbaikan gambaran histopatologi organ ginjal tikus induksi sipermetrin menggunakan pewarnaan Hematoxylen-Eosin (HE) dan ekspresi TNF- α menggunakan uji IHK (Imunohistokimia). Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dibagi menjadi empat kelompok perlakuan kelompok 1 yaitu kontrol negatif, kelompok 2 yaitu kontrol positif induksi sipermetrin dengan dosis 150mg/kg BB, kelompok 3 yaitu induksi sipermetrin yang telah diterapi ekstrak daun belimbing wuluh dosis 500 mg/kg BB dan kelompok 4 yaitu induksi sipermetrin yang telah diterapi ekstrak daun belimbing wuluh dosis 1000 mg/kg BB. Ekspresi TNF- α dihitung menggunakan *software Immunoratio* dianalisis dengan ANOVA dan dilanjutkan dengan Uji BNJ. Pengamatan gambaran histopatologi ginjal menggunakan mikroskop dan dianalisis deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) mampu memperbaiki gambaran histopatologi ginjal yang ditandai dengan berkurangnya edema, hipervaskularisasi, degenerasi hidropis, perbaikan *capsula bowman* serta menurunkan ekspresi TNF- α secara signifikan ($P < 0,05$). Dosis 1000 mg/kg BB ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) adalah dosis terbaik untuk terapi. Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dapat digunakan sebagai terapi pada tikus yang diinduksi sipermetrin berdasarkan ekspresi TNF- α dan gambaran histopatologi ginjal.

Kata kunci : ANOVA, Daun Belimbing Wuluh, Glomerulus, Hematoxylen-Eosin, Sipermetrin, TNF- α dan Uji IHK.

STUDY EFFECT OF *Averrhoa bilimbi* L. EXTRACT THERAPY ON HISTOPATHOLOGY OF KIDNEY AND EXPRESSION OF TNF- α IN *Rattus Norvegicus* EXPOSED TO CYPERMETHRIN

ABSTRACT

The use of pesticide has been increasing over time. Some of the negative impacts are the problem of toxicity, environmental pollution, and the occurrence of pesticide residues in the food chain. Cypermethrin is one of the pyrethroid class of pesticides commonly used among households, that can affect the nervous system and can become free radicals when oxidized. *Averrhoa bilimbi* L. leaf contains katekin that has antioxidant property. This research aims to study the effect of therapy using *Averrhoa bilimbi* L. leaf extract on the improvement of histopathological of kidney rat poisoning models using Hematoxylen-eosin staining (HE) and expression of TNF- α using IHC test (Immunohistochemistry). The male rats (*Rattus norvegicus*) were divided into four treatment groups, namely group 1 the negative control, group 2 the positive control were induced with cypermethrin at a dose of 150 mg/kg BW, group 3 induction cypermethrin who had treated extracts of *Averrhoa bilimbi* L. leaf dose of 500 mg/kg BW and group 4 induction cypermethrin who had treated extracts of *Averrhoa bilimbi* L. leaf dose 1000 mg/kg BW. Observations of the kidney histopathology picture was done using a microscope and analyzed descriptively. Expression of TNF- α was calculated using the software Immunoratio analyzed by ANOVA and continued with Tukey test. The results showed that extract of *Averrhoa bilimbi* L. leaf were able to improved renal histopathologic picture that were characterized by reduced edema hypervascularization, hidropic degeneration, repair bowman capsule and decrease the expression of TNF- α significantly ($P < 0.05$). A dose of 1000 mg/kg extract *Averrhoa bilimbi* L. the best dosage for treatment. The conclusion of this study is that the extract of *Averrhoa bilimbi* L leaf can be used as a therapy in rat induced with cypermethrin based on the expression of TNF- α and renal histopathology picture.

Keywords: ANOVA, *Averrhoa bilimbi* L, Cypermethrin, Glomerulus, Hematoxylen-Eosin, IHC Test and TNF- α .

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadapan Allah SWT yang melimpahkan rahmat, taufiq, dan hidayah-Nya. Sholawat dan salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi Agung Muhammad SAW, sehingga penulis dapat membuat skripsi yang berjudul : **Studi Pemberian Ekstrak Etanol Daun Blimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi* L.) Pada Hewan Coba Tikus (*Rattus Norvegicus*) Yang Di Induksi Sipermetrin Terhadap Gambaran Histopatologi Ginjal Dan Ekspresi Tnf- α .**

Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada seluruh pihak yang membantu membimbing, memotivasi dan memperlancar dalam penulisan skripsi ini, secara khusus penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dra. Anna Roosdiana, M.App.,Sc dan drh. Herlina Pratiwi, M.Si selaku dosen pembimbing yang telah berkenan memberikan bimbingan, waktu, kesabaran, motivasi dan bantuan yang telah diberikan.
2. Drh. Dodik Prasetyo, M.Vet dan Agri Kaltaria Anisa, S.Farm, Apt. selaku dosen penguji yang telah berkenan memberikan tanggapan, masukan, kritik dan saran.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
4. Keluarga besar penulis, Ayahanda Santoso Hadi Wijanarko, Ibunda Lelly Listyorini, dan Adik Faradina Lisanda Putri atas pengorbanan yang luar biasa baik waktu, kasih sayang, materi, kesabaran, doa, dorongan, nasehat,

bimbingan dan pelajaran hidup mengenai keikhlasan dan semangat sebagai bekal kesuksesan penulis.

5. Penulis mengucapkan terima kasih kepada keluarga besar VENA-12, teman-teman kelompok Sipermetrin, kakak, teman baik, sahabat dan saudara baru bagi penulis: Anggit, Basri, Della, Shinta, Adhitya Fajar S.KH, Bangun, Fiktor, Putra, Tito, Yudi, Teddy dan seluruh kolega FKH UB atas motivasi, semangat, nasehat, bantuan, keceriaan dan kebersamaan selama ini.
6. Kepada semua rekan-rekan dan sahabat angkatan 2008-2015 serta sahabat-sahabat lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terimakasih atas segala perhatian, dorongan, motivasi dan doa yang telah diberikan.
7. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Kritik dan saran yang sifatnya membangun sangat penulis harapkan dari berbagai pihak. Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan Skripsi ini dapat memberikan manfaat serta wawasan tidak hanya bagi penulis namun juga bagi pembaca.

Malang, 2 September 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PENYATAAN.....	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Sipermetrin.....	6
2.1.1 Definisi.....	6
2.1.2 Patomekanisme Toksikasi Sipermetrin.....	8
2.2 Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF- α) Terhadap Inflamasi.....	10
2.3 Radikal Bebas.....	11
2.3.1 Pengertian Radikal Bebas.....	11
2.3.2 Sifat-sifat Radikal Bebas.....	12
2.4 Ginjal.....	13
2.4.1 Definisi Ginjal.....	13
2.4.2 Anatomi dan Fungsi Ginjal.....	14
2.5 Belimbing Wuluh.....	16
2.5.1 Definisi Belimbing Wuluh.....	16
2.5.2 Komponen Kimia Daun Belimbing Wuluh.....	18
2.6 Tanin.....	19

2.6.1 Katekin	20
2.7 Fungsi Antioksidan.....	21
2.8 Hewan Coba.....	23
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	26
3.1 Kerangka Konsep.....	26
3.2 Hipotesis Penelitian.....	29
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN.....	30
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	30
4.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	30
4.2.1 Alat Penelitian.....	30
4.2.2 Bahan Penelitian	31
4.3 Tahapan Penelitian	31
4.3.1 Penetapan Sampel Penelitian	31
4.3.2 Rancangan Penelitian.....	32
4.3.3 Variabel Penelitian.....	33
4.4 Prosedur Penelitian	34
4.4.1 Persiapan Hewan Percobaan	34
4.4.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh.....	35
4.4.3 Persiapan Tikus dengan Induksi Sipermetrin	35
4.4.4 Pemberian Terapi Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh	36
4.4.5 Pengambilan Jaringan pada Organ Ginjal	36
4.4.6 Pembuatan Preparat Histopatologi dan Imunohistokimia	37
4.4.7 Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin	37
4.4.8 Ekspresi TNF- α dengan Pewarnaan Imunohistokimia.....	38
4.5 Analisa Data	39
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	40
5.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh terhadap Gambaran Histopatologi Ginjal.....	40
5.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh terhadap Ekspresi TNF- α	45
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	54
6.1 Kesimpulan.....	54
6.2 Saran.....	54
DAFTAR PUSTAKA.....	55
LAMPIRAN.....	59

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Data Biologis Tikus.....	25
4.1 Rancangan Kelompok Penelitian.....	33
5.1 Rata-rata ekspresi TNF- α pada glomerulus tikus kontrol negatif, tikus yang diinduksi sipermetrin dan tikus yang diterapi menggunakan ekstrak daun belimbing wuluh.....	48



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur Kimia Piretroid Jenis Sipermetrin.....	7
2.2 Struktur Normal Ginjal (a) Skematis dan (b) Histologis Pewarnaan HE perbesaran 400 x	16
2.3 Belimbing Wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i> L.).....	17
2.4 Struktur Kimia Katekin.....	21
2.5 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	23
3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	26
5.1 Gambaran histopatologi pada glomerulus ginjal hewan model tikus yang diinduksi sipermetrin dan telah diterapi dengan ekstrak daun belimbing wuluh (perbesaran 400x, pewarnaan HE.....	41
5.2 Ekspresi TNF- α pada ginjal hewan model tikus yang diinduksi sipermetrin dan telah diterapi dengan ekstrak daun belimbing wuluh (perbesaran 400x).....	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian.....	60
2. Perhitungan Volume dan Pengenceran Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh.....	61
3. Perhitungan Volume Pemberian Sipermetrin.....	62
4. Pembuatan Preparat Jaringan.....	63
4.1 Embedding Jaringan.....	63
4.2 Pewarnaan Slide Preparat.....	63
4.3 Pewarnaan Hematoxylen Eosin.....	64
5. Ekspresi TNF- α	65
5.1 Pembuatan Preparat.....	65
5.2 Pewarnaan Preparat dengan Teknik Imunohistokimia TNF- α	65
6. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh.....	66
6.1 Proses Ekstraksi.....	66
6.2 Proses Evaporasi.....	66
7. Keterangan Kelaikan Etik.....	67
8. Surat Keterangan Identifikasi.....	68
9. Hasil Uji LCMS.....	69
10. Data Hasil Ekspresi dan Perhitungan TNF- α	70
11. Hasil Analisa Statistika.....	71

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Simbol/singkatan	Keterangan
%	: prosentase
°C	: derajat Celcius
ANOVA	: <i>Analysis of variance</i>
BB	: Berat Badan
BM	: Berat Molekul
BNJ	: Beda Nyata Jujur
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
DAB	: <i>Diamino Benzidin</i>
DNA	: <i>Deoxyribose-nucleic acid</i>
Fe	: Ferum
FeCl ₃	: Ferum 3 Clorida
HE	: Hematoksin-Eosin
H ₂ O ₂	: <i>hydrogen peroxide</i>
LCMS	: <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i>
kDa	: Kilo Dalton
kg	: kilogram
LD	: <i>Lethal dose</i>
mg	: milligram
ml	: mililiter
NK	: <i>Natural Killer</i>
OH	: <i>Hidroksil</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	: <i>Paraformaldehyde</i>
pH	: <i>power of Hydrogen</i>
PUFA	: <i>Polyunsaturated fatty acids</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Faktor Alfa</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pestisida merupakan senyawa kimia pembunuh hama yang banyak digunakan di berbagai bidang dengan tujuan untuk mengurangi gangguan organisme pengganggu. Pestisida meliputi insektisida, fungisida, herbisida, nematisida dan rodentisida. Insektisida adalah pestisida yang paling sering menimbulkan keracunan selain herbisida, dibandingkan pestisida lainnya. Bidang peternakan merupakan bidang yang paling umum dalam penggunaan pestisida untuk mengatasi ektoparasit pada hewan. Selain di bidang peternakan juga digunakan di bidang pertanian sebagai pembasmi hama (Juhriyyah, 2008).

Sipermertin merupakan insektisida golongan piretroid yang digunakan untuk mengendalikan hama pada bidang peternakan, pertanian dan rumah tangga. Penggunaan sipermetrin sangat populer karena efektifitas dan harganya yang murah. Sama halnya dengan insektisida golongan organoklorin dan organofosfat, tidak dipungkiri bahwa senyawa ini juga memiliki dampak negatif bagi makhluk hidup dan lingkungan jika penggunaannya tidak bijaksana. Sipermetrin sangat bersifat toksik bagi ikan dan makhluk invertebrata yang hidup di air. Senyawa ini juga berbahaya bagi manusia karena merupakan racun yang menyerang sistem saraf, menekan sistem kekebalan tubuh dan menghambat pembentukan antibodi terhadap penyakit yang disebabkan oleh mikroba (Sari, 2012).

Masuknya sipermetrin ke dalam tubuh dapat mempengaruhi sistem saraf serta dapat menjadi radikal bebas jika teroksidasi. Radikal bebas yakni atom atau senyawa yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak bermuatan sehingga reaktif. Menurut Arief (2007) radikal bebas yang ada di tubuh manusia berasal dari 2 sumber yakni endogen (dari dalam tubuh) dan eksogen (dari luar tubuh). Eksogen yang berasal dari luar tubuh seperti polusi udara, radiasi UV, sinar-X, pestisida dan asap rokok. Radikal bebas endogen adalah radikal bebas yang berasal dari dalam tubuh sendiri seperti autoksidasi, oksidasi enzimatis dan *respiratory burst*. Akibat adanya faktor eksogen dan endogen, ROS dapat memicu aktivasi makrofag (proses fagositosis). Keadaan ini direspon oleh sistem imun dengan mengaktivasi I κ B yang mengalami degradasi proteosomal dan NF- κ B mengalami transkripsi di nucleus. Di dalam nucleus, faktor NF- κ B berikatan dengan target gen dan menstimulasi terjadinya transkripsi gen inflamasi. Aktivasi NF- κ B yang mengalami peningkatan direspon oleh makrofag untuk memproduksi dan mensekresi sitokin proinflamatori TNF- α sebagai indikator terjadinya inflamasi. Cara kerja sitokin TNF- α adalah dengan mengatur aktivasi, diferensiasi, dan proliferasi sel dalam proses inflamasi. Meningkatnya kadar TNF- α terjadi pada inflamasi akut dan kronis (Listyawati, 2014).

Pengobatan terhadap keracunan pestisida sipermetrin ini banyak menggunakan obat-obat kimiawi dan sintesis. Indonesia sebagai negara yang kaya akan aneka ragam tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat herbal. Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) merupakan salah satu jenis tanaman yang sering

digunakan sebagai obat tradisional. Tanaman ini banyak dimanfaatkan mengatasi berbagai penyakit seperti batuk, diabetes, rematik, gondongan, sariawan, sakit gigi, gusi berdarah, jerawat, diare sampai tekanan darah tinggi. Ekstrak daun belimbing wuluh mengandung antioksidan (Hayati, *et al.*, 2010).

Bahan aktif pada daun belimbing wuluh yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah katekin. Berdasarkan beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa katekin dapat berfungsi sebagai antioksidan biologis. Kadar katekin pada daun belimbing wuluh muda sebesar 10,92% (Ummah, 2010). Sebelumnya telah dilakukan penelitian oleh Suhardjono (2010) yang menunjukkan bahwa ekstrak daun belimbing wuluh pada dosis 25 mg/200 gram BB, 50 mg/200 gram BB, dan 100 mg/200 gram BB dapat menurunkan kadar ALT pada tikus yang mengalami kerusakan hepar karena induksi parasetamol 378 mg/200 gram BB dengan nilai signifikansi berturut-turut 0,000 ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol negatif. Kerusakan pada ginjal sejalan dengan kerusakan hepar karena setiap obat dan toksikan yang dimetabolisme di hati akan diteruskan menuju ginjal untuk difiltrasi.

Banyaknya kasus keracunan pestisida yang terjadi pada hewan dan manusia mendorong dilakukannya penelitian tentang berbagai efek yang dapat ditimbulkan pada tubuh. Pada penelitian ini dipelajari tentang pemanfaatan daun blimbing wuluh pada tikus (*Rattus norvegicus*) model hasil induksi sipermetrin berdasarkan ekspresi TNF- α dan gambaran histopatologi ginjal.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah dari penelitian ini yaitu :

1. Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol daun blimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) terhadap gambaran histopatologi organ ginjal tikus hasil induksi sipermetrin ?
2. Apakah terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol daun blimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) terhadap ekspresi TNF- α tikus hasil induksi sipermetrin ?

1.3 Batasan Masalah

Batasan Masalah pada penelitian ini adalah :

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan usia 8 – 12 minggu dengan berat rata-rata 200 gram, diperoleh dari Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya. Penggunaan hewan coba penelitian ini telah mendapatkan Laik Etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor 427-KEP-UB tahun 2015 (Lampiran 7).
2. Tikus pada penelitian menggunakan induksi sipermetrin yang diberikan secara per oral menggunakan sonde dengan dosis 150 mg/kg BB (Atessahin, 2005).
3. Terapi dilakukan menggunakan ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan dosis 500 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB per oral (Suhardjono, 2010).

4. Variabel yang diamati di dalam penelitian ini adalah histopatologi organ ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) hasil induksi sipermetrin dengan menggunakan pewarnaan HE dan ekspresi TNF- α dengan uji imunohistokimia.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun blimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) terhadap gambaran histopatologi organ ginjal tikus hasil induksi sipermetrin.
2. Mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun blimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) terhadap ekspresi TNF- α tikus hasil induksi sipermetrin.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan wawasan kepada masyarakat bahwa daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) bersifat antioksidan dan selanjutnya dapat dikembangkan untuk kepentingan pengobatan keracunan pestisida.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sipermetrin

2.1.1 Definisi

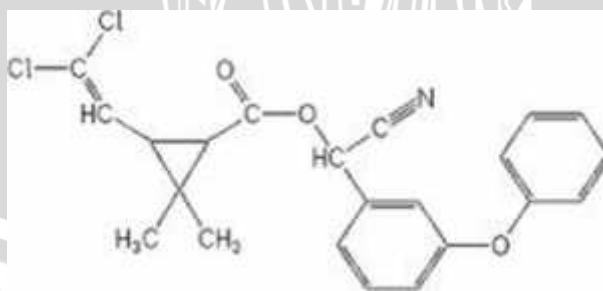
Sipermetrin merupakan salah satu jenis pestisida. Pestisida adalah substansi yang digunakan untuk membunuh atau mengendalikan berbagai hama. Kata pestisida berasal dari kata *pest* yang berarti hama dan *cida* yang berarti pembunuh. Jadi secara sederhana pestisida diartikan sebagai pembunuh hama yaitu tungau, tumbuhan pengganggu, penyakit tanaman yang disebabkan oleh fungi, bakteri, virus, nematoda, siput, tikus, burung dan hewan lain yang dianggap merugikan (Djojsumarto, 2008).

Pestisida mempunyai sifat-sifat fisik, kimia dan daya kerja yang berbeda-beda, karena itu dikenal banyak macam pestisida. Pestisida digolongkan menurut berbagai cara tergantung pada kepentingannya, antara lain: berdasarkan sasaran yang akan dikendalikan, berdasarkan cara kerja, berdasarkan struktur kimianya dan berdasarkan bentuknya (Wudianto, 2008).

Insektisida merupakan golongan pestisida pembasmi serangga. Insektisida ialah salah satu pestisida yang sering digunakan di bidang peternakan, pertanian, maupun kalangan rumah tangga. Pada umumnya insektisida yang digunakan termasuk ke dalam golongan organofosfat, organoklorin dan piretroid yang bersifat neurotoksin. Sipermetrin adalah insektisida sintetis piretroid yang digunakan untuk membunuh serangga pada kapas dan selada, membunuh kecoa, kutu, dan rayap di

rumah-rumah dan bangunan lain. Merupakan racun bagi lebah, cacing tanah, ikan, dan udang serta racun bagi sistem saraf (Bradberry, 2005).

Sipermetrin memiliki nama kimia (IUPAC Name) [cyano-(3-phenoxyphenyl) methyl] 3-(2,2-dichloro ethenyl)-2,2-dimethyl cyclopropane-1-carboxylate (**Gambar 2.1**). Rumus molekul sipermetrin adalah $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$, berat molekul 416,30 dan gugus sianida sebagai zat aktif insektisida. LD_{50} pada tikus jantan 247 mg/kg. Cukup stabil pada suhu di bawah $220^{\circ}C$, tetapi stabilitas optimum pada pH 4. Sipermetrin tersedia dalam beberapa formulasi seperti cairan (*emulsifiable concentrate*) atau tepung yang dapat disuspensikan dalam air (*wettable powder*) Metabolisme sipermetrin melibatkan berbagai jalur, dengan jalur utama yaitu hidrolisis ikatan ester. Sipermetrin terdiri isomer *cis* dan *trans*. Konfigurasi *cis* mengurangi tingkat pemutusan ikatan. *Cis* sipermetrin lebih stabil terhadap metabolik (Al-Ghanim, 2012).



Gambar 2.1 Struktur Kimia Sipermetrin (Wakeling, 2012).

Sipermetrin adalah pestisida jenis insektisida piretroid sintetis yang digunakan sebagai insektisida untuk mengontrol hama peternakan, hama pertanian seperti hama ngengat yang menyerang kapas, buah dan sayuran, serta termasuk struktur pengendalian hama dalam rumah tangga. Pestisida ini mudah terdegradasi pada tanah dan tanaman, tetapi bisa efektif untuk beberapa minggu ketika diterapkan pada permukaan yang lembab dalam ruangan. Paparan sinar matahari, air dan oksigen akan mempercepat dekomposisi dari sipermetrin. Penggunaan sipermetrin banyak ditemukan pada produk-produk insektisida peternakan (pembasmi serangga) serta insektisida rumah tangga (obat nyamuk semprot). Piretroid ini dianggap cukup beracun yang masuk dalam EPA (*Environmental Protection Agency*) Kategori II (David *et al.*, 2004).

2.1.2 Patomekanisme Intoksikasi Sipermetrin

Sipermetrin merupakan salah satu golongan piretroid yang bersifat tidak stabil yang memiliki efek menghambat reseptor asam aminobutirat yang dapat menyebabkan eksitasi dan konvulsi. Piretroid ini bekerja dengan cara menghambat penyerapan natrium oleh saraf dan juga menghambat oksidasi monoamine dan enzim yang memecah *neurotransmitter*. Selain itu juga dapat mempengaruhi kerja enzim adenosine tirofosfatase yang tidak berkaitan langsung dengan sistem saraf. Enzim ini terlibat langsung dalam hal produksi energi sel, transport sel logam dan kontraksi otot. Efek dari keracunan senyawa piretroid ini termasuk dalam spektrum yang luas

dengan tanda dan gejala umum keracunan saraf seperti hipersalivasi, kejang dan berpotensi kematian (Sari, 2012).

Neurotoksisitas dari sipermetrin dapat mengakibatkan keadaan stres oksidatif. Selama proses metabolisme, bentuk cyanohydrin dari sipermetrin terdekomposisi menjadi sianida dan aldehida yaitu zat yang dapat menginduksi terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS). Penyebab utama stres oksidatif adalah produksi *reactive oxygen species* dan *reactive nitrogen species* dalam sel atau jaringan ginjal yang terkena sipermetrin secara berlebihan. Selain itu, sipermetrin juga menyebabkan kerusakan DNA dan mengganggu proses pembelahan sel pada ginjal (Alwan, 2015).

Urin adalah jalur utama ekskresi sebagian besar toksikan. Akibatnya, ginjal mempunyai volume aliran darah yang tinggi, memekatkan toksikan pada filtrat, membawa toksikan melalui tubulus dan mengaktifkan toksikan tertentu. Karenanya, ginjal adalah organ sasaran utama dari efek toksik. Nefrotoksikan dapat menyebabkan efek buruk pada berbagai bagian ginjal, yang mengakibatkan berbagai perubahan fungsi. Kerusakan pada ginjal dapat mengenai glomerulus, tubulus maupun interstisiumnya. Penyakit yang terjadi pada glomerulus diantaranya adalah glomerulonefritis, glomerular lipidosis serta amyloidosis. Nefrosis adalah istilah morfologik yang digunakan para ahli patologi untuk kelainan ginjal degeneratif yang terutama mengenai tubulus. Nefrosis dapat diklasifikasikan menjadi :

1. Akut

) Nefrosis toksik (Nefrosis kimiawi, nefrosis cholemik, nefrosis osmotik,

nefrosis vakuoler)

) Nefrosis hipoksik

2. Kronik

) Nefrosis myeloma

) Nefrosis melanurik

2.2 Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF- α) Terhadap Inflamasi

Tumor Necrosis Faktor Alfa (TNF- α) adalah sitokin proinflamasi utama yang memiliki berat molekul sebesar 26 kDa yang kemudian dipecah menjadi 17 kDa. TNF- α menjadi mediator untuk imunitas alami dan imunitas spesifik. TNF- α juga berfungsi sebagai mediator yang penting untuk menjembatani antara respon imun spesifik dengan proses inflamasi akut (Listyawati, 2014).

Infeksi yang berat akan memicu produksi TNF- α dan akan menimbulkan reaksi sistemik. Sumber utama TNF- α adalah fagosit mononuclear dan sel T yang diaktifkan antigen, sel *Natural Killer* (NK) dan sel mast. TNF- α berfungsi membuat permukaan sel endotel menjadi adhesif melalui ekspresi reseptor permukaan baru (molekul adhesif) pada konsentrasi yang rendah. Selain itu, TNF- α juga menyebabkan peningkatan kemampuan adhesif netrofil terhadap endotel. Pada kadar rendah, TNF- α bekerja terhadap leukosit dan endotel, menginduksi inflamasi akut. Pada kadar sedang, TNF- α berperan dalam inflamasi sistemik, dan saat tinggi menimbulkan patologi syok septik (Karnen dan Iris, 2009).

Tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α) memiliki beberapa efek biologis antara lain (Karnen dan Iris, 2009) ;

- a. Pengerahan neutrofil dan monosit ke tempat infeksi serta mengaktifkan sel tersebut untuk menyingkirkan mikroba.
- b. Memacu ekspresi molekul adhesi sel endotel vaskular untuk leukosit.
- c. Merangsang makrofag mensekresi kemokin dan menginduksi hemotaksis dan pengerahan leukosit.
- d. Merangsang fagosit mononuklear untuk mensekresi IL-1 dengan efek seperti TNF.
- e. Menginduksi apoptosis sel inflamasi yang sama.
- f. Merangsang hipotalamus yang menginduksi panas oleh pirogen endogen.

2.3 Radikal Bebas

2.3.1 Pengertian Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan suatu molekul elektron tidak berpasangan pada orbit terluarnya. Radikal bebas yang signifikan di dalam tubuh adalah radikal bebas turunan dari oksigen reaktif yang meliputi superoksida hidroksil, peroksil, hidrogen peroksida dan oksigen nitrit. Molekul-molekul ini bersifat tidak stabil sehingga selalu berusaha untuk mencari elektron pasangannya. Tetapi, molekul-molekul radikal bebas ini sering menangkap elektron dari molekul-molekul makro pembentuk sel seperti lipid, protein polisakarida dan DNA sehingga menyebabkan terbentuknya radikal bebas baru dan secara terus menerus dapat mengakibatkan terjadinya

penumpukan radikal bebas dalam tubuh yang berefek merusak sel dan mengakibatkan munculnya beberapa penyakit degeneratif (Sadikin, 2003).

Sumber radikal bebas dapat dibedakan menjadi dua, yaitu radikal bebas yang berasal dari dalam tubuh (endogen) dan radikal bebas yang berasal dari luar tubuh (eksogen). Radikal bebas endogen merupakan radikal bebas alami yang diproduksi dalam tubuh sebagai hasil dari reaksi oksidasi pembentukan energi. Dan radikal bebas dari luar tubuh merupakan suatu radikal bebas yang berasal dari proses pembakaran, seperti emisi gas kendaraan bermotor, asap rokok, cemaran bahan kimia di lingkungan, residu dari makanan, paparan sinar matahari dan olahraga yang berlebihan juga dapat menjadi pemicu timbulnya radikal bebas (Tuminah, 2000).

2.3.2 Sifat-sifat Radikal Bebas

Suatu radikal bebas dapat merusak susunan sel dengan cara merusak susunan membran sel tersebut. Kerusakan pada membran sel ini dapat terjadi dengan cara :

- a. Radikal bebas akan berikatan secara kovalen dengan enzim dan/atau reseptor yang berada di membran sel, yang nantinya akan merubah aktivitas komponen-komponen yang ada pada membran sel tersebut.
- b. Radikal bebas akan berikatan secara kovalen dengan komponen membran sel sehingga dapat mengakibatkan perubahan struktur membran dan akan mengakibatkan perubahan pada fungsi membran dan karakter membran.
- c. Radikal bebas akan mengganggu sistem transport membran sel melalui ikatan kovalen dan akan mengoksidasi kelompok *thiol* atau merubah asam lemak *polyunsaturated*.

- d. Radikal bebas akan menginisiasi peroksidasi lipid secara langsung pada dinding asam lemak *polyunsaturated*.

Radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid membran sel. Peroksida-peroksida lipid ini akan terbentuk dalam rantai yang panjang yang dapat merusak susunan membran sel. Peroksida ini akan mempengaruhi fluiditas membran, *cross-linking* membran, serta struktur dan fungsi membran (Powers and Jackson, 2008).

2.4 Ginjal

2.4.1 Definisi Ginjal

Ginjal adalah organ yang menyaring plasma dan unsur-unsur plasma dari darah, dan kemudian secara selektif menyerap kembali air dan unsur-unsur berguna dari filtrat, yang akhirnya mengeluarkan kelebihan dan produk buangan plasma. Hampir semua jenis ternak ginjalnya memiliki bentuk seperti kacang kecuali ginjal sapi dengan lobul-lobulnya, serta kuda dengan ginjal kanan menyerupai bentuk jantung (Juhriyyah, 2008).

Secara makroskopis, sebuah ginjal dengan potongan memanjang memberi dua gambaran dua daerah yang cukup jelas. Daerah perifer yang beraspek gelap disebut korteks, dan selebihnya yang agak cerah disebut medula, berbentuk piramid terbalik. Secara mikroskopis, korteks yang gelap tampak diselang dengan interval tertentu olah jaringan medula yang berwarna agak cerah, disebut garis medula (*medullary rays*). Substansi korteks di sekitar garis medula disebut labirin korteks. Medula tampak

lebih cerah dan tampak adanya jalur-jalur yang disebabkan oleh buluh-buluh kemih yang lurus dan pembuluh darahnya (Juhriyyah, 2008).

Ginjal merupakan organ kedua setelah hepar, yang paling sering menjadi sasaran perusakan oleh zat – zat kimia. Hal ini disebabkan banyak zat kimia yang diekskresi melalui urin. Selain itu, ginjal juga menerima aliran darah yang besar dan glomerulus ginjal mempunyai area permukaan luas yang memungkinkan terjadinya paparan dengan zat kimia. Kemampuan ginjal untuk memekatkan larutan dan substansi juga menjadikan ginjal rentan terhadap perusakan oleh zat kimia (Juhriyyah, 2008).

2.4.2 Anatomi dan Fungsi Ginjal

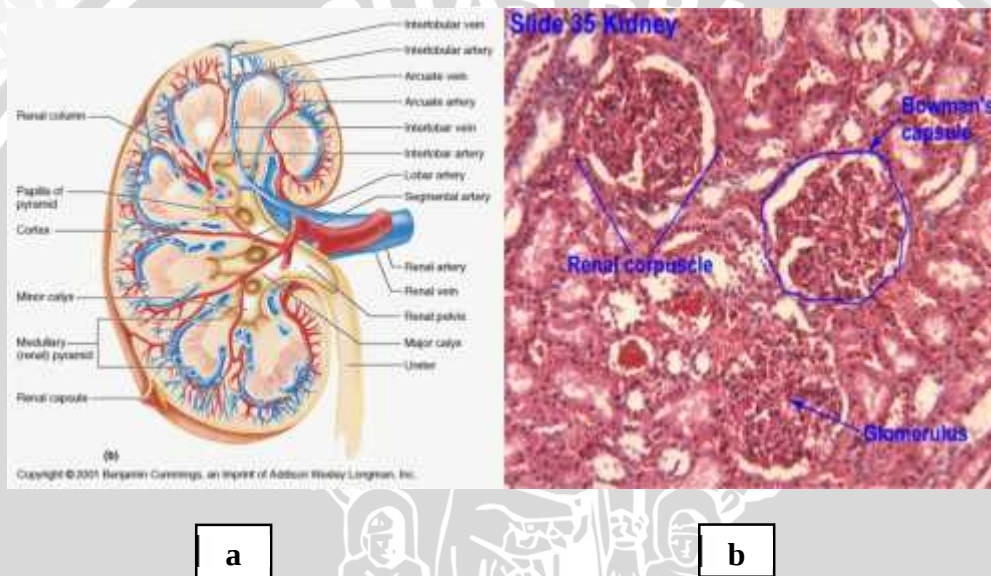
Ginjal pada setiap makhluk hidup ada sepasang yang masing-masing terletak di bagian tubuh kiri dan kanan (Sloane, 2003). Ginjal terletak di bagian *dorsal cavum abdominal*, pada hewan domestik ginjal kanan terletak lebih *cranial* daripada sebelah kiri (Wilke, 2009). Organ ini merupakan filter plasma dan komponen plasma dari darah. Masing-masing ginjal mempunyai lebih dari satu juta unit penyaring mini yang disebut nefron. Nefron merupakan unit fungsional ginjal sehingga mampu membuang komponen yang tidak diperlukan dari darah. Setiap nefron terdiri dari glomerulus, tubulus proksimal, ansa henle, tubulus distal dan tubulus urinarius. Setiap ginjal berisi darah dari arteri yang mengalir ke kumpulan pembuluh darah halus ginjal, kumpulan pembuluh darah halus ini berfungsi sebagai unit penyaring ginjal yang disebut glomerulus. Setiap glomerulus dikelilingi oleh organ mirip cangkir yang disebut *kapsula Bowman* (Alam, 2007).

Ginjal berfungsi untuk menyaring zat-zat buangan yang dibawa darah agar darah tetap bersih dan membuang sampah metabolik tersebut agar sel-sel tubuh tersebut tidak menjadi lemah akibat keracunan. Ginjal adalah salah satu sistem detoksifikasi utama setelah hati, dengan membuang racun tubuh yang telah dilarutkan dalam air oleh hati agar dapat dibawa oleh darah, kemudian dibuang bersama kelebihan cairan tubuh melalui urin. Ginjal juga berfungsi mempertahankan kadar cairan dan elektrolit tubuh, mengatur tekanan darah, mengatur kadar kalsium pada tulang, dan mengatur produksi sel darah baru (Alam, 2007).

Ginjal melakukan fungsinya yang paling penting dengan menyaring plasma dan memindahkan zat dari filtrat dengan kecepatan yang bervariasi bergantung pada kebutuhan tubuh. Akhirnya ginjal “membuang” zat yang tidak diinginkan dari filtrat dengan mengekskresikannya dalam urin, sementara zat yang dibutuhkan dikembalikan ke dalam darah. Proses pembentukan urin dimulai dengan filtrasi sejumlah besar cairan yang hampir bebas protein dari kapiler glomerulus ke kapsula bowman. Kebanyakan zat dalam plasma, kecuali protein, difiltrasi secara bebas sehingga konsentrasinya pada filtrat glomerulus dalam kapsula Bowman hampir sama dengan plasma. Ketika cairan yang telah difiltrasi ini meninggalkan kapsula Bowman dan mengalir melewati tubulus, cairan ini mengalami perubahan akibat adanya reabsorpsi air dan zat terlarut spesifik kembali ke dalam darah atau sekresi zat-zat lain dari kapiler peritubulus ke dalam tubulus (Juhriyyah, 2008).

Salah satu bagian ginjal yang paling sering terjadi kerusakan disebabkan zat kimia adalah tubulus proksimal. Tubulus proksimal peka terhadap anoksia dan mudah

hancur karena keracunan akibat kontak dengan bahan-bahan yang diekskresikan melalui ginjal. Kerusakan yang sering terjadi adalah nekrosis tubulus dan hiperplasi atau hipoplasi tubulus. Bagian lain dari ginjal yang dapat terkena kerusakan adalah *loop henle* dan glomerulus (Juhriyyah, 2008). Struktur normal ginjal dapat dilihat pada Gambar 2.2



Gambar 2.2 Struktur normal ginjal (a) Skematis dan (b) Histologis pewarnaan HE perbesaran 400x (Juhriyyah, 2008).

2.5 Belimbing Wuluh

2.5.1 Definisi Belimbing Wuluh

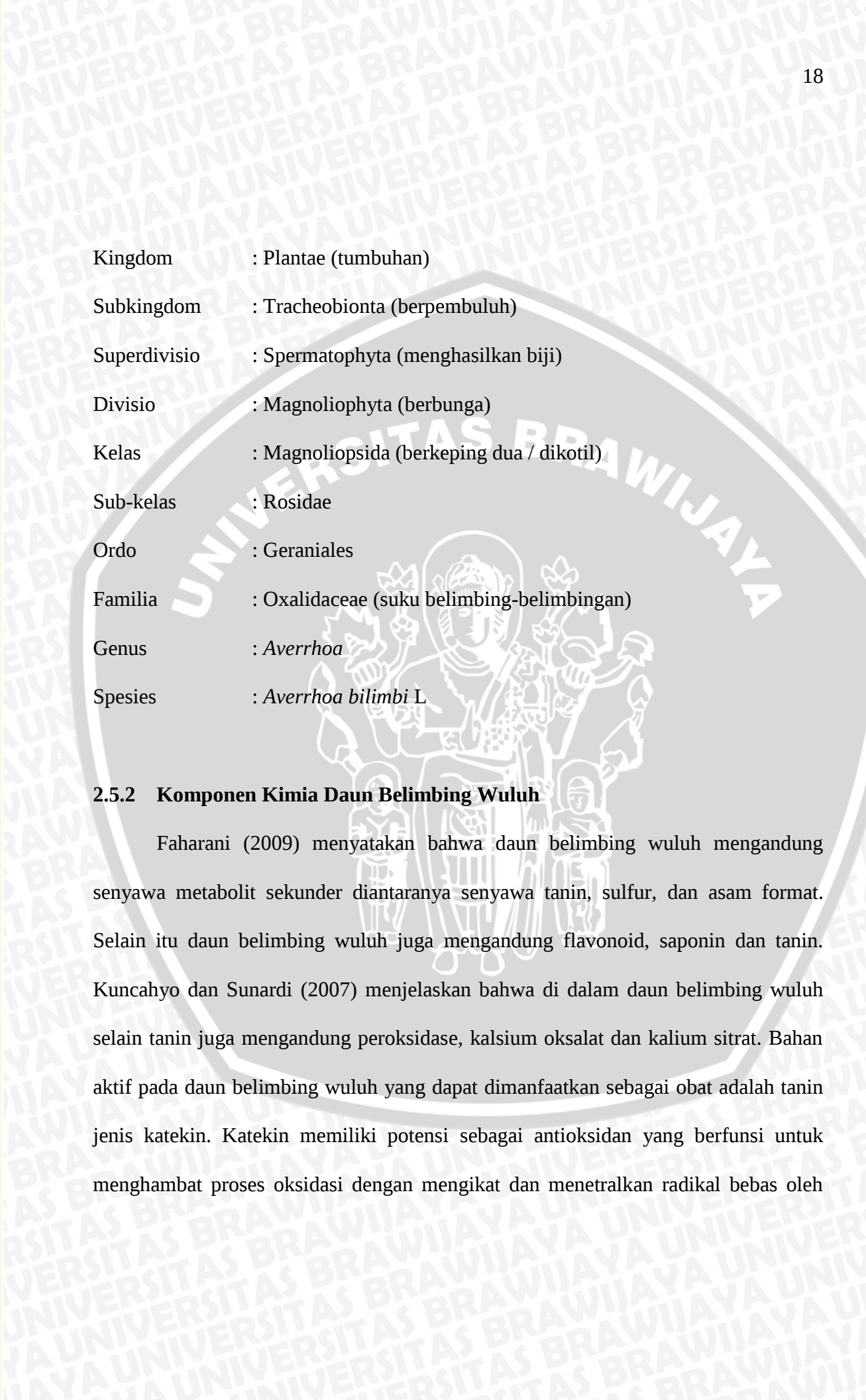
Tanaman di Indonesia banyak yang bisa memberi manfaat untuk kehidupan, salah satu diantaranya adalah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Belimbing wuluh merupakan salah satu spesies dalam famili *Averrhoa* yang tumbuh di daerah ketinggian hingga 500 m di atas permukaan laut dan dapat ditemui di tempat yang

banyak terkena sinar matahari langsung tetapi cukup lembab. Pada umumnya belimbing wuluh ditanam dalam bentuk tanaman pekarangan yaitu diusahakan sebagai usaha sambilan atau tanaman peneduh di halaman rumah (Parikesit, 2011).

Pohon yang berasal dari Amerika tropis ini menghendaki tempat tumbuh yang terkena cahaya matahari langsung dan cukup lembab. Pohonnya tergolong kecil, tinggi mencapai 10 m dengan batang tidak begitu besar, kasar berbenjol-benjol dan mempunyai garis tengah sekitar 30 cm. Percabangan sedikit, arahnya condong ke atas, cabang muda berambut halus seperti beludru berwarna coklat muda. Bunga berupa malai, berkelompok, keluar dari batang atau cabang yang besar. Bunga kecil-kecil berbentuk bintang, warnanya ungu kemerahan. Buahnya berbentuk bulat lonjong bersegi, panjang 4-6,5 cm, warnanya hijau kekuningan, bila masak berair banyak dan rasanya masam. Bijinya berbentuk bulat telur (Dalimartha, 2006). Adapun gambar dari belimbing wuluh dapat dilihat pada Gambar 2.3



Gambar 2.3 Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) (Savitri, 2014).



Kingdom	: Plantae (tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (berpembuluh)
Superdivisio	: Spermatophyta (menghasilkan biji)
Divisio	: Magnoliophyta (berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
Sub-kelas	: Rosidae
Ordo	: Geraniales
Familia	: Oxalidaceae (suku belimbing-belimbingan)
Genus	: <i>Averrhoa</i>
Spesies	: <i>Averrhoa bilimbi</i> L.

2.5.2 Komponen Kimia Daun Belimbing Wuluh

Faharani (2009) menyatakan bahwa daun belimbing wuluh mengandung senyawa metabolit sekunder diantaranya senyawa tanin, sulfur, dan asam format. Selain itu daun belimbing wuluh juga mengandung flavonoid, saponin dan tanin. Kuncahyo dan Sunardi (2007) menjelaskan bahwa di dalam daun belimbing wuluh selain tanin juga mengandung peroksidase, kalsium oksalat dan kalium sitrat. Bahan aktif pada daun belimbing wuluh yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah tanin jenis katekin. Katekin memiliki potensi sebagai antioksidan yang berfungsi untuk menghambat proses oksidasi dengan mengikat dan menetralkan radikal bebas oleh

gugus hidroksil dan juga dapat mengikat ion logam seperti besi yang mana dapat mengakibatkan radikal bebas oksigen.

2.6 Tanin

Savitri (2014) menyebutkan bahwa tanin ditemukan dalam hampir semua genus tanaman baik digunakan sebagai bahan makanan oleh manusia ataupun hewan. Oksidasi tanin akan menghasilkan senyawa berwarna coklat yang tidak mampu mengendapkan protein. Fenol sangat peka terhadap oksidasi enzim dan mungkin hilang pada proses isolasi akibat kerja enzim fenolase yang terdapat pada tumbuhan.

Secara kimia tanin tumbuhan dibagi menjadi dua golongan yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin terhidrolisis mengandung ikatan ester yang dapat terhidrolisis jika dididihkan dalam asam klorida encer. Tanin terkondensasi merupakan senyawa tidak berwarna yang terdapat pada seluruh dunia tumbuhan tetapi terutama pada tumbuhan berkayu. Tanin terkondensasi telah banyak ditemukan dalam tumbuhan paku-pakuan (Sa'adah, 2010).

Kadar tanin yang tinggi pada simplisia daun belimbing wuluh muda 1,6 % dan pada daun belimbing wuluh tua sebesar 1,28 % (Nurliana, 2006). Lidyawati (2006) menjelaskan dalam penelitiannya bahwa kadar tanin pada daun belimbing wuluh sebesar 26,2 %. Isolasi tanin dari daun belimbing wuluh dapat dilakukan dengan pengambilan daun belimbing wuluh sekitar 20 cm dari pucuk daun, sehingga tanpa merusak pertumbuhan dapat diperoleh tanin dari daunnya .

Savitri (2014) menyebutkan bahwa kompleks tanin-protein umumnya terbentuk dengan adanya ikatan hidrogen dan tidak larut. Ikatan hidrogen antara gugus karbonil dari ikatan peptida dengan gugus hidroksil dari tanin merupakan ikatan yang paling dominan di dalam kompleks tanin protein. Interaksi hidrofobik tanin-protein terlihat pada cincin aromatik fenol dan alifatik serta rantai samping aromatik pada protein asam amino. Tanin terdiri dari katekin, leukoantosianin dan asam hidroksi yang masing-masing dapat menimbulkan warna bila bereaksi dengan ion logam.

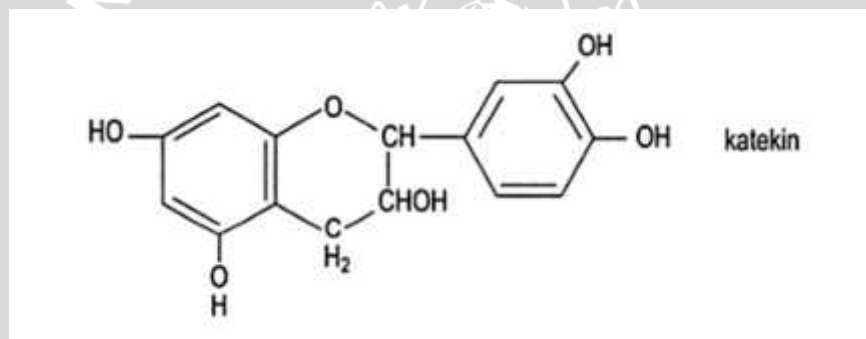
Tanin termasuk dalam senyawa aktif metabolit sekunder yang diketahui mempunyai beberapa khasiat yaitu sebagai astringen, anti diare, anti bakteri dan antioksidan. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat. Tanin akan berperan dalam menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas (Malangngi, 2012).

2.6.1 Katekin

Tanin terkondensasi secara biosintesis dapat dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal (galokatekin) yang membentuk senyawa dimer dan kemudian oligomer yang lebih tinggi. Katekin adalah senyawa yang tidak berwarna dan memberikan rasa pahit. Senyawa ini memiliki aktivitas antioksidan jenis bioflavonoid yang 100 kali lebih efektif dari vitamin C dan 25 kali dari vitamin E. Strukturnya memiliki dua gugus fenol (cincin-A dan -B) dan satu gugus dihidropiran

(cincin-C). Karena memiliki lebih dari satu gugus fenol, senyawa katekin sering disebut senyawa polifenol (Heronyati, 2012).

Potensi katekin sebagai antioksidan efektif untuk menghambat proses oksidasi dengan mengikat dan menetralkan radikal bebas oleh grup hidroksil. Selain itu, polifenol tersebut mendorong aktivitas detoksifikasi komponen xenobiotika, dan juga dapat mengikat ion logam seperti besi yang mana dapat mengakibatkan radikal bebas oksigen (Heronyati, 2012). Struktur kimia dari katekin dapat dilihat pada Gambar 2.4



Gambar 2.4 Struktur kimia tanin katekin (Heronyati, 2012).

2.7 Fungsi Antioksidan

Pada jaman sekarang ini, pemanfaatan senyawa antioksidan semakin meluas seiring dengan berkembangnya pemahaman masyarakat tentang kegunaan senyawa antioksidan untuk menghambat terjadinya penyakit degeneratif seperti penyakit jantung, *arteriosclerosis*, kanker dan gejala-gejala penuaan. Tubuh tidak memiliki sistem pertahanan terhadap antioksidan yang tinggi, oleh karena itu jika terjadi

paparan radikal bebas yang berlebih maka tubuh memerlukan antioksidan eksogen (Kuncahyo dan Sunardi, 2007).

Antioksidan merupakan suatu senyawa kimia yang bisa menyumbangkan satu atau lebih elektron pada radikal bebas sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam. Antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu antioksidan alami yang berasal dari makanan (buah-buahan dan sayuran) yang biasa dikonsumsi sehari-hari, contohnya *beta karoten*, vitamin C dan vitamin E, dan antioksidan sintetis yang diperoleh dari hasil reaksi kimia. Beberapa contoh bahan makanan yang kaya akan antioksidan adalah (Suhartono, 2002) :

- a. Vitamin A : wortel, brokoli, sayur hijau, bayam, labu, hati, kentang, belimbing, telur, apricot, mangga, susu dan ikan.
- b. Vitamin C : lada/merica, cabe, peterseli, jambu biji, kiwi, brokoli, taoge, belimbing wuluh, kesemek, papaya, strawberry, jeruk, lemon, bunga kol, bawang putih, anggur, raspberry, jeruk, bayam, tomat, nanas.
- c. Vitamin E : asparagus, alpukat, buah zaitun, bayam, kacang-kacangan, biji-bijian, minyak sayur dan sereal.
- d. Karoten : beta karoten, lutein, wortel, labu, sayuran hijau, buah-buahan berwarna merah, tomat dan rumput laut.
- e. Polifenol : buah berry, teh, anggur, zaitu, coklat, kopi, belimbing, kenari dan kacang.

Antioksidan alami mempunyai fungsi sebagai pelindung tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan oleh spesies oksigen reaktif, antioksidan juga berfungsi

sebagai penghambat terjadinya penyakit degeneratif dan juga sebagai penghambat terjadinya peroksidasi lipid pada makanan (Kuncahyo dan Sunardi, 2007).

2.8 Hewan Coba

Tikus termasuk hewan menyusui (kelas mamalia) yang mempunyai peranan penting dalam kehidupan manusia, baik bersifat menguntungkan maupun merugikan. Sifat menguntungkan terutama dalam hal penggunaannya sebagai hewan percobaan di laboratorium. Sifat merugikannya yaitu dalam hal posisinya sebagai hama pada komoditas pertanian, hewan pengganggu di rumah dan gudang, serta penyebar dan penular (vektor) dari beberapa penyakit pada manusia. Tikus telah diketahui sifat-sifatnya dengan sempurna, mudah dipelihara, merupakan hewan yang relatif sehat dan cocok untuk berbagai macam penelitian. Dibandingkan dengan tikus liar, tikus laboratorium lebih cepat menjadi dewasa, tidak memperlihatkan perkawinan musiman, dan umumnya lebih mudah berkembangbiak (Juhriyyah, 2008). Adapun gambaran dari hewan coba dapat dilihat pada Gambar 2.5



Gambar 2.5 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Sirois, 2005).

Sistem klasifikasi tikus *Rattus norvegicus* menurut Sharp and La Regina (2004) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>
Galur	: Sprague Dawley Wistar

Terdapat beberapa galur atau varietas tikus yang memiliki kekhususan tertentu antara lain galur Sprague-Dawley yang berwarna albino putih, berkepala kecil dan ekornya lebih panjang daripada badannya; galur Wistar ditandai dengan kepala besar dan ekor yang lebih pendek; dan galur Long Evans yang lebih kecil daripada tikus putih dan memiliki warna hitam pada kepala dan tubuh bagian depan (Juhriyyah, 2008).

Tikus sebagai hewan omnivora (pemakan segala) biasanya mau mengkonsumsi semua makanan yang dapat dimakan manusia. Kebutuhan pakan bagi

seekor tikus setiap harinya kurang lebih sebanyak 10% dari bobot tubuhnya, jika pakan tersebut berupa pakan kering. Hal ini dapat pula ditingkatkan sampai 15% dari bobot tubuhnya jika pakan yang dikonsumsi berupa pakan basah. Kebutuhan minum seekor tikus setiap hari kira-kira 15-30 ml air. Jumlah ini dapat berkurang jika pakan yang dikonsumsi sudah mengandung banyak air. Tingkat konsumsi dipengaruhi oleh temperatur kandang, kelembaban, kesehatan dan kualitas makanan itu sendiri. (Juhriyyah, 2008). Beberapa data biologis tikus laboratorium dapat dilihat pada Tabel

2.1

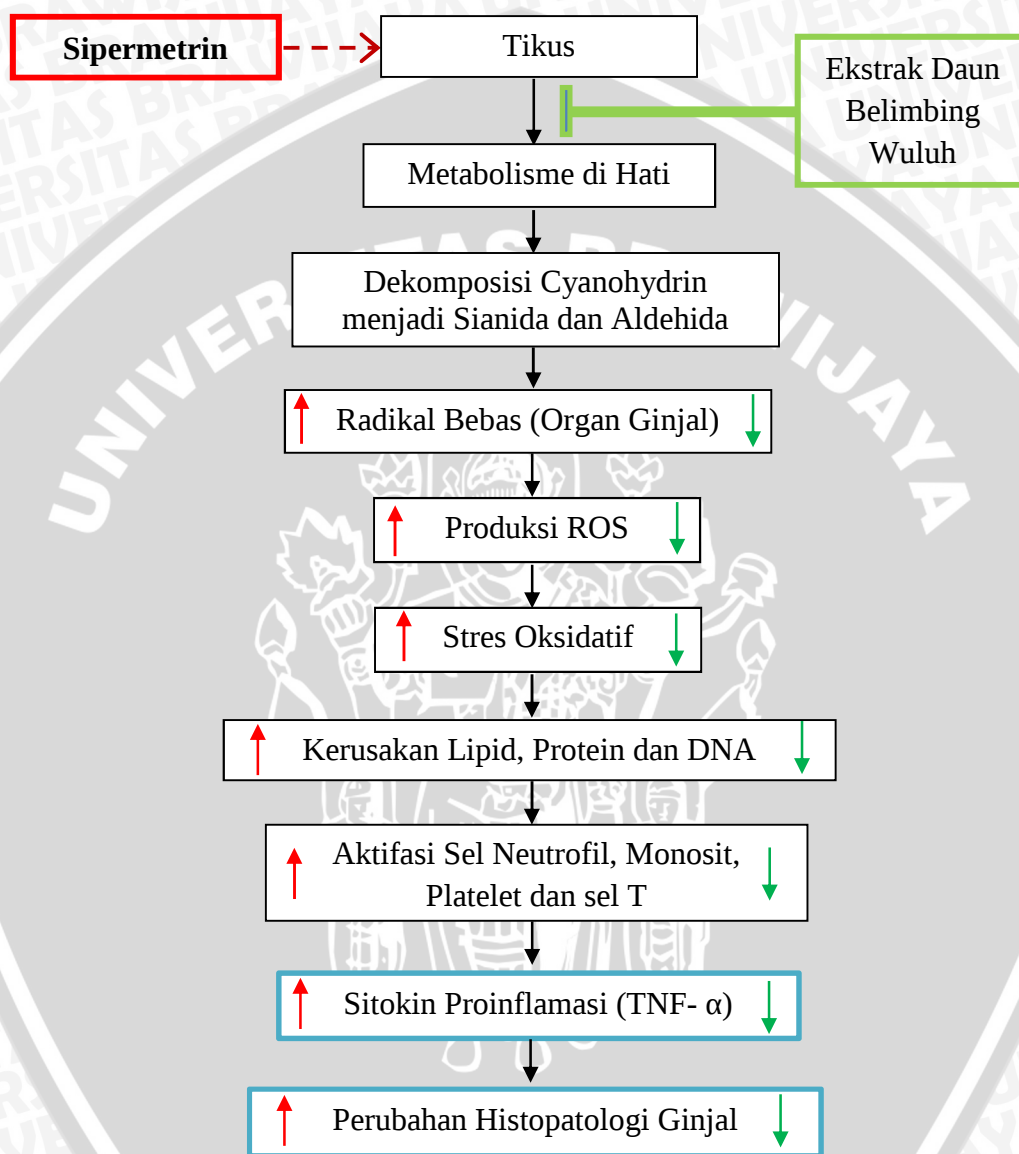
Tabel 2.1 Data biologis tikus

Lama hidup	2-3 tahun, dapat sampai 4 tahun
Lama bunting	20-22 hari
Kawin sesudah beranak	1 sampai 24 jam
Umur disapih	21 hari
Umur dewasa	40-60 hari
Siklus kelamin	Poliestrus
Siklus estrus	4-5 hari
Lama estrus	9-20 jam
Berat dewasa	300-400 g jantan; 250-300 g betina
Berat lahir	5-6 g
Jumlah anak	Rata-rata 9, dapat 20
Aktivitas	Nokturnal
Kecepatan tumbuh	5 g/hari
Pernapasan	65-115/menit
Denyut jantung	330-480/menit
Tekanan darah	90-180 sistol, 60-145 diastol
Konsumsi oksigen	1,29-2,68 ml/g/jam

(Juhriyyah, 2008).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

- - - - -> : Paparan
- ↑ : Peningkatan
- ↓ : Penurunan
- └─ : Pemberian Terapi
- (red) : Induksi
- (green) : Bahan Terapi
- (blue) : Variabel Diamati

Hewan coba dipapar dengan sipermetrin melalui rute oral menggunakan sonde. Jalur paparan sipermetrin melalui rute oral akan melewati saluran pencernaan yaitu mulai dari mulut, faring, esophagus, lambung dan menuju usus. Sipermetrin akan berdifusi melalui pembuluh darah perifer dan didistribusikan ke hati. Pada organ hati terjadi proses metabolisme. Ketika proses metabolisme, terjadi dekomposisi bentuk cyanohydrin dari sipermetrin menjadi sianida dan aldehida oleh enzim sitokrom P450. Zat tersebut dapat menginduksi terbentuknya radikal bebas. Radikal bebas yang terbentuk pada hati akan didistribusikan ke seluruh tubuh salah satunya pada ginjal. Sipermetrin akan menghasilkan radikal bebas pada organ ginjal.

Radikal bebas masuk ke organ ginjal melalui arteri renalis. Arteri renalis berfungsi mengantarkan darah menuju ginjal untuk disaring di glomerulus. Radikal bebas yang menumpuk di jaringan organ ginjal akan meningkat dari kondisi normal. Radikal yang jumlahnya meningkat memiliki hasil samping berupa peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS). Akibat jumlah radikal bebas di dalam tubuh melebihi antioksidan alami tubuh sehingga terjadi stres oksidatif yang dapat menginduksi kerusakan sel pada ginjal. *Reactive Oxygen Species* masuk kedalam sel melalui membran *fosfolipid bilayer* dan terjadi peroksidasi lipid yang berakibat pada kerusakan DNA dan metabolisme dalam mitokondria sel ginjal.

Akumulasi radikal bebas di organ ginjal menstimulasi aktivasi dari makrofag, neutrofil, monosit dan sel T. Makrofag merangsang sekresi sitokin proinflamasi, salah satunya berupa $\text{TNF-}\alpha$. Tumor nekrosis faktor alfa memicu

terjadinya inflamasi dalam jaringan ginjal. Inflamasi yang berkepanjangan akan menyebabkan terjadinya adaptasi sel dan terjadinya perubahan gambaran histopatologi ginjal.

Ekstrak daun belimbing wuluh diberikan melalui rute oral melewati saluran pencernaan masuk ke dalam pembuluh darah perifer untuk kemudian menyebar ke seluruh tubuh. Melalui pembuluh darah perifer, ekstrak daun belimbing wuluh akan menuju tubulus proksimal ginjal dimana kadar toksikan pada organ tersebut lebih tinggi karena terjadi akumulasi. Antioksidan utama pada ekstrak daun belimbing wuluh adalah katekin. Katekin bekerja optimal dengan cara memberikan atom hidrogen kepada radikal bebas yang menyebabkan radikal bebas menjadi kurang reaktif. Antioksidan akan menyebabkan keseimbangan antara oksidan dengan antioksidan sehingga stres oksidatif dapat diturunkan. Penurunan stres oksidatif menyebabkan lipid, protein dan DNA pada jaringan ginjal menjadi lebih stabil. Sel neutrofil, monosit dan sel T menurun sehingga sitokin proinflamasi (TNF- α) juga menurun dan menghambat kerusakan ginjal. Ekspresi TNF- α dan kondisi jaringan ginjal dapat mengalami perbaikan disebabkan oleh katekin. Katekin menyumbangkan atom hidrogennya pada radikal bebas agar menjadi stabil. Radikal bebas yang stabil tidak akan berikatan dengan molekul lipid, protein dan DNA pada sel ginjal sehingga kerusakan ginjal menurun. Penurunan jumlah sel ginjal yang rusak menurunkan aktivitas makrofag sehingga sekresi TNF- α juga menurun. Penurunan TNF- α menunjukkan inflamasi pada jaringan ginjal menurun dan kondisi jaringan ginjal menjadi stabil kembali.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Pemberian terapi ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) mampu memperbaiki gambaran histopatologi organ ginjal pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan sipermetrin.
2. Pemberian terapi ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) dapat menurunkan ekspresi *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) pada ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan sipermetrin.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan September - November 2015 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya dan Laboratorium Patologi RSSA Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain bak pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, labu takar (10 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL), pipet tetes, gelas ukur 100 mL, gelas kimia (50 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL), pengaduk kaca, tabung reaksi, corong gelas, mortar, rak tabung reaksi, penangas air, spatula, botol semprot, tabung polipropilen, lemari pendingin, pH meter digital, penjepit, inkubator (Mettler), vortex (Guo-Huq), timbangan digital, plastik klip, toples, tisu, obyek *glass*, *cover glass*, timbangan, alat sonde, pot organ, kertas label, spidol marker, spuit tuberculin, botol larutan, sarung tangan (*gloves*) dan masker.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), makanan dan minuman hewan coba, daun belimbing wuluh, sipermetrin, parafin, ethanol 96%, akuades steril, alkohol 96%, PBS, NaCl 0,9%, formalin absolut 37%, minyak emersi, pewarna Hematoxylen-Eosin, alkohol bertingkat (30%, 40%, 50%, 60%, 70%), xylol, H₂O₂, BSA, antibodi primer (Rat Anti rat TNF- α), antibodi sekunder berlabel biotin (*Goat Anti Rat biotin labeled*), SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*), dan DAB (*Diamano Benzidine*).

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Penetapan Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar berumur 8-12 minggu. Berat badan tikus rata-rata 200 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Hewan coba harus memiliki kondisi sehat (berambut cerah, aktivitas baik, tidak ada abnormalitas anatomis, dan nafsu makan baik), lulus proses sertifikasi layak etik penelitian oleh KEP, dan belum pernah digunakan penelitian. Daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) yang digunakan sebagai ekstrak untuk terapi diperoleh dari desa Lowokwaru, kecamatan Lowokwaru, Malang. Daun yang diambil tidak boleh terlalu tua atau terlalu muda agar tidak mengurangi kadar katekin yang akan digunakan sebagai bahan aktif terapi.

Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

$$\begin{aligned}t(n-1) &\geq 15 \\4(n-1) &\geq 15 \\4n-4 &\geq 15 \\4n &\geq 19 \\n &\geq 19/4 \\n &\geq 4,75 \\n &\geq 5\end{aligned}$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 4 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebanyak 5 ekor dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan total 20 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan coba.

4.3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental (*experiment design*) dengan menggunakan metode *Post test only control group design*, yaitu kegiatan percobaan (*experiment*) yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh yang timbul sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu. Dalam penelitian ini digunakan tikus putih jenis Wistar sebagai hewan coba, yang diinduksi menggunakan pestisida golongan piretroid yaitu sipermetrin menggunakan sonde lambung pada hari ke-1 dan diinkubasi selama 5 hari sebelum diberi perlakuan terapi untuk mengetahui efek sipermetrin terhadap metabolisme tikus.

Kelompok penelitian ditunjukkan dalam Tabel 4.1 sebagai berikut :

Tabel 4.1 Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok	Keterangan
P1	Tikus normal sebagai kontrol negatif.
P2	Perlakuan tikus yang di induksi sipermetrin dengan 150 mg/kg BB dan ditunggu selama 5 hari (kontrol positif).
P3	Perlakuan tikus yang di induksi sipermetrin dosis 150 mg/kg BB dan diterapi dengan ekstrak etanol daun belimbing wuluh dengan dosis 500 mg/kg BB menggunakan sonde lambung dan diberikan setiap hari selama 14 hari.
P4	Perlakuan tikus yang di induksi sipermetrin dosis 150 mg/kg BB dan diterapi dengan ekstrak etanol daun belimbing wuluh dengan dosis 1000 mg/kg BB menggunakan sonde lambung dan diberikan setiap hari selama 14 hari

4.3.3 Variabel Penelitian

Adapun variabel penelitian terdiri dari :

1. Variabel bebas

- Induksi sipermetrin yaitu dengan dosis 150 mg/kg BB yang diberikan secara sonde lambung.
- Terapi ekstrak etanol daun belimbing wuluh pada tikus yaitu 500 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB yang diberikan selama 14 hari berturut-turut.

2. Variabel terikat

- Ekspresi TNF- α yang diukur dengan metode Imunohistokimia.
- Gambaran histopatologi organ ginjal diamati dengan HE.

3. Variabel kontrol

- Berat badan tikus, umur tikus, jenis kelamin tikus, suhu ruangan, kelembapan, kandang dan pakan tikus.

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Persiapan Hewan Percobaan

Tikus yang digunakan untuk penelitian diadaptasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian makanan berupa ransum basal pada semua tikus. Tikus dibagi dalam 4 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor tikus. Komposisi ransum basal disusun berdasarkan standar *Association of Analytical Communities* (AOAC) yaitu mengandung karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, mineral, vitamin, dan air 12%.

Tikus ditempatkan pada wadah bak plastik dengan ukuran diameter 80 cm dan tinggi 40 cm jumlahnya sesuai dengan jumlah tikus yang digunakan. Tempat tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara rebut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan, disanitasi dan ventilasi yang cukup.

4.4.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh

Kandungan daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) yang tertinggi adalah tannin jenis katekin dan flavonoid, maka metode ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode maserasi. Dalam metode ini menggunakan daun yang berumur tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda yaitu diambil dari tiga ruas setelah pangkal batang dan empat ruas sebelum ujung batang daun, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan setelah kering daun belimbing wuluh dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk simplisia. Setelah itu dilakukan pembuatan ekstraksi dengan cara merendam serbuk simplisia selama 24 jam di dalam wadah dengan menggunakan pelarut etanol.

Serbuk simplisia yang sudah dilarutkan dengan etanol kemudian dimasukkan kedalam labu ekstraksi dan selanjutnya labu ekstraksi dimasukkan dalam alat evaporasi hingga sebagian labu ekstraksi terendam oleh aquades pada *waterbath*. *Waterbath* dihubungkan dengan sumber listrik dan diatur suhunya sebesar 60 - 70°C. Larutan air dibiarkan memisah dengan zat aktif yang ada didalam bagian labu ekstraksi, hasil dari ekstraksi dalam bentuk cair (Savitri, 2014).

4.4.3 Persiapan Tikus dengan Induksi Sipermetrin

Sipermetrin diberikan dengan dosis 150 mg/kg BB. Pembuatan larutan sipermetrin yang akan diinduksikan pada tikus dilakukan dengan cara mengambil sipermetrin dengan sediaan 30 gram/L. Sipermetrin sebanyak 1 ml dimasukkan menggunakan sonde lambung pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang kondisi

tikusnya dalam keadaan sehat. Setelah dilakukan penginduksian pertama ditunggu dan diamati selama 6 jam untuk mengetahui efek selanjutnya yaitu berupa kejang, rambut berdiri, hipersalivasi, kelopak mata mengecil, respon menurun, dan aktivitas berkurang. Kemudian tikus diobservasi selama lima hari sebelum diberi perlakuan terapi untuk mengetahui efek sipermetrin terhadap metabolisme tikus.

4.4.4 Pemberian Terapi Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh

Tikus terapi satu (P3) dan terapi dua (P4) diberikan terapi ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) diberikan menggunakan sonde lambung setiap hari selama 14 hari dengan dosis P3 500 mg/kg BB dan P4 1000 mg/kg BB. Setelah 14 hari tikus dimatikan untuk dilakukan pengamatan ekspresi TNF- α serta organ ginjal.

4.4.5 Pengambilan Jaringan pada Organ Ginjal

Pengambilan jaringan organ ginjal hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-19 setelah diberikan terapi selama 14 hari dengan ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*). Sebelum pengambilan organ ginjal, langkah pertama yang dilakukan adalah mendislokasi hewan coba pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan. Pembedahan dilakukan pada bagian peritonium, tikus diletakkan pada posisi rebah dorsal pada papan pembedahan. Bagian ekstremitas difiksasi dengan jarum kemudian bagian peritonium diinsisi, diisolasi dan dipotong. Ginjal dari tikus terletak di daerah retroperitoneal, ventro lateral dari columna vertebralis. Organ ginjal mula-mula dibilas dengan NaCl-

fisiologis 0,9% dingin. Kemudian organ ginjal dimasukkan dalam larutan PFA 4% dan dilakukan pewarnaan HE.

4.4.6 Pembuatan Preparat Histopatologi dan Imunohistokimia

Organ yang sudah difiksasi menggunakan PFA 4% kemudian didehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dari konsentrasi 70% selama 24 jam, etanol 80% selama 2 jam, etanol 90%, 95% dan etanol absolut selama 20 menit. Kemudian dilakukan penjernihan dengan cara merendam jaringan dengan larutan xylol I selama 20 menit dan xylol II selama 30 menit. Infiltrasi dan *embedding* dengan menggunakan parafin cair pada inkubator bersuhu 58-60°C. Lalu dilakukan trimming dengan cara cetakan dijepit dalam mikrotom dan jaringan dipotong dengan ketebalan 5µm. Sediaan disimpan dalam inkubator suhu 38-40°C 24 jam dan kemudian dilakukan pewarnaan HE dan Imunohistokimia.

4.4.7 Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin

Pewarnaan HE dilakukan dengan cara meletakkan preparat yang akan diwarnai pada rak khusus dan dicelupkan secara berurutan ke dalam larutan. Larutan tersebut antara lain : xylol (3 menit) sebanyak dua kali, etanol absolut (3 menit) sebanyak dua kali, etanol 90% (3 menit), etanol 80% (3 menit), kemudian dibilas dengan air. Selanjutnya ditetaskan larutan hematoksilin 6-7 menit, bilas dengan air (1 menit). Lalu ditetaskan larutan pembiru (1 menit) dan bilas dengan air (1 menit). Lalu ditetaskan larutan eosin (1-2 menit) dan bilas dengan air keran (1 menit). Kemudian dicelupkan ke dalam etanol 80% sebanyak 10 celupan, dan dilanjutkan ke dalam 90%

sebanyak 10 celupan, dan etanol absolut sebanyak 10 celupan, kemudian direndam dalam etanol absolut selama 1 menit. Selanjutnya direndam dalam xylol sebanyak 3x3 menit. Kemudian preparat diangkat satu persatu dari larutan xylol dalam keadaan basah, diberi satu tetes cairan perekat (DPX) dan selanjutnya ditutup dengan kaca penutup. Hasil pewarnaan dilihat di bawah mikroskop. Bagian yang diamati pada organ ginjal yaitu glomerulus dan *capsula bowman*.

4.4.8 Ekspresi TNF- α dengan Pewarnaan Imunohistokimia

Langkah-langkah uji Imunohistokimia yaitu preparat direndam kedalam xylol I, xylol II, alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%), aquadest selama 1 x 5 menit kemudian preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit selanjutnya ditetesi 3% H₂O₂ selama 20 menit. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit dan diblok dengan BSA 1% dalam PBS selama 30 menit dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer (anti rat TNF- α) selama 24 jam dengan suhu 4°C dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Berikutnya diinkubasi dengan antibody sekunder berlabel biotin (*Goat Anti Rat biotin labeled*) selama 1 jam dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit.

Preparat ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*) selama 40 menit dengan suhu ruang. Kemudian dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. Ditetesi dengan DAB (*Diamano Benzidine*) selama 10 menit dengan suhu ruang. Dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali.

Selanjutnya counterstaining menggunakan *Mayer Hematoxylen* selama 5 menit. Dicuci dengan air mengalir. Dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Tahapan terakhir dimounting dengan entellan dan ditutup dengan *cover glass* (Dabbs, 2014).

4.5 Analisa Data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan analisa kualitatif deskriptif untuk gambaran histopatologi ginjal dan kuantitatif untuk ekspresi TNF- α menggunakan *software immunoratio*. Data rata-rata ekspresi TNF- α yang diperoleh dianalisis dengan ragam ANOVA menggunakan *softwere* SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) 16.0. Apabila antar kelompok perlakuan diperoleh hasil yang berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji BNJ $\alpha = 5\%$ untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan (Kusriningrum, 2008).

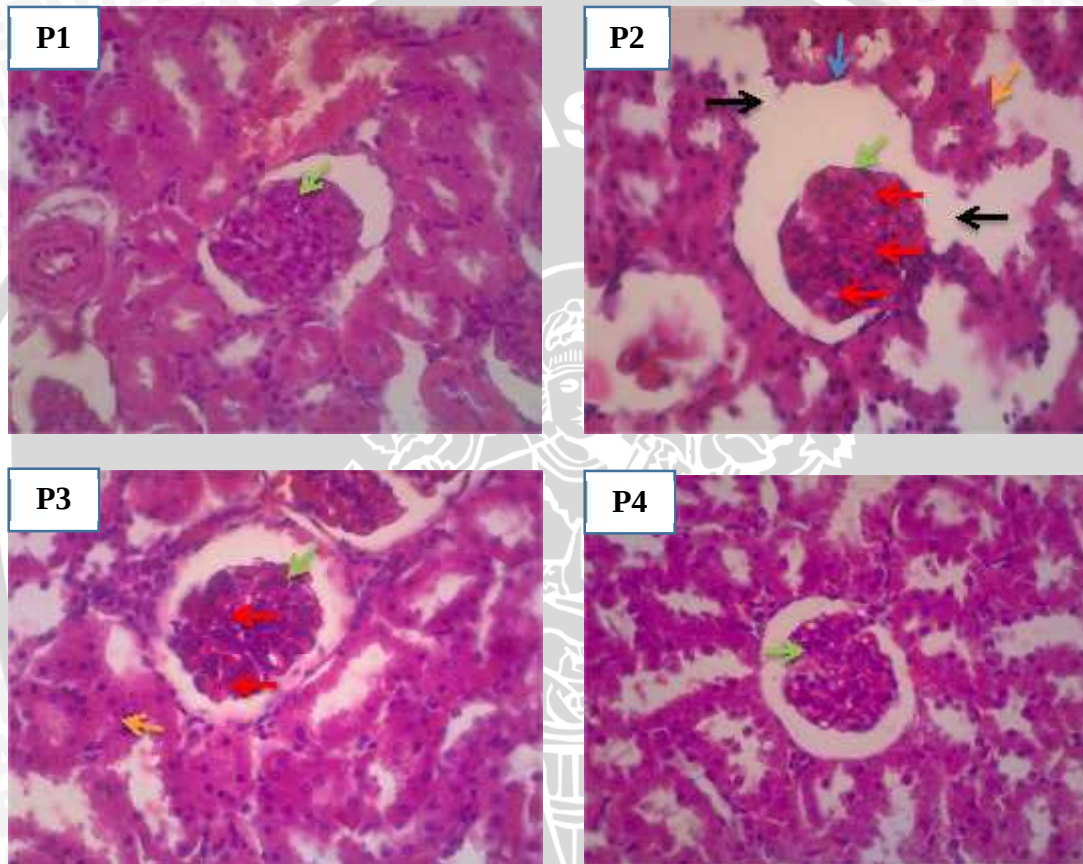
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan histopatologi dan imunohistokimia ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) ginjal sebagai parameter perbaikan ginjal tikus yang diinduksi dengan sipermetrin dan diberi terapi ekstrak etanol daun belimbing wuluh. Identifikasi gambaran histopatologi pewarnaan *hematoxylin-eosin* (HE) merupakan salah satu cara untuk mengetahui bentuk kerusakan pada ginjal tikus yang diinduksi sipermetrin. Pewarnaan HE terdiri dari *hematoxylin* yang bermuatan positif dan berikatan dengan asam nukleat *Deoxyribose Nucleic Acid* (DNA) yang bermuatan negatif sehingga inti sel terwarnai biru. Pewarna *eosin* bermuatan negatif yang berikatan dengan protein sitoplasma dan matriks yang bermuatan positif sehingga sitoplasma dan matriks terwarnai merah (Junquiera and Carneiro, 2005). Pewarnaan imunohistokimia ekspresi TNF- α dilakukan untuk mengkonfirmasi bahwa terjadi penurunan maupun peningkatan TNF- α terhadap variabel bebas yaitu dosis induksi sipermetrin dan dosis terapi ekstrak etanol daun belimbing wuluh.

5.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh terhadap Gambar Histopatologi Ginjal dengan Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Secara histologis, ginjal tikus dibagi menjadi dua wilayah yaitu korteks dan medulla. Ginjal terdiri dari jutaan unit fungsional ginjal yaitu unit nefron. Unit nefron ginjal terdiri dari glomerulus, tubulus proksimal, *loop henle ascendant* dan *descendant*, tubulus distal dan duktus kolektivus. Korteks ginjal didominasi oleh glomerulus, tubulus proksimal dan tubulus distal sedangkan medulla ginjal didominasi oleh *loop henle* dan duktus kolektivus (Mescher, 2013). Gambaran

Histopatologi ginjal yang diinduksi sipermetrin dan telah diterapi dengan ekstrak daun belimbing wuluh, dan diamati dengan menggunakan teknik pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) dapat dilihat pada **Gambar 5.1**.



Gambar 5.1 Gambaran histopatologi ginjal hewan model tikus yang diinduksi sipermetrin dan telah diterapi dengan ekstrak daun belimbing wuluh (perbesaran 400x, pewarnaan HE).

Keterangan : Kelompok P1= tikus kontrol negatif, P2 = tikus kontrol positif, P3 = terapi 500 mg/kg BB, P4= terapi 1000 mg/kg BB. (↑) menunjukkan glomerulus, (↑) menandakan kerusakan *capsula bowman*, (↑) menunjukkan adanya edema ruang *bowman*, (↑) menunjukkan degenerasi hidropis, (↑) menunjukkan hipervaskularisasi.

Penelitian gambaran histopatologi ginjal pada tikus yang terdiri dari 4 kelompok yaitu tikus kelompok negatif (P1), tikus kelompok positif (P2), kelompok terapi 1 dosis 500mg/kg BB tikus (P3) dan kelompok terapi 2 dengan dosis 1000mg/kg BB tikus (P4). Hasil pemeriksaan mikroskopis terhadap gambaran histopatologi ginjal pada kontrol positif (P2) menunjukkan perubahan patologis. Adanya zat yang bersifat toksik pada ginjal ditandai dengan perubahan pada glomerulus dan tubulus-tubulusnya serta edema. Pemberian terapi ekstrak daun belimbing wuluh pada kelompok terapi P3 dan P4 menunjukkan adanya perbaikan pada pemeriksaan mikroskopis gambaran histopatologi ginjal yaitu ditandai dengan terjadinya penurunan edema, kerusakan *capsula bowman*, hipervaskularisasi, dan degenerasi hidropis yang berbeda dari kontrol positif. Dosis terapi yang memberikan perbaikan gambaran histopatologi yang mendekati keadaan normal yaitu pada dosis terapi 1000mg/kg BB.

Kelompok tikus sehat (P1) menunjukkan gambaran normal. Menurut Dellman and Eurel (2006) sel epitel selapis merupakan salah satu penyusun glomerulus dan lapisan parietal *capsula bowman*. Menurut Noer (2010) berdasarkan histologi glomerulus (bersama *capsula bowman*) terletak di korpus Malpighi, glomerulus pada keadaan normal merupakan kapiler-kapiler khusus yang berfungsi sebagai penyaring. Kapiler glomerulus dibatasi oleh sel-sel endotel, mempunyai sitoplasma yang sangat tipis, yang mengandung banyak lubang yang disebut fenestra. Membran basal glomerulus membentuk suatu lapisan yang berkesinambungan, antara sel endotel

dengan mesangial pada suatu sisi dan sel epitel disisi lain. Membran tersebut mempunyai 3 lapisan yaitu lamina densa yang padat (di tengah), lamina rara interna yang terletak diantara lamina densa dan sel endotel, lamina rara eksterna yang terletak diantara lamina densa dan sel epitel. Sel-sel epitel *capsula bowman* visceral menutupi kapiler dan membentuk tonjolan sitoplasma *foot process* yang berhubungan dengan lamina rara eksterna, diantara tonjolan-tonjolan tersebut adalah celah-celah filtrasi yang disebut *silt pore*. Mesangium (sel-sel mesangial dan matrik) terletak diantara kapiler-kapiler glomerulus dan membentuk bagian medial dinding kapiler.

Kelompok tikus sakit (P2) menunjukkan adanya perubahan patologis berupa edema ruang *bowman*, kerusakan *capsula bowman*, degenerasi hidropis dan hipervaskularisasi. Edema yang terjadi ditandai dengan perluasan ruang *bowman* akibat adanya gangguan sirkulasi darah ginjal yang diduga merupakan efek pemberian formulasi insektisida sipermetrin. Menurut Juhriyyah (2008), edema terjadi akibat adanya gangguan keseimbangan normal antara kompartemen cairan darah, interstisium dan limfatik. Terdapat empat mekanisme dasar yang mengawali terjadinya gangguan keseimbangan ini sehingga menyebabkan edema yaitu: peningkatan tekanan hidrostatik, turunnya tekanan osmotik plasma, obstruksi limfatik dan retensi natrium. Selain edema, perubahan histopatologi juga ditemukan pada epitel tubuli ginjal yaitu terjadinya degenerasi sel. Pada degenerasi hidropis, sejumlah air berakumulasi di dalam sel dan membentuk vakuola di mitokondria, retikulum endoplasmik, dan substansi dasar. Degenerasi hidropis adalah terjadinya peningkatan

jumlah air di dalam sel yang menyebabkan sitoplasma dan organel sel tampak membengkak dan bervakuola yang terutama terlihat pada banyak kasus atau anoksia akut, zat toksik yang menghambat enzim, deplesi substrat atau hambatan pada fosforilasi oksidatif. Semua kondisi tersebut dapat menyebabkan defisiensi ATP sehingga terjadi kegagalan kerja pompa natrium. Peningkatan konsentrasi natrium di dalam sel menyebabkan masuknya air ke dalam sel melalui proses osmosis alami. Bila air tertimbun di dalam sitoplasma, organel sitoplasma menyerap air, menyebabkan pembengkakan mitokondria, pembesaran retikulum endoplasma dan sebagainya. Perubahan degenerasi hidropis pada ginjal diikuti oleh kematian sel (nekrosis) epitel tubuli ginjal. Kematian sel dapat disebabkan oleh berbagai faktor, salah satunya adalah hipoksia akibat terganggunya sistem sirkulasi oleh zat toksik yang masuk. Bagian korteks ginjal merupakan bagian yang sangat sensitif terhadap terjadinya hipoksia, khususnya pada tubulus proksimal. Cedera hipoksia bergantung pada kecepatan transport ion di dalam tubulus proksimal dan lengkung henle. Hipoksia dipengaruhi oleh permintaan energi dan penggunaan oksigen. Kerusakan ginjal membuat nefron mengkompensasi dengan cara bekerja secara berlebihan (hiperaktif). Aktivitas nefron yang berlebihan mengakibatkan hiperfiltrasi, peningkatan tekanan kapiler, dan hipervaskularisasi pada glomerulus. Menurut Harrison (2010), cedera glomerulus yang terus menerus menyebabkan hipertensi lokal di berkas kapiler, meningkatkan laju filtrasi glomerulus (LFG) masing-masing nefron, dan menyebabkan kebocoran protein ke dalam cairan tubulus.

Perbaikan gambaran ginjal terjadi pada kedua kelompok tikus P3 dan P4 setelah diberikan terapi ekstrak daun belimbing wuluh selama 14 hari. Kelompok tikus P3 (terapi ekstrak daun belimbing wuluh 500 mg/kg BB) menunjukkan perbaikan gambaran edema ruang *bowman* dan kerusakan *capsula bowman* berkurang. Kelompok tikus P4 (terapi ekstrak daun belimbing wuluh 1000 mg/kg BB) menunjukkan perbaikan gambaran histopatologi yang terbaik berupa perbaikan gambaran edema ruang *bowman*, degenerasi hidropis dan kerusakan *capsula bowman* sehingga mendekati kelompok tikus P1 (kontrol). Hal tersebut menunjukkan bahwa peningkatan dosis terapi ekstrak daun belimbing wuluh menunjukkan adanya perbaikan gambaran histopatologi ginjal yang signifikan. Daun belimbing wuluh merupakan tumbuhan yang didalamnya memiliki kandungan katekin (**Lampiran 9**). Katekin bertindak sebagai antioksidan yang menstabilkan ROS dengan menghambat peroksidasi lipid yang disebabkan oleh induksi sipermetrin. Katekin memiliki gugus hidroksil yang akan menjadi donor elektron sehingga dapat berikatan dengan ROS. Atom hidrogen pada katekin yang berikatan dengan ROS dapat mencegah ROS berikatan dengan asam lemak tak jenuh (PUFA) pada membran sel. Dengan demikian tidak ada elektrolit yang tidak berpasangan sehingga proses penyembuhan pada ginjal berjalan dengan baik.

5.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh terhadap Ekspresi TNF- α dengan Uji Imunohistokimia

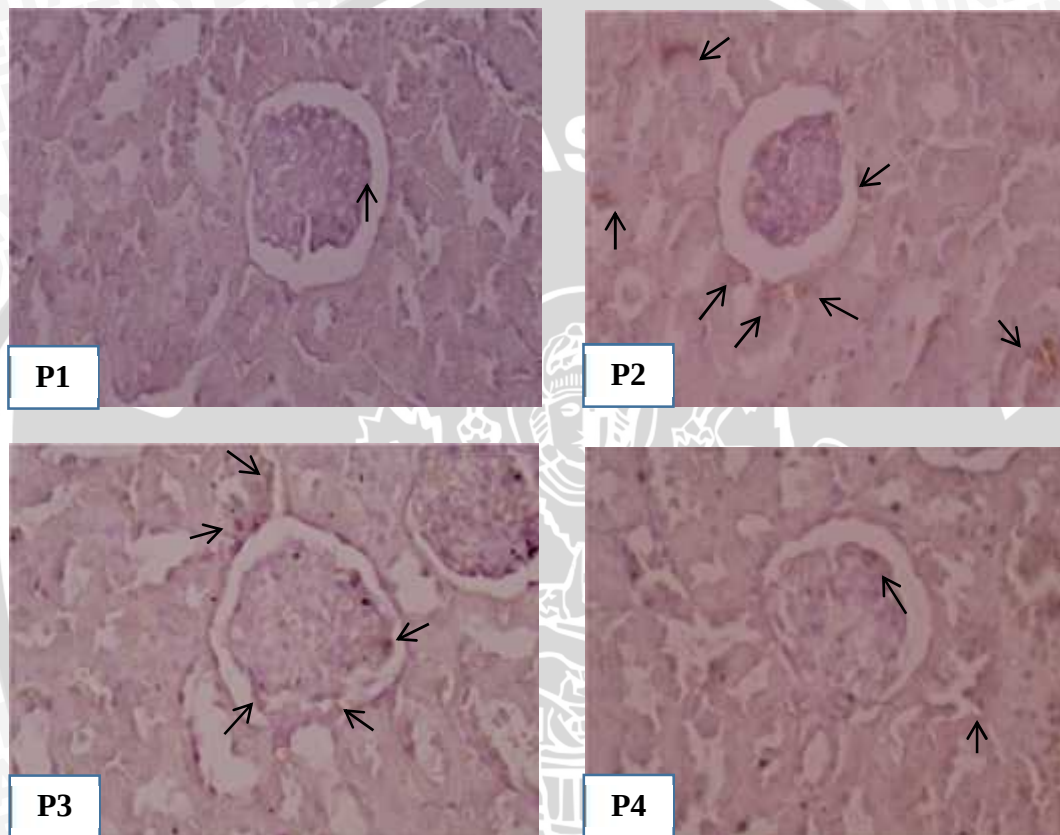
Nilai persentase dalam setiap kelompok diperoleh dari lima foto dalam satu perlakuan. Pengamatan ekspresi TNF- α pada masing-masing ulangan dilakukan

dengan penilaian pada lima bidang pandang antar kelompok perlakuan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Wulandari dkk (2014) bahwa nilai persen area dapat diperoleh dari hasil foto sesuai bidang pandangnya yang ditentukan dari banyaknya ulangan dalam satu perlakuan. Hasil yang diperoleh kemudian dikonversikan ke dalam persentase yang dapat menandai suatu kenaikan maupun penurunan sel dalam suatu penyakit dan dilakukan perhitungan secara persentase.

TNF- α merupakan sitokin proinflamasi yang diproduksi oleh makrofag, terdapat pada hampir semua jaringan, karena reseptor TNF- α (TNFR1 dan TNFR2) ada di seluruh jaringan dalam tubuh. TNF- α merupakan protein transmembran yang berikatan dengan reseptor pada permukaan sel. TNF- α berperan sebagai mediator utama penyakit ginjal, dan diekspresikan pada hampir semua jenis sel pada jaringan ginjal seperti sel mesangial, sel epitel tubulus dan sel glomerular (Nisa, dkk., 2014).

Ekspresi TNF- α dengan teknik imunohistokimia ditunjukkan dari timbulnya warna coklat disebabkan antigen pada jaringan ginjal berikatan dengan antibodi primer (Rat Anti TNF), selanjutnya dilabeli dengan antibody sekunder (Anti Rat *biotin labeled*), setelah semua berikatan dilakukan penambahan substrat kromagen *Diaminobenzidine* (DAB) yang kemudian berikatan dengan *hidrogen peroksida* (H_2O_2) sehingga menghasilkan endapan coklat dan H_2O . Endapan coklat merupakan hasil penguraian substrat (kromagen DAB dan H_2O_2) oleh enzim peroksidase dalam *Strep-Avidin Horse Radis Peroxidase* (SA-HRP). Warna coklat menandakan bahwa pada jaringan tersebut positif terdapat antigen berupa sitokin TNF- α (Nisa, dkk.,

2014). Ekspresi TNF- α pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) induksi sipermetrin pada penelitian ini ditunjukkan pada **Gambar 5.2**.



Gambar 5.2 Ekspresi TNF- α pada ginjal hewan model tikus induksi sipermetrin dan diterapi dengan ekstrak daun belimbing wuluh (perbesaran 400x)

Keterangan: gambar panah (↑) menunjukkan ekspresi TNF- α . P1= tikus kontrol negatif, P2= tikus kontrol positif, P3= tikus terapi 500 mg/kg BB, P4= tikus terapi 1000 mg/kg BB.

Ekspresi TNF- α diamati pada ginjal dan ditunjukkan dengan tanda panah berwarna hitam (↑). Kelompok tikus kontrol negatif (P1) menunjukkan ekspresi TNF- α yang sedikit. Kelompok tikus kontrol positif (P2) menunjukkan ekspresi TNF-

α yang paling banyak diantara kelompok perlakuan. Kelompok tikus induksi sipermetrin yang diterapi ekstrak daun belimbing wuluh dosis 500 mg/Kg BB (P3) menunjukkan ekspresi TNF- α yang lebih sedikit daripada kelompok tikus kontrol positif. Kelompok tikus induksi sipermetrin yang diterapi ekstrak daun belimbing wuluh dosis 1000 mg/Kg BB (P4) menunjukkan ekspresi TNF- α yang lebih sedikit daripada kelompok tikus induksi sipermetrin yang diterapi ekstrak daun belimbing wuluh dosis 500 mg/Kg BB (P3). Hal ini didukung dengan analisis menggunakan program *Immunoratio* yang ditunjukkan pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Rata-rata ekspresi TNF- α pada ginjal tikus kontrol negatif, tikus yang diinduksi sipermetrin dan tikus yang diterapi menggunakan ekstrak daun belimbing wuluh.

Perlakuan	Rata-rata	Ekspresi TNF- α (%)	
	Ekspresi TNF- α	Peningkatan	Penurunan
(P1) Kontrol Negatif	0,78 $\pm$ 0,17 ^a		
(P2) Kontrol Positif	5,94 $\pm$ 1,23 ^c	661,53	-
(P3) Terapi 1 (500 mg/kg)	3,88 $\pm$ 0,44 ^b	-	34,68
(P4) Terapi 2 (1000 mg/kg)	1,64 $\pm$ 0,39 ^a	-	72,39

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p < 0.05$) antara kelompok perlakuan. Notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan nyata antar perlakuan.

Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar perlakuan, yang ditunjukkan dengan notasi yang berbeda. Kelompok

tikus terapi ekstrak daun belimbing wuluh 1000 mg/Kg BB tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kelompok tikus control negatif (tanpa perlakuan), hal tersebut menunjukkan bahwa dosis terapi ekstrak daun belimbing wuluh 1000 mg/Kg BB adalah dosis yang efektif untuk terapi intoksikasi sipermetrin. Perbaikan tersebut disebabkan oleh kandungan polifenol yaitu katekin di dalam daun belimbing wuluh. Polifenol tersebut akan mendonorkan atom hidrogennya kepada radikal bebas agar menjadi stabil.

Kelompok tikus kontrol negatif (P1) tanpa perlakuan terdapat sedikit warna coklat pada organ ginjal dikarenakan dalam keadaan normal sitokin pasti terdapat di dalam tubuh walaupun dalam jumlah sedikit sebagai sistem kekebalan tubuh. Menurut Wulandari (2014) TNF- α merupakan suatu protein yang dihasilkan oleh leukosit untuk merangsang dan mengaktifkan sistem imun terhadap respon inflamasi, dimana dalam keadaan normal membantu melawan patogen pada sistem kekebalan tubuh untuk memicu reaktivitas imun pada imunitas nonspesifik maupun spesifik.

Ekspresi TNF- α kelompok tikus yang diinduksi sipermetrin (P2) mengalami peningkatan terhadap kontrol negatif seperti tampak pada Tabel 5.1 yaitu sebesar 661,53 % dan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap kelompok tikus kontrol negatif. Ekspresi TNF- α yang tinggi pada kelompok terpapar sipermetrin menunjukkan bahwa paparan sipermetrin menimbulkan peradangan akibat stres oksidatif. Stres oksidatif adalah keadaan yang menunjukkan jumlah radikal bebas di dalam tubuh melebihi kapasitas tubuh untuk menetralkannya.

Peningkatan TNF- α pada kelompok terpapar disebabkan akibat paparan sipermetrin yang menghasilkan radikal bebas yang diamati dengan adanya stres oksidatif pada membran sel, sehingga menimbulkan gangguan keseimbangan oksidan dan antioksidan (stres oksidatif). Stres oksidatif menyebabkan kerusakan membran lipid bilayer, protein dan makromolekul lainnya. Radikal bebas yang meningkat pada paparan sipermetrin mengikat lipid, protein dan DNA pada sel, sehingga menghasilkan ikatan dengan radikal bebas dan menyebabkan gangguan fungsi (Karnen dan Iris, 2009).

Kelompok tikus yang mendapatkan terapi ekstrak daun belimbing wuluh dosis 500 mg/Kg BB dan 1000 mg/Kg BB secara signifikan ($P < 0,05$) menunjukkan penurunan ekspresi TNF- α secara berturut - turut sebesar 34,68 % dan 72,39 % dibandingkan dengan kontrol positif. Ekspresi TNF- α pada kelompok tikus terapi 1000 mg/Kg BB menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($P < 0,05$) terhadap kelompok tikus kontrol negatif, hal ini menunjukkan bahwa dosis terapi 1000 mg/Kg BB adalah dosis efektif untuk terapi intoksikasi sipermetrin. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun belimbing wuluh sebagai antioksidan eksogen dapat menurunkan ekspresi TNF- α (mendekati kelompok tikus kontrol) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model intoksikasi sipermetrin.

Sipermetrin akan masuk ke dalam tubuh melalui sistem pencernaan. Radikal bebas kemudian berdifusi ke dalam pembuluh darah perifer melalui arteri mesenterica. Radikal bebas yang telah berdifusi kemudian berikatan dengan

hemoglobin (Hb) dan siap didistribusikan ke seluruh tubuh, salah satunya organ ginjal melalui arteri renalis. Arteri renalis berperan sebagai penyuplai nutrisi bagi organ ginjal. Namun, pada keadaan stres oksidatif, radikal bebas akan masuk bersama komponen darah ke organ ginjal dan berakumulasi di dalam ginjal.

Akumulasi radikal bebas yang berlebihan menyebabkan ketidakseimbangan jumlah radikal bebas dengan antioksidan (stress oksidatif). Stres oksidatif menyebabkan sel - sel menjadi tidak stabil. Sel - sel tidak stabil disebabkan ikatan antara radikal bebas dengan bagian - bagian sel yang memiliki ikatan lemah. Lemak memiliki ikatan yang lemah sehingga mudah berikatan dengan molekul - molekul yang lebih reaktif seperti radikal bebas. Ikatan antara radikal bebas dengan lipid (lemak) pada membran sel menyebabkan peroksidasi lemak. Peroksidasi lemak adalah kerusakan oksidatif pada lipid yang mengandung ikatan karbon rangkap, sehingga sel ginjal menjadi rusak. Rusaknya membran sel menyebabkan sel mengalami dehidrasi hingga ruptur (Khansari, 2008). Sel yang rusak akan melepaskan faktor kemotaktik sitokin (kemokin) sehingga sel fagosit bisa melakukan fagositosis. Makrofag yang melakukan proses fagositosis akan melepaskan $\text{TNF-}\alpha$ (Baratawidjaja, 2009).

Tumor nekrosis faktor alfa ($\text{TNF-}\alpha$) sebagai salah satu sitokin proinflamasi berfungsi untuk merangsang makrofag mensekresi kemokin agar sel imun non spesifik (makrofag) migrasi ke dalam jaringan untuk menyingkirkan pathogen. Panas yang terjadi saat inflamasi juga disebabkan oleh $\text{TNF-}\alpha$ karena mampu merangsang

hipotalamus untuk melepaskan pirogen. Jika kerusakan sel parah, maka $\text{TNF-}\alpha$ menginduksi nekrosis. Nekrosis sel disebabkan radikal bebas akibat dari paparan sipermetrin merusak membran sel (lipid). Membran sel yang rusak menyebabkan sitosol bekerja berlebihan. Sitosol yang bekerja berlebihan tersebut akan merangsang lisisnya bagian - bagian sel. Cidera atau kerusakan sel akibat lisis menyebabkan terjadinya nekrosis. Ciri - ciri terjadinya nekrosis antara lain : piknosis, karioreksis dan kariolisis. Piknosis yaitu pengeluaran inti yang terjadi akibat homogenisasi sitoplasma dan peningkatan eosinophil kemudian DNA berkondensasi menjadi masa padat. Karioreksis adalah keadaan inti sel yang terfragmentasi serta kariolisis yaitu pemunduran kromatin basophil akibat DNA (Palyoga, 2014).

Terapi ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L*) mampu menurunkan ekspresi $\text{TNF-}\alpha$ pada kasus intoksikasi sipermetrin. Aktivitas antioksidan katekin dalam *Averrhoa bilimbi L* berfungsi sebagai *scavenger* radikal bebas sehingga mampu menurunkan kadar radikal bebas. Sesuai hasil tes *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LCMS) ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L*) diketahui hasil yang positif untuk polifenol berupa katekin.

Polifenol merupakan antioksidan yang dapat bereaksi sebagai pereduksi dan penangkap radikal bebas (Botutihe, 2010). Polifenol juga berfungsi melindungi senyawa - senyawa yang mudah teroksidasi, antara lain lipid bilayer, DNA, RNA dan protein sehingga kerusakan sel dan jaringan akibat radikal bebas bisa diturunkan dan perbaikan sel (regenerasi) akan berjalan lebih baik (Palyoga dkk., 2014). Selain

berfungsi sebagai antioksidan untuk mencegah penyakit degeneratif dan kronis, polifenol juga memiliki kapasitas melindungi sel ginjal. Polifenol dapat menghambat peroksidasi lemak, agregasi platelet, permeabilitas kapiler dan mempengaruhi sistem enzim termasuk fosfolipase, kolagenase, elastase, siklooksigenase dan lipooksigenase. Polifenol berikatan dengan radikal bebas dan membantu dalam perbaikan sel dengan cara mendonorkan atom hidrogennya agar radikal bebas menjadi stabil (Wulandari dkk., 2014).



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaksanakan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi sipermetrin mampu memperbaiki gambaran histopatologi ginjal yang ditandai dengan berkurangnya edema, hipervaskularisasi, degenerasi hidropis dan perbaikan kerusakan ruang *capsula bowman* dengan dosis terapi terbaik yaitu 1000 mg/kg BB.
2. Pemberian ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi sipermetrin dapat menurunkan ekspresi TNF- α berturut-turut dosis 500 mg/kg BB sebesar 34,68 % dan dosis 1000 mg/kg BB sebesar 72,39 % dengan dosis terapi terbaik yaitu 1000 mg/kg BB.

6.2 Saran

1. Sebaiknya dilakukan uji lanjutan (ureum & kreatinin) tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi sipermetrin dan diterapi ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) pada penelitian selanjutnya sebagai data pendukung penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, S. dan H. Iwan. 2007. *Gagal Ginjal*. Gramedia. Jakarta.
- Al-Ghanim, K.A. 2012. Effect of Cypermethrin Toxicity on Enzyme Activities in the Freshwater Fish *Cyprinus carpio*. *African Journal of Biotechnology* : College of Sciences and Humanity Studies. Alkharj 11942. Salman bin Abdul-Aziz University. Saudi Arabia. Vol. 13(10):1170-1171.
- Alwan, A.K. 2015. Toxic Effects of Cypermethrin on Liver and Kidney of Male Domestic Rabbits [Thesis]. Submitted in Partial Fulfillment for the Degree of Master of Science in Biological Sciences / Zoology.
- Arief, S. 2007. Bagian SMF Ilmu Kesehatan Anak. Fakultas Kedokteran Unair/RSU Dr. Soetomo. Surabaya.
- Atessahin A., S, Yilmaz., I, Karahan., I, Pirincci., and B, Tasdemir. 2005. The Effect of Vitamin E and Selenium on Cypermethrin Induced Oxidative Stress in Rats. *Journal Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29, 385.
- Baratawidjaja, K.G. 2004. *Imunologi Dasar : Sitokin*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Botutihe, D. N. 2001. *Thesis : Efek Ekstrak Rumput Laut Coklat (Sargassum duplicatum Bory) terhadap Profil Radikal Bebas dan Protein Kinase C paru Tikus (Rattus norvegicus) yang dipapar Benzo [A] piren*. Universitas Brawijaya.
- Bradberry S.M., S.A, Cage., A.T, Proudfoot., and J.A, Vale. 2005. *Poisoning due to pyrethroids*. *Toxicology*. 24(2):93-106.
- Dalimartha, S. 2008. *36 Resep Tumbuhan Obat Untuk Menurunkan Kolesterol*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- David, JP., M.I, Hanafy., C.P, Alexia., and J.I.P, Mark. 2013. Role of Cytochrome P450s in Insecticide Resistance: Impact on The Control of Mosquito Borne Diseases and Use of Insecticides on Earth. Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS-Universite' de Grenoble. France.
- Dellmann, H. D and J. A. Eurell. 2006. *Textbook of Veterinary Histology*. 6th edition. USA: Blackwell Publishing
- Djojosumarto. 2008. *Teknik Aplikasi Pestisida Pertanian*. Kanisius. Yogyakarta.

- Faharani, G. B. 2009. Uji Aktifitas Antibakteri Daun Belimbing Wuluh terhadap Bakteri *Streptococcus Aureus* dan *Acheria Coli* secara Bioautografi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia.
- Heronyati. 2012. Sintesis Senyawa Dimer Katekin dari Ekstrak Teh Hijau dengan Menggunakan Katalis Enzim 55 *Adase* dari Kulit Bawang Bombay (*Allium cepa* L.). Program Pascasarja. Jaster Ilmu Kimia. Universitas Indonesia.
- Harrison. 2010. *Nefrologi dan Gangguan Asam – Basa*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 12-13
- Hayati, E. K., A, Jannah., dan A.G, Fasya. 2009. Aktivitas Antibakteri Komponen Tanin Ekstrak Daun Blimbing Wuluh (*Averrhoa Billimbi* L) Sebagai Pengawet Alami. Penelitian Kompetitif Depag. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Juhriyyah, S. 2008. Gambaran Histopatologi Organ Hati dan Ginjal Tikus pada Intoksikasi Akut Insektisida (Metofluthrin, D-Phenothrin, D-Allethrin) dengan Dosis Bertingkat. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Junqueira, L.C. and J. Carneiro. 2005. *Basic Histology Text and Atlas, 11 Ed.* USA: McGraw – Hill's.
- Karnen, G dan R. Iris. 2009. *Imunologi Dasar Edisi ke – 8*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Khansari, N.S, Yadollah., dan M, Mahdi. 2008. *Chronic Inflammation and Oxidative Stress as Major Cause of Age-Related Disease and Cancer. Department of Immunology*. Tehran University Science : Iran.
- Kuncahyo, I. dan Sunardi. 2007. Uji Aktivitas Antioksidan Akstrak Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap 1,1-Diphenyl-2-Picrylhidrazyl (DPPH). Prosiding Teknologi 2007, ISSN : 1978-9777.
- Kusriningrum R. 2008. *Perancangan Percobaan*. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal. 43-51.
- Lidyawati, S dan K. Ruslan. 2006. Karakterisasi Simplisia dan Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi*, L). Farmasi Institut Teknologi Bandung.
- Listyawati, D. I. 2014. Efek Terapi Perasan Buah Labu Siam (*Sechium edule*) terhadap Aktivitas Protease dan Ekspresi TNF- α pada Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) Inflammatory Bowel Disease (IBD) Hasil Induksi Indometasin. Universitas Brawijaya

- Malangngi, L., M, Sangi., J, Paendong. 2012. *Penentuan Kandungan Tannin dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Buah Alpukat (Persea americana)*. Jurusan Kimia Fakultas MIPA. Universitas Sam Ratulangi.
- Mescher, A. 2013. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Thirteenth Edition*. McGraw Hill Professional. New York.
- Nisa, F. K. U., Aulanni'am, dan A.W, Wardhana. 2014. Pengaruh Pemberian Air Rebusan Kacang Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) terhadap Ekspresi TNF- α Ginjal dan Profil Protein Hati Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Fibrosis Ginjal Hasil Induksi Streptokinase. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.
- Nurliana, D.R. 2006. *Perbandingan Kadar Tanin pada Daun Tua Dan Daun Muda belimbing wuluh (Averrhoa bilimbi L.) Dengan Metode Spektrofotometri Visibel*. <http://etd.library.ums.ac.id/go.php?id=jtptumsgdl-s1-2007-dwiriskanu-4738&node=1125&start=96>. [Diakses 13 November 2015]
- Palyoga, H., Aulanni'am, D.K, Wuragil. 2014. *Skripsi :Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Anggur (Vitis Vinifera) terhadap Ekspresi Tumor Nekrosis Faktor Alfa (Tnf-A) dan Gambaran Histopatologi Jantung pada Hewan Model Tikus Putih (Rattus Norvegicus)Yang Diberi Paparan Asap Rokok*. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya Malang.
- Parikesit, M. 2011. *Khasiat dan manfaat belimbing wuluh*. Stomata. Surabaya. Hal. 3-6, 95.
- Powers, S.K. and M.J. Jackson. 2008. Exercise-Induced Oxidative Stress : Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Rev*. 88, 1243-76.
- Sa'adah, L. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Tanindari Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L). Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Sadikin. 2003. *Antioksidan, Radikal Bebas, dan Penuaan*. Web: www.chem-is.try.com. [Diakses 12 Desember 2016]
- Sari, L. 2012. Degradasi Senyawa Sipermetrin dalam Insektisida Ripcord 5 EC Secara Fotolisis dengan Penambahan TIO₂ / Zeolit. *Jurnal Kimia Unand, Volume 1 Nomor 1*
- Savitri, N. P. I. 2014. Efektifitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh terhadap Bakteri Mix Saluran Akar Gigi. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Mahasaraswati. Denpasar.

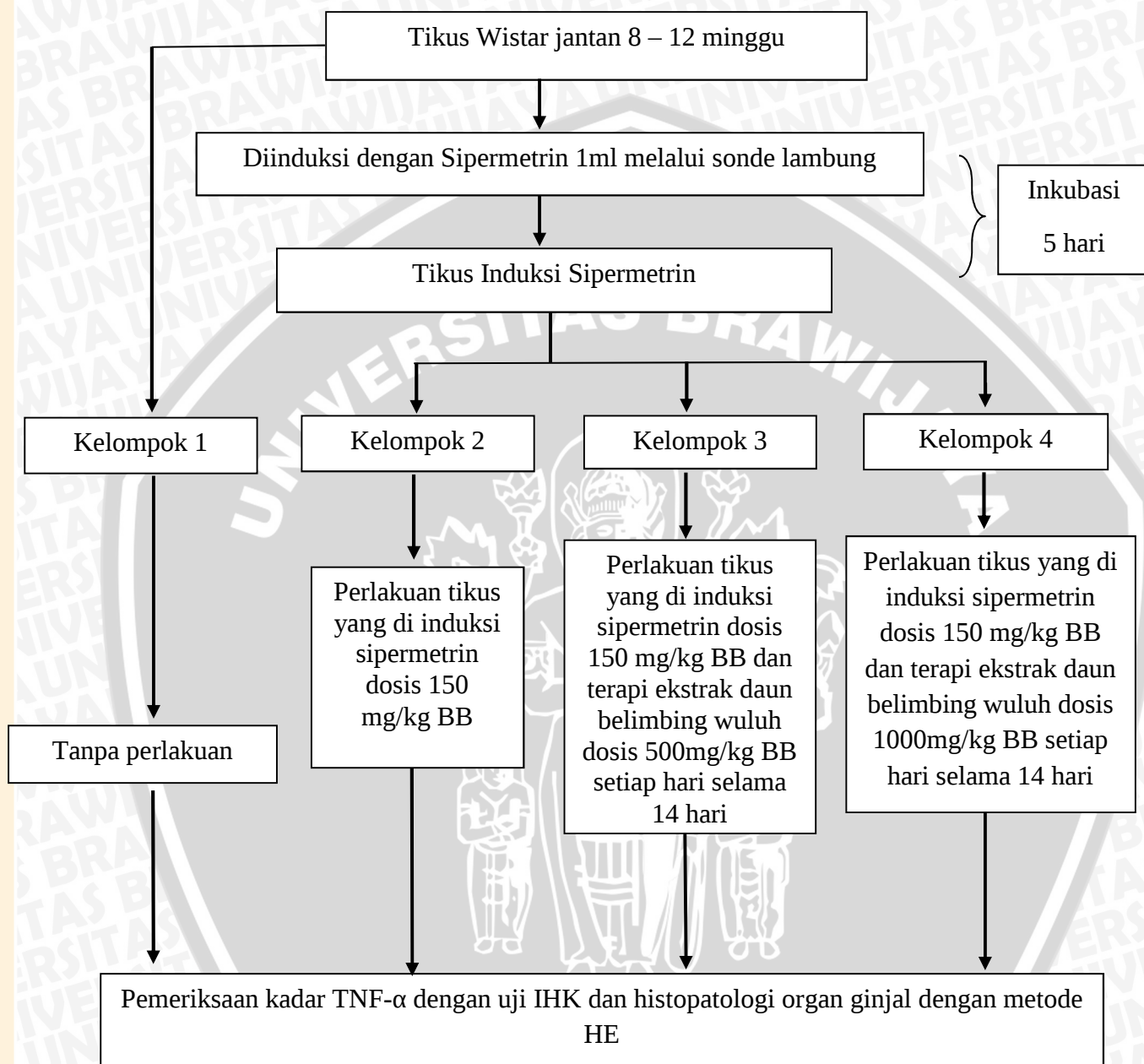
- Sharp, P.E., and M.C. La Regina. 2004. In: *The laboratory Rat*, p. 14. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine : Principles and Procedures*. Elsevier. United States of America.
- Sloane, E. 2003. *Anatomi dan Fisiologi untuk Pemula*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 318-320.
- Suhardjono. 2010. Efek Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn.) terhadap Kadar ALT Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Diinduksi Parasetamol. Universitas Diponegoro.
- Suhartono, E. Fujiati, and I. Aflanie. 2002. Oxygen Toxicity by Radiation and Effect of Glutamic Piruvat Transamine (GPT) Activity Ratt Plasma After Vitamine C Treatment. *Environmental Chemistry and Toxicology*. Universitas Gajah Mada.
- Tuminah, S. 2000. Radikal Bebas dan Antioksidan Kaitannya dengan Nutrisi dan Penyakit Kronis. Pusat Penelitian Penyakit Tidak Menular. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Depkes RI. Jakarta.
- Ummah M. K., 2010. Ekstraksi dan Pengujian Aktivitas Antibakteri Senyawa Tanin pada Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) (Kajian Variasi Pelarut). Fakultas Kimia. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Wakeling, E.N., April P.N., and William D.A. 2012. Pyrethroids and Their Effects on Ion Channels. *Licensee Intech Open Science Chapter 3*.
- Wilke, W.L., A.dee Fails, and R. D. Frandson. 2009. *Anatomy and Physiology of Farm Animals*. Wiley-Blackwell. USA. 383-385.
- Wudianto. 2008. *Petunjuk Penggunaan Pestisida*. Swadaya. Jakarta.
- Wulandari, S. H., Aulnni'am, Oktavanie, D. A., 2014. Ekspresi Tumor Necrosis Factor (Tnf- α) dan Gambaran Histopatologi Ginjal pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Renal Fibrosis Pasca Induksi Streptokinase. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LAMPIRAN



Lampiran 1. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian



Lampiran 2. Perhitungan Volume dan Pengenceran Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

200g bahan kering = 20 ml ekstrak = 5 g ekstrak

1 ml ekstrak = 0,25 g ekstrak

Konsentrasi ekstrak = 250 mg/ml

Dosis I (500 mg/kg BB)

Berat badan tikus rata-rata 200 gram

$$\frac{200}{1000} \times 500 \text{ mg/kg BB} = 100 \text{ mg}$$

) Volume Pemberian Perekor :

$$V = \frac{D \times BB}{[K]}$$

$$V = \frac{500 \text{ mg/kg BB} \times 0,2 \text{ kg}}{250 \text{ mg/ml}}$$

$$V = 0,4 \text{ ml} \longrightarrow 0,4 \text{ ml ekstrak} + 0,6 \text{ aquades} = 1\text{ml}$$

Dosis II (1000 mg/kg BB)

Berat badan tikus rata-rata 200 gram

$$\frac{200}{1000} \times 1000 \text{ mg/kg BB} = 200 \text{ mg}$$

) Volume Pemberian Perekor :

$$V = \frac{D \times BB}{[K]}$$

$$V = \frac{1000 \text{ mg/kg BB} \times 0,2 \text{ kg}}{250 \text{ mg/ml}}$$

$$V = 0,8 \text{ ml} \longrightarrow 0,8 \text{ ml ekstrak} + 0,2 \text{ aquades} = 1\text{ml}$$

Lampiran 3. Perhitungan Volume Pemberian Sipermetrin

Sediaan sipermetrin 30 g/L = 30000 mg/1000 ml

Konsentrasi sipermetrin = 30 mg/1ml

Dosis per ekor

150 mg/kg BB

Berat badan tikus rata-rata 200 gram

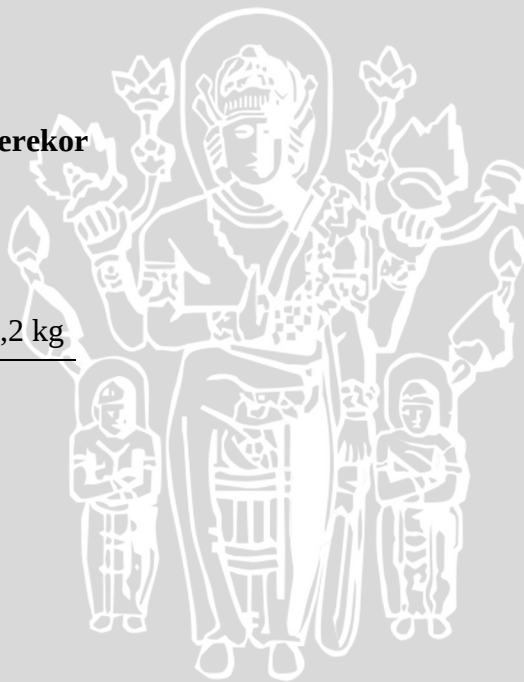
$$\frac{200}{1000} \times 150 \text{ mg/kg BB} = 30 \text{ mg/ekor}$$

Volume Pemberian Perekor

$$V = \frac{D \times BB}{[K]}$$

$$V = \frac{150 \text{ mg/kg BB} \times 0,2 \text{ kg}}{30 \text{ mg/ml}}$$

$$V = 1 \text{ ml}$$



Lampiran 4. Pembuatan Preparat Gambaran Histopatologi Jaringan

3.1. Embedding Jaringan

Jaringan dalam PFA 10%

- diambil dan direndam dalam etanol 70% selama 24 jam
- dimasukkan dalam etanol 80% selama 2 jam
- dimasukkan dalam etanol 90% selama 20 menit
- dimasukkan dalam etanol 95% selama 20 menit
- dipindahkan dalam etanol absolut selama 20 menit dan diulang sebanyak 3 kali

Jaringan hasil dehidrasi dengan etanol

- dimasukkan dalam larutan xilol selama 20 menit, sebanyak 2 kali pada suhu ruang
- dimasukkan dalam larutan xilol selama 30 menit pada suhu 60-63 °C
- dicelupkan dalam paraffin cair
- embedding blok paraffin
- didinginkan pada suhu 4 °C

Jaringan dalam blok parafin

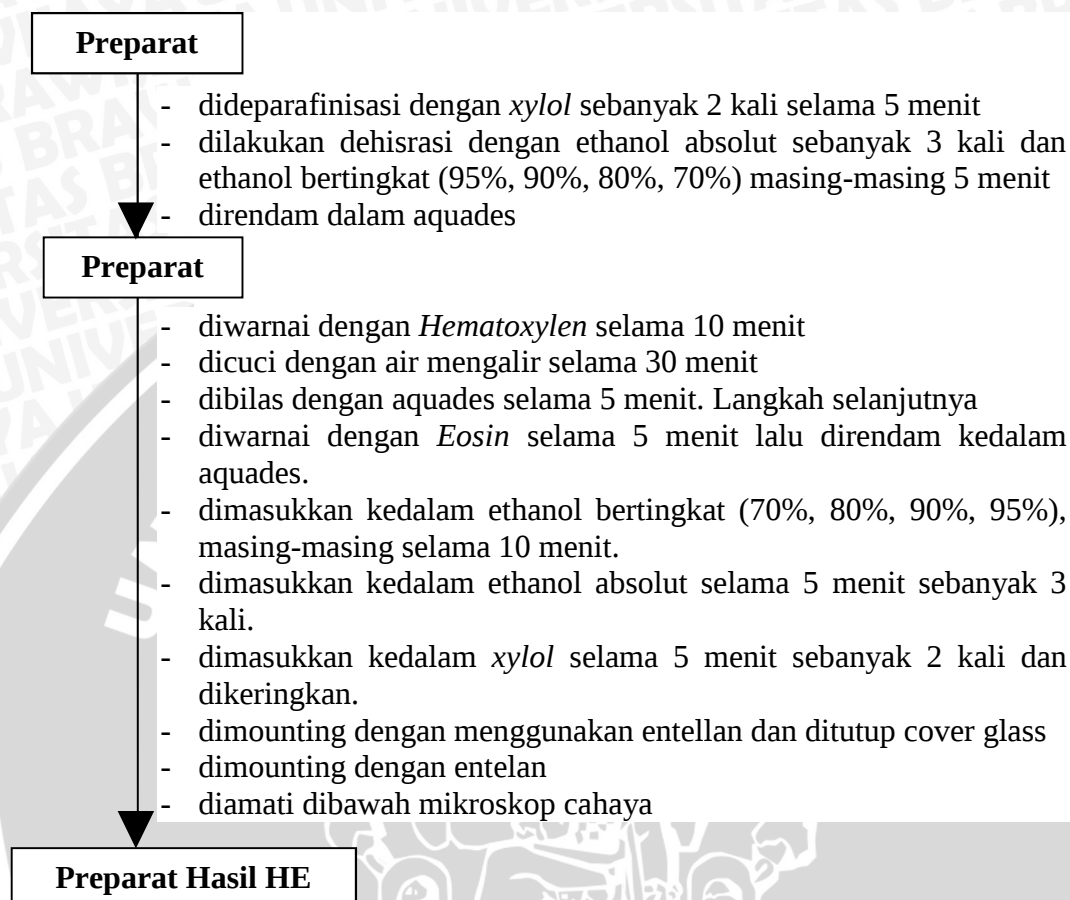
3.2. Pembuatan Slide Preparat

Jaringan dalam blok parafin

- diiris seukuran 5 µm
- didinginkan pada suhu ruang
- dimasukkan dalam air hangat dengan suhu 38-40°C
- diambil dengan objek glass
- dikeringkan di atas *hot plate* dengan suhu 38-40°C
- diinkubasi pada suhu 38-40 °C selama 24 jam
- disimpan pada suhu ruang

Preparat

3.3. Pewarnaan Hematoxylen-Eosin



Lampiran 5. Ekspresi TNF- α

4.1 Pembuatan Preparat

Ginjal dalam blok Parafin

- diiris seukuran 4 μ m pada bagian median
- didinginkan diatas air dingin
- dimasukkan dalam air hangat pada suhu 37°C
- diambil dan tempatkan pada gelas objek
- preparat Ginjal disimpan dalam inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam

Preparat siap pewarnaan

4.2 Pewarnaan Preparat dengan Teknik Imunohistokimia TNF- α

Preparat Ginjal

- Dicuci dengan Xylol I, Xylol II, Alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%) Aquades selama 5 menit.
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 5 menit, diulang 3 kali
- Ditetesi Hidrogen Peroksida 3% dalam dionize water, diamkan 20 menit
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 5 menit, diulang 3 kali
- Diberi FBS (Fetal Bovine Serum) 5% dalam PBS, 30 menit
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 5 menit, diulang 3 kali
- Direaksikan dengan antibodi primer (Anti rat TNF- α), didiamkan semalam pada suhu 4°C (diencerkan dalam 1% BSA dalam PBS)
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 5 menit, diulang 3 kali
- Direaksikan dengan anibbodi sekunder berlabel biotin (Goat anti rat biotin labeled) didiamkan 1 jam pada suhu 26°C
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 5 menit, diulang 3 kali
- Ditetesi SA-HRP (Strepta avidin-Horseredish Peroksidase) 30-60 menit pada suhu 26°C
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 5 menit, diulang 3 kali
- Counter stain (Hematoxylen-Eosin) 5 menit suhu 26°C
- Dicuci PBS pH 7,4 selama 5 menit, diulang 3 kali
- Mounting dengan Entellan

Pengamatan di bawah mikroskop

Lampiran 6. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh

5.1 Proses Ekstraksi

Daun Belimbing Wuluh

- dilakukan penyortiran
- dibersihkan dari kotoran yang menempel
- dikeringkan ke dalam oven dengan suhu 40-60°C
- digiling menjadi serbuk halus (simplicia) dengan blender
- ditimbang dengan timbangan analitik sebanyak 200 gram
- dimasukkan dalam labu erlenmeyer ukuran 1 liter
- direndam dengan etanol 96% sampai volume 1 liter
- dikocok sampai benar-benar tercampur selama 30 menit
- didiamkan 1 malam sampai mengendap

Hasil

5.2 Proses Evaporasi

Lapisan atas campuran etanol 96%

- diambil zat aktif yang sudah terambil
- dimasukkan dalam labu evaporasi pada evaporator
- dilakukan pengisian dengan air sampai penuh dan pemasangan alat: *rotary evaporator*, pemanas *water bath* dengan suhu 40°C
- disambungkan dengan aliran listrik
- dibiarkan memisah dengan zat aktif yang ada dalam labu
- ditunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung selama 2 jam
- dimasukkan dalam botol
- disimpan pada *refrigerator*

Hasil

Lampiran 7. Keterangan Kelaikan Etik

67



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No:472-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL	: STUDI PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN BELIMBING WULUH (<i>Averrhoa bilimbi</i> L) PADA HEWAN COBA TIKUS (<i>Rattus norvegicus</i>) YANG DIINDUKSI SIPERMETRIN TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI ORGAN HATI
PENELITI	: DELLA RIZKI PUTRI UTAMI
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT	: UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DINYATAKAN	: LAIK ETIK

Malang, 18 Desember 2015
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 8. Surat Keterangan Identifikasi

68



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS MIPA
JURUSAN BIOLOGI
Jl. Veteran, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia, Telp-fax : +62-341-575841
<http://biologi.ub.ac.id>

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0182/Takso.Identifikasi/03/2016

Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

Nama : Della Rizki Putri Utami (NIM 125130100111002)
Basofi Andra Aditama (NIM 125130100111016)
Shinta Oktavia Andhani (NIM 125130101111003)
Anggit Prio Pambudi (NIM 125130102111003)

Instansi : Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume I, halaman 248, diidentifikasi sebagai:

Familia : Oxalidaceae
Genus : *Averrhoa*
Species : *Averrhoa bilimbi* L.
Nama lokal : Belimbing Wuluh

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

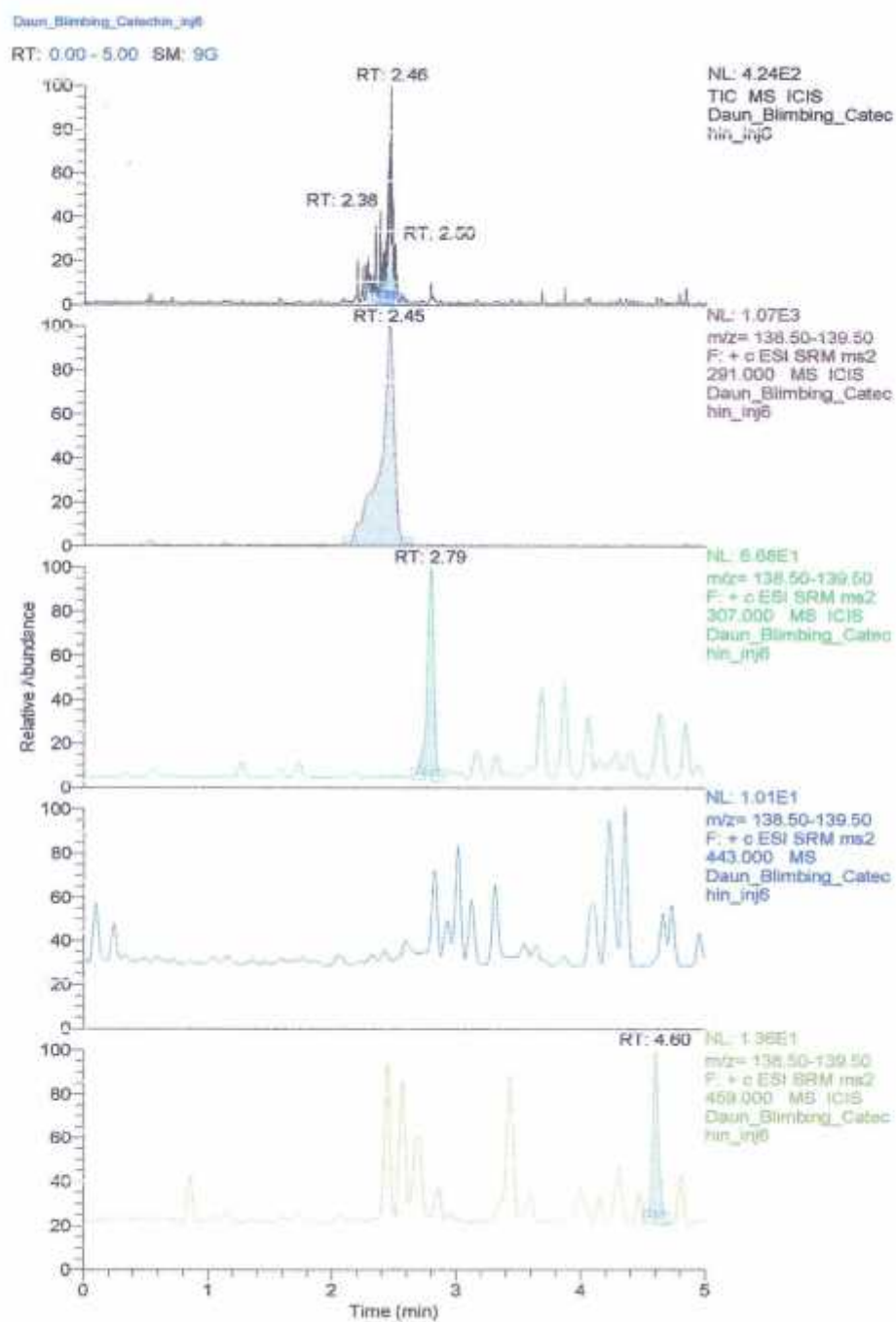
Malang, 31 Maret 2016
Kepala Laboratorium



Dr. Serafinah Indriyani, M.Si
LABORATORIUM NIP: 19630909.198802.2.001
TAKSONOMI TUMBUHAN



Lampiran 9. HASIL UJI LCMS



Keterangan Gambar :

Catechin : Molar mass 139 g/mol

Lampiran 10. Data Hasil Ekspresi dan Perhitungan TNF- α

1. Hasil Ekspresi TNF- α

Kelompok Perlakuan	Tikus					Rataan Ekspresi TNF- α
	1	2	3	4	5	
Kontrol negatif	0,60	0,60	0,90	1,00	0,80	0.7800
Kontrol positif	5,70	4,10	5,80	7,30	6,80	5.9400
Terapi 500mg/kgBB	4,10	4,50	3,30	3,70	3,80	3.8800
Terapi 1000mg/kgBB	1,00	1,60	2,00	1,90	1,70	1.6400

2. Perhitungan ekspresi TNF- α

Kelompok Kontrol Positif

$$\begin{aligned}
 \text{Peningkatan ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} &= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Negatif}}{\text{Rataan Negatif}} \times 100\% \\
 &= \frac{5,9400 - 0,7800}{0,7800} \times 100\% \\
 &= 661,53\%
 \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 500 mg/kg BB

$$\begin{aligned}
 \text{Penurunan ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} &= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\% \\
 &= \frac{5,9400 - 3,8800}{5,9400} \times 100\% \\
 &= 34,68\%
 \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 1000 mg/kg BB

$$\begin{aligned}
 \text{Penurunan ekspresi TNF-}\alpha \text{ (\%)} &= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\% \\
 &= \frac{5,9400 - 1,6400}{5,9400} \times 100\% \\
 &= 72,39\%
 \end{aligned}$$

Lampiran 11. Hasil Analisa Statistika

Tests of Normality

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
TNF Kontrol Negatif	.243	5	.200 [*]	.894	5	.377
Kontrol Positif	.223	5	.200 [*]	.946	5	.706
Perlakuan 1	.171	5	.200 [*]	.989	5	.978
Perlakuan 2	.259	5	.200 [*]	.888	5	.345

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

TNF

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol Negatif	5	.7800	.17889	.08000	.5579	1.0021	.60	1.00
Kontrol Positif	5	5.9400	1.23004	.55009	4.4127	7.4673	4.10	7.30
Perlakuan 1	5	3.8800	.44944	.20100	3.3219	4.4381	3.30	4.50
Perlakuan 2	5	1.6400	.39115	.17493	1.1543	2.1257	1.00	2.00
Total	20	3.0600	2.15831	.48261	2.0499	4.0701	.60	7.30

Test of Homogeneity of Variances

TNF

Levene			
Statistic	df1	df2	Sig.
3.296	3	16	.058

ANOVA

TNF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	80.908	3	26.969	56.778	.000
Within Groups	7.600	16	.475		
Total	88.508	19			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TNF

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	-5.16000*	.43589	.000	-6.4071	-3.9129
	Perlakuan 1	-3.10000*	.43589	.000	-4.3471	-1.8529
	Perlakuan 2	-.86000	.43589	.239	-2.1071	.3871
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	5.16000*	.43589	.000	3.9129	6.4071
	Perlakuan 1	2.06000*	.43589	.001	.8129	3.3071
	Perlakuan 2	4.30000*	.43589	.000	3.0529	5.5471
Perlakuan 1	Kontrol Negatif	3.10000*	.43589	.000	1.8529	4.3471
	Kontrol Positif	-2.06000*	.43589	.001	-3.3071	-.8129
	Perlakuan 2	2.24000*	.43589	.001	.9929	3.4871
Perlakuan 2	Kontrol Negatif	.86000	.43589	.239	-.3871	2.1071
	Kontrol Positif	-4.30000*	.43589	.000	-5.5471	-3.0529
	Perlakuan 1	-2.24000*	.43589	.001	-3.4871	-.9929

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

TNF

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol Negatif	5	.7800		
Perlakuan 2	5	1.6400		
Perlakuan 1	5		3.8800	
Kontrol Positif	5			5.9400
Sig.		.239	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.