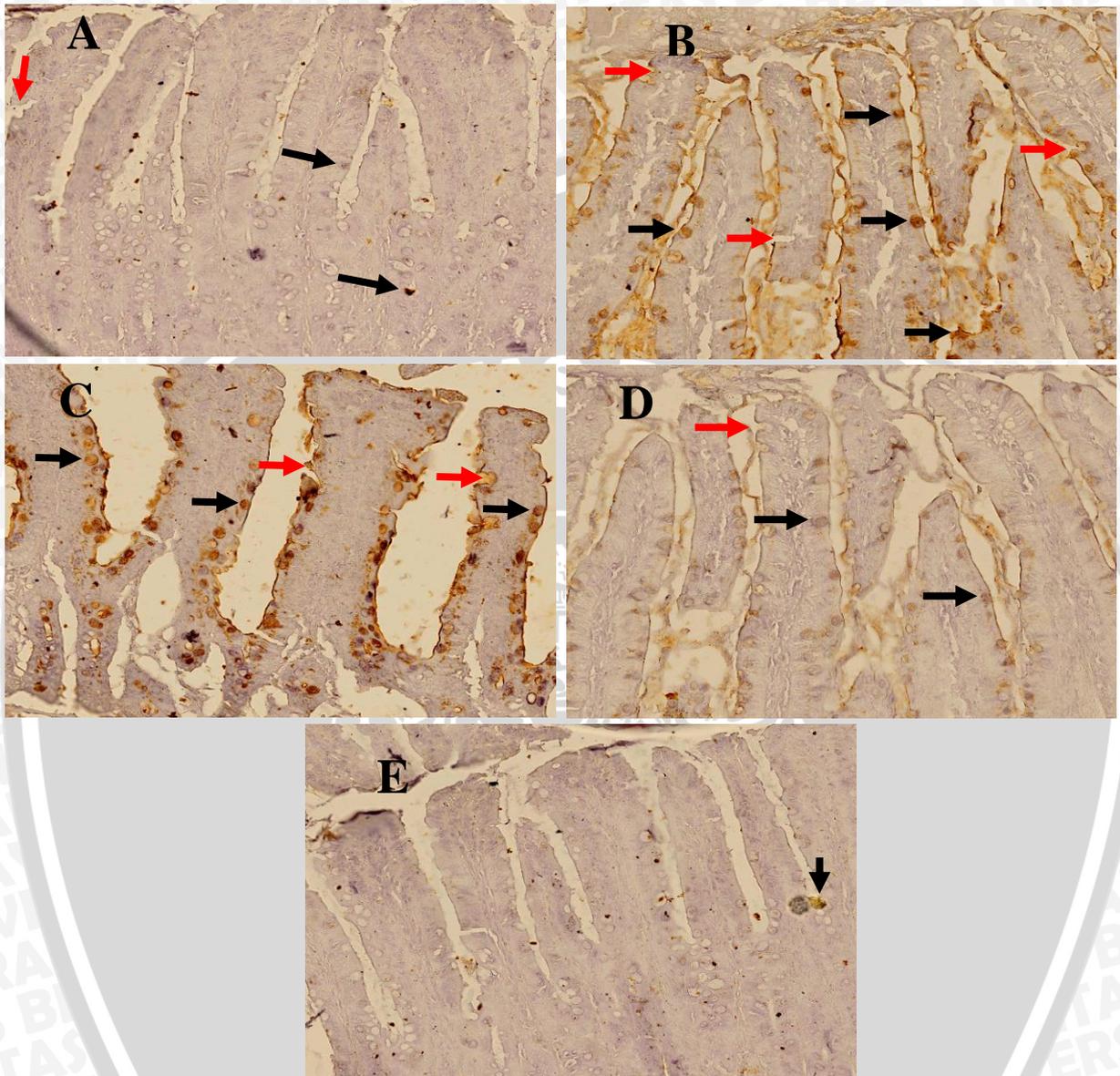


BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Ekspresi *Interleukin-6 (IL-6)* pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease (IBD)* yang Diterapi Ekstrak Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata*)

Interleukin-6 (IL-6) merupakan suatu sitokin yang terlibat dalam inisiasi serta pemeliharaan respons inflamasi dan imunologis yang sebagian besar dihasilkan oleh makrofag. *Interleukin-6 (IL-6)* sering digunakan sebagai penanda untuk aktivasi sistemik dari sitokin proinflamasi. *Interleukin-6 (IL-6)* mempunyai fungsi dimana pada keadaan inflamasi produksinya akan meningkat sebagai sitokin pro-inflamasi (Karnen, 2010).

Pengamatan ekspresi *Interleukin-6 (IL-6)* dilakukan pada kelompok tikus sehat (kontrol negatif), kelompok tikus model *Inflammatory Bowel Disease* (kontrol positif), kelompok tikus yang diterapi ekstrak daun kamboja putih 500 mg/kg BB (kelompok terapi 1), kelompok tikus yang diterapi ekstrak daun kamboja putih 750 mg/kg BB (kelompok terapi 2), dan kelompok tikus yang diberi terapi ekstrak daun kamboja putih 1000 mg/kg BB (kelompok terapi 3) (**Gambar 5.1**)



Gambar 5.1 Ekspresi *Interleukin-6 (IL-6)* pada organ jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) *Inflammatory Bowel Disease (IBD)* hasil induksi indometasin (Perbesaran 400x) dengan menggunakan metode *immunohistokimia*.

Keterangan : (A) Tikus kontrol negatif, (B) Tikus kontrol positif, (C) Tikus terapi 500 mg/kg BB, (D) Tikus terapi 750 mg/kg BB, (E) Tikus terapi 1000 mg/kg BB, Tanda panah (→) hitam menunjukkan ekspresi IL-6, Tanda panah merah (→) menunjukkan adanya kerusakan epitel pada organ jejunum.

Ekspresi *Interleukin-6 (IL-6)* pada organ jejunum ditandai dengan adanya warna coklat pada gambaran immunohistokimia (IHK) organ jejunum yang ditunjukkan dengan tanda panah hitam (↑) (Gambar 5.1). *Immunohistokimia* merupakan suatu metode identifikasi protein spesifik di dalam sel atau jaringan dengan menggunakan prinsip pengikatan antara antigen dan antibodi. Ekspresi *interleukin-6 (IL-6)* pada organ jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease (IBD)* ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada gambaran *immunohistokimia (IHK)*. *Interleukin-6 (IL-6)* terekspresikan pada seluruh sel atau jaringan di organ jejunum seperti lamina propia dan sel epitel.

Warna coklat yang dihasilkan pada gambaran *immunohistokimia* disebabkan karena adanya ikatan antara antigen (*IL-6*) pada organ jejunum dengan antibodi primer (*Rat Anti Interleukin-6*) yang selanjutnya berikatan dengan antibodi sekunder (*Goat Anti Rat biotin labeled*), setelah semua berikatan dilakukan penambahan substrat *Diamino benzidine (DAB)* yang bertujuan untuk menghasilkan warna coklat pada sitokin (*Interleukin-6*). Ekspresi dari *interleukin-6 (IL-6)* pada jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) terdapat pada vili yang ditandai dengan adanya warna coklat hasil dari proses pewarnaan *Immunohistokimia* (Strus *et al.*, 2009).

Peningkatan ekspresi dari *interleukin-6 (IL-6)* ditunjukkan dari presentase area melalui hasil foto preparat jejunum pada semua kelompok setelah dilakukan pewarnaan *Immunohistokimia*. Ekspresi *interleukin-6* yang dihasilkan pada preparat *Immunohistokimia* jejunum dihitung dengan

menggunakan *software Axio vision* sehingga diperoleh nilai rata-rata ekspresi *interleukin-6* (IL-6) dalam setiap kelompok perlakuan. Maka diketahui hasil peningkatan maupun penurunan ekspresi (IL-6) antar kelompok. Hasil pengukuran ekspresi *interleukin-6* (IL-6) pada organ jejunum dapat dilihat pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Rata-rata Ekspresi IL-6 pada organ jejunum hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*)

Kelompok Perlakuan	Ekspresi IL-6	Persen Area (%)	
		Peningkatan	Penurunan
Kontrol negatif	10,900 ± 0,291 ^a	-	-
Kontrol positif	98,000 ± 0,212 ^e	799,08	-
T1 (terapi 500 mg/kg BB)	61,300 ± 0,291 ^d	-	37,45
T2 (terapi 750 mg/kg BB)	39,080 ± 0,356 ^c	-	60,12
T3 (terapi 1000 mg/kgBB)	15,020 ± 0,192 ^b	-	84,67

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$). Presentase peningkatan terhadap kontrol negatif. Presentase penurunan terhadap kontrol positif.

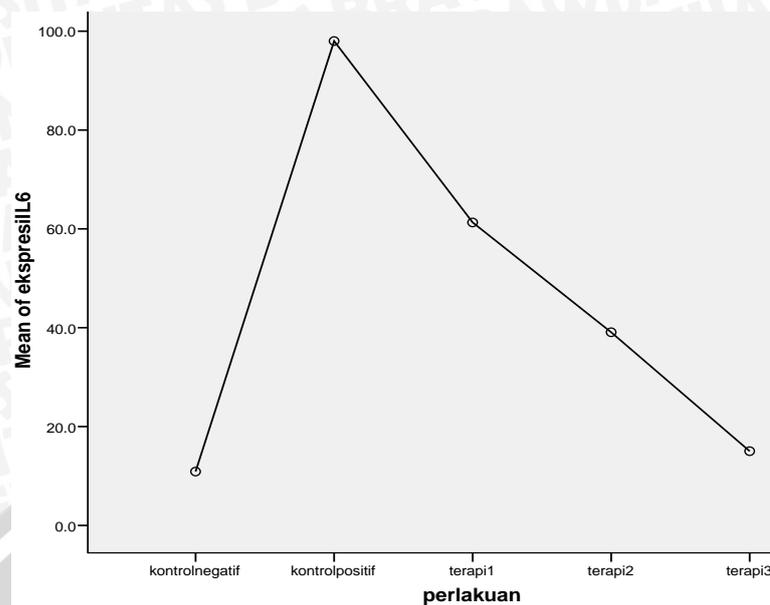
Pada **Tabel 5.1** telah ditunjukkan analisa hasil pengukuran ekspresi *Interleukin-6* (IL-6) berdasarkan uji One Way ANOVA yang menggunakan *software SPSS 21.0 for Windows* menunjukkan bahwa setiap perlakuan pada tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) memberikan pengaruh yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap ekspresi *Interleukin-6* (IL-6) pada organ jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) IBD (**Tabel 5.1**). Pada tikus kontrol negatif memiliki rata-rata ekspresi *interleukin-6* (IL-6) 10,900 ± 0,291. Hal ini disebabkan karena pada

keadaan normal sitokin terdapat di dalam tubuh walaupun dalam jumlah sedikit sebagai sistem kekebalan tubuh (Erica *et al.*, 2000). Nilai rata-rata dari ekspresi *interleukin-6* (IL-6) pada kelompok kontrol negatif digunakan sebagai acuan atau pembanding bagi kelompok perlakuan yang lain. Kelompok kontrol positif atau kelompok yang diinduksi indometasin berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif di mana terjadi peningkatan ekspresi *interleukin-6* (IL-6) terhadap kelompok kontrol negatif sebesar 799,08 % (**Tabel 5.1**).

Peningkatan presentase dari ekspresi *interleukin-6* (IL-6) pada tikus (*Rattus norvegicus*) kontrol positif yang diinduksi indometasin terjadi karena indometasin menghambat enzim siklooksigenase 1 (COX 1) yang dimana penghambatan enzim COX-1 akan menyebabkan produksi prostaglandin sebagai penghasil mukus pelindung saluran cerna menurun sehingga akan mempermudah terjadinya iritasi pada saluran cerna. Terjadinya iritasi atau inflamasi mengakibatkan aktivitas makrofag meningkat yang menyebabkan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) meningkat. ROS yang berupa O_2^- menyebabkan fosforilasi oksidatif pada NF-kB (*Nuklear Factor kB*) dan terjadinya pemutusan ikatan NF-kB (*Nuklear Factor kB*) dengan I κ B (*Inhibitor NF-kB*) yang menyebabkan perpindahan NF-kB (*Nuklear Factor kB*) dari sitoplasma ke inti sel (nukleus). Perpindahan NF-kB (*Nuklear Factor kB*) ini akan menginduksi transkripsi dan translasi sitokin pro-inflamasi yang berupa *interleukin-6* sebagai indikator terjadinya inflamasi (Neuman, 2004).

Berdasarkan hasil uji statistika (*One Way ANOVA*) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ekspresi *interleukin-6* (IL-6) pada kelompok terapi dengan kelompok kontrol positif. Pada kelompok terapi 500 mg/kg BB, kelompok terapi 750 mg/kg BB, dan kelompok terapi 1000 mg/kg BB mengalami penurunan ekspresi *interleukin-6* (IL-6) terhadap kelompok kontrol positif secara berturut turut sebesar 37,45 %, 60,12 %, 84,67 %. Dari data tersebut dapat dikatakan bahwa semakin tinggi dosis terapi yang diberikan, maka semakin besar penurunan ekspresi dari *interleukin-6* (IL-6) pada organ jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan indometasin. Secara grafikal pengaruh terapi yang dihasilkan oleh pemberian ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) terhadap ekspresi *interleukin-6* (IL-6) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD yang diinduksi dengan indometasin adalah sebagai berikut :

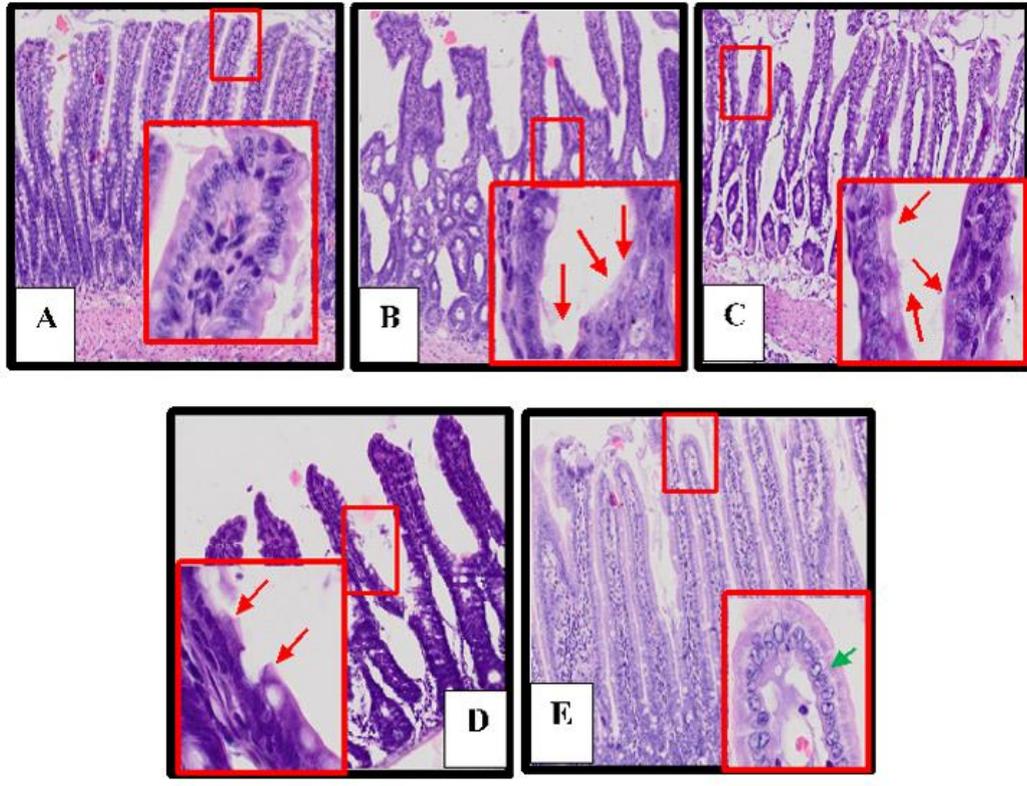




Gambar 5.1 Grafik penurunan ekspresi IL-6 pada kelompok tikus terapi

Sesuai dengan uji lanjutan menggunakan uji *Tukey* atau uji beda nyata jujur (BNJ) dapat diketahui bahwa pada kelompok terapi memberikan hasil yang berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif. Pemberian dosis secara bertingkat bertujuan untuk mengetahui pemberian dosis efektif untuk menurunkan ekspresi *interleukin-6* (IL-6) pada tikus model IBD yang diinduksi dengan indometasin. Pada penelitian ini penurunan ekspresi *interleukin-6* (IL-6) yang paling baik didapati pada tikus kelompok terapi E dengan dosis terapi 1000 mg/kg BB yang merupakan dosis paling efektif dalam menurunkan ekspresi *interleukin-6* (IL-6) pada organ jejunum tikus yang diinduksi indometasin.

5.2 Gambaran Histopatologi Jejunum pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) yang Diterapi Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata*)



Gambar 5.2 Histopatologi organ jejunum tikus putih dengan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE) perbesaran 400x

Keterangan : (A) Tikus kontrol negatif, (B) Tikus kontrol positif, (C) Tikus terapi 500 mg/kg BB, (D) Tikus terapi 750 mg/kg BB, (E) Tikus terapi 1000 mg/kg BB, (→) kerusakan epitel pada organ jejunum, (→) perbaikan sel epitel organ jejunum

Pengamatan histopatologi organ jejunum dilakukan dengan mengamati kerusakan struktur jaringan organ jejunum tikus yaitu terjadinya erosi pada sel epitel (lepasnya sel epitel dari membrana basalis) yang diwarnai dengan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE). Hasil pewarnaan dari *Hematoxyline Eosin* (HE) pada potongan organ jejunum diamati adanya

kerusakan sel epitel pada gambaran histopatologi organ jejunum tikus model IBD.

Pada keadaan normal, gambaran organ jejunum akan terlihat vili yang tersusun rapi dan rapat. Jejunum terdiri dari tunika serosa/adventitia, muskularis eksterna dan interna, submukosa, dan mukosa. Tunika serosa/adventitia merupakan lapisan terluar dari usus halus yang terdiri atas pembuluh darah dan limfe serta terbentuk dari sel – sel epitel silindris selapis. Tunika submukosa merupakan lapisan jaringan ikat tidak beraturan padat yang mengandung pembuluh darah dan saluran limfa. Tunika mukosa terdiri atas suatu membran epitel permukaan yang basah dilapisi mukus yang terletak di atas suatu lamina basal. Di bawahnya terdapat sedikit jaringan ikat longgar (lamina propia) dan lapisan tipis otot polos (muskularis mukosa). (Bowler and Crapo, 2002).

Pada gambar (A) yang merupakan tikus kelompok kontrol negatif (sehat) menunjukkan gambaran histologi organ jejunum tikus putih tanpa diinduksi indometasin dan tanpa diberi terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) terlihat tunika mukosa jejunum yang terdiri atas vili intestinalis, lamina propia, serta sel epitel silindris selapis yang disertai dengan sel goblet tidak mengalami kerusakan. Pada gambar (B) yang merupakan kelompok kontrol positif yang diinduksi indometasin tanpa diberi terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) terlihat tunika mukosa organ jejunum yang terdiri atas vili intestinalis, lamina propia, serta sel epitel silindris selapis.

Jejunum memiliki struktur vili yang lebih tinggi dibandingkan dengan ileum, namun vili yang terdapat pada jejunum lebih sedikit dibandingkan dengan vili yang terapat pada duodenum. Lamina propia tersusun atas jaringan ikat longgar. Pada tunika mukosa juga terdapat sel goblet yang berfungsi dalam menghasilkan lendir (mukus) yang berperan dalam mempermudah penyerapan makanan (absorpsi). Adanya sel goblet memberi perlindungan permukaan usus halus dari ancaman zat toksik yang masuk ke dalam tubuh dan mukus yang dilepaskan oleh sel goblet akan mengurangi perlekatan zat toksik pada mukosa usus dan dengan bantuan peristaltik usus akan dikeluarkan bersama dengan feses. Zat toksik adalah bahan apapun yang dapat memberikan efek yang merugikan bagi tubuh makhluk hidup. (Balqis dkk., 2007).

Toksisitas indometasin yang diinduksikan pada tikus menyebabkan perubahan histopatologi pada organ jejunum karena induksi indometasin secara per oral yang masuk ke dalam saluran pencernaan menyebabkan terjadinya erosi sel pada mukosa usus yang terlihat pada gambaran histopatologi organ jejunum tikus kontrol positif (Gambar B). Indometasin yang diinduksikan pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) secara per oral akan menghasilkan radikal bebas berupa senyawa oksigen reaktif (ROS) yang berbahaya karena akan merusak sel. Salah satu senyawa ROS yang berbahaya adalah radikal hidroksil (Hariono, 2006).

Erosi sel yang terjadi pada mukosa usus menggambarkan hilangnya epitel usus tanpa disertai hilangnya muskularis mukosa. Terjadinya

kerusakan pada tunika mukosa jejunum disebabkan karena induksi indometasin yang diberikan pada tikus secara per oral. Jejunum merupakan bagian dari usus halus yang berfungsi sebagai absorpsi nutrisi makanan melalui proses enzimatik pencernaan. Usus halus mempunyai bentuk berupa vili yang berfungsi untuk meningkatkan luas permukaan usus dan membantu dalam penyerapan nutrisi tubuh. Kerusakan vili usus dapat menyebabkan zat tidak dapat terserap di dalam usus halus. Hal ini dapat terjadi sebagai akibat adanya zat toksik sebagai salah satu xenobiotik yang dapat mengganggu proses penyerapan makanan (McHugh *et al.*, 2007).

Kelompok terapi 1 yang diberi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dengan dosis 500 mg/kg BB menunjukkan adanya erosi yang terjadi pada epitel mukosa usus yang ditunjukkan dengan tanda panah berwarna merah (Gambar C). Pada kelompok terapi 2 yang diberi ekstrak ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dengan dosis 750 mg/kg BB masih terlihat terjadinya erosi pada epitel mukosa usus (Gambar D). Kelompok terapi 3 yang diberi ekstrak ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dengan dosis 1000 mg/kg BB terlihat mengalami perbaikan yang lebih baik dibandingkan kelompok sebelumnya. Hal ini ditunjukkan dengan tidak terjadinya kerusakan vili usus dan berkurangnya erosi sel pada epitel mukosa usus yang ditunjukkan dengan tanda panah berwarna hijau (Gambar E).

Hal ini dapat disebabkan karena adanya pengaruh dari kandungan lupeol asetat dari ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) yang

berperan sebagai antioksidan. Kandungan lupeol asetat dalam ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) sebagai antioksidan akan menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas ROS sehingga NF- κ B dan inhibitor NF- κ B tidak teraktivasi akan berpengaruh pada penurunan dari produksi sitokin pro-inflamasi yang akan menghambat terjadinya inflamasi sehingga terjadi perbaikan pada jaringan organ jejunum. (Natalia, 2007).

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) yang diberikan dengan dosis 1000 mg/kg BB merupakan dosis yang paling baik karena mampu memperbaiki kerusakan struktur jaringan pada jejunum tikus yang diinduksi indometasin pada gambaran histopatologi jejunum tikus yang ditunjukkan dengan keadaan struktur vili yang lebih baik dibandingkan pada pemberian terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dengan dosis 500 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB.

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Pluneria acuminata*) dapat menurunkan ekspresi *interleukin-6* (IL-6) pada organ jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) yang diinduksi indometasin yang ditandai dengan berkurangnya warna coklat pada gambaran IHK organ jejunum yang mengindikasikan adanya penurunan pada ekspresi *interleukin-6* (IL-6). Dosis terbaik dalam menurunkan ekspresi *interleukin-6* (IL-6) adalah 1000 mg/kg BB.
2. Terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Pluneria acuminata*) dapat memperbaiki gambaran histopatologi jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) yang diinduksi indometasin ditandai dengan adanya perbaikan struktur vili jejunum yang terlihat rapi dan rapat seperti pada gambaran histopatologi organ jejunum normal. Dosis terbaik dalam memperbaiki gambaran histopatologi jejunum adalah 1000 mg/kg BB.

6.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut terhadap ekstrak metanol daun kamboja putih (*Pluneria acuminata*) untuk mengetahui dosis optimum dari ekstrak metanol daun kamboja putih (*Pluneria acuminata*) sebagai terapi preventif pada tikus

(*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) yang diinduksi indometasin.

