

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK AKUOS MENGKUDU (*Morinda citrifolia*) TERHADAP DEGRANULASI SEL MAST OTAK PADA TIKUS WISTAR YANG DIBERI STRES AUDIOGENIK SUBAKUT

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



Oleh:

Yoris Junanto

155070101111093

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2018

HALAMAN PENGESAHAN
TUGAS AKHIR

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK AKUOS MENGKUDU (*Morinda
citrifolia*) TERHADAP DEGRANULASI SEL MAST OTAK PADA TIKUS
WISTAR YANG DIBERI STRES AUDIOGENIK SUBAKUT

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran

Oleh :
Yoris Junanto
155070101111093

Telah diuji pada
Hari : Kamis
Tanggal : 29 November 2018
Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

dr. Rayhan Anka Firdausi, Sp.F
NIP. 2013098812291001

Pembimbing I/Penguji II

dr. Badrul Munir, Sp.S
NIP. 197409102002121005

Pembimbing II/Penguji III

dr. Zamroni Aji, M.Biomed, Sp.S
NIP./NIK. 2016097911251001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran

dr. Trwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vii
Abstract	viii
Daftar Isi	ix
Daftar Tabel	xiii
Daftar Gambar	xiv
Daftar Singkatan	xv

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademik	4
1.4.2 Manfaat Praktis	4

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Stres.....	5
2.2 Sel Mast Otak.....	7
2.3 Histamin.....	12
2.4 <i>Quercetin</i>	13
2.5 Mengkudu.....	15

BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep.....	16
3.2 Hipotesis Penelitian.....	17

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian.....	18
4.2 Populasi dan Sampel.....	19
4.2.1 Populasi Penelitian.....	19
4.2.2 Sampel Penelitian.....	19
4.2.2.1 Kriteria Inklusi.....	19
4.2.2.2 Kriteria Eksklusi.....	19
4.2.2.3 Perolehan Sampel.....	19
4.3 Variabel Penelitian.....	20
4.3.1 Variabel Bebas.....	20
4.3.2 Variabel Terikat.....	20
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	21
4.5 Definisi Operasional.....	21
4.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	22

4.6.1	Alat dan Bahan Pemeliharaan Tikus	22
4.6.2	Alat dan Bahan Sanitasi dan Higienisasi.....	22
4.6.3	Alat dan Bahan Ekstraksi Akuos Mengkudu	22
4.6.4	Alat dan Bahan Induksi Stres Tikus.....	22
4.6.5	Alat dan Bahan Pengambilan Otak Tikus dan Pembuatan Preparat.....	22
4.6.6	Alat dan Bahan Pembuatan Preparat Histologi.....	22
4.6.7	Alat dan Bahan Peghitungan Sel Mast Otak.....	23
4.7	Prosedur Penelitian	23
4.7.1	Prosedur Pemeliharaan dan Seleksi Tikus	23
4.7.2	Prosedur Ekstraksi Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i>).....	23
4.7.3	Prosedur Pemaparan Tikus Terhadap Alat Pemicu Stres Sub Akut.....	23
4.7.4	Prosedur Injeksi Perlakuan.....	23
4.7.5	Prosedur Pembedahan.....	24
4.7.6	Prosedur Fiksasi Jaringan Otak.....	24
4.7.7	Prosedur <i>Embedding</i> Jaringan Otak	24
4.7.8	Prosedur <i>Slicing</i> Jaringan Otak	24
4.7.9	Prosedur Pewarnaan <i>Toluidine Blue</i>	25
4.7.10	Prosedur <i>Mounting</i> Jaringan Otak.....	25
4.7.11	Prosedur Penghitungan Sel Mast Otak.....	25
4.7.12	Prosedur Pengolahan Data	25
4.8	Bagan Alur Penelitian	26

BAB 5. HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1 Hasil Penelitian.....	27
5.2 Analisis Data.....	29
5.2.1 Uji Asumsi Data.....	29
5.2.1.1 Uji Normalitas Distribusi Data.....	29
5.2.1.2 Uji Homogenitas Ragam Data.....	29
5.2.2 Uji Kruskal-Wallis.....	30
5.2.2.1 Data Rerata Persentase Degranulasi Sel Mast.....	30
5.2.3 Uji Mann-Whitney.....	30
5.2.3.1 Data Rerata Persentase Degranulasi Sel Mast.....	30

BAB 6. PEMBAHASAN	32
--------------------------------	-----------

BAB 7. PENUTUP

7.1 Kesimpulan.....	35
7.2 Saran.....	35

DAFTAR PUSTAKA	36
-----------------------------	-----------

LAMPIRAN 1	45
-------------------------	-----------

LAMPIRAN 2	47
-------------------------	-----------

LAMPIRAN 3	48
-------------------------	-----------

LAMPIRAN 4	49
-------------------------	-----------

LAMPIRAN 5	54
-------------------------	-----------

LAMPIRAN 6	55
-------------------------	-----------

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1	Distribusi Sel Mast Berdasarkan Spesies.....	9
Tabel 5.1	Data Rerata Persentase Degranulasi Sel Mast Talamus	
	Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Strain Wistar berusia 4 Bulan	28
Tabel 5.2	Hasil Uji <i>Kruskall-Wallis</i> Data Rerata Persentase	
	Degranulasi Sel Mast.....	30
Tabel 5.3	Hasil Uji Mann-Whitney Data Rerata Persentase	
	Degranulasi Sel Mast.....	30



DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1	Gambaran Histologis Sel Mast yang Mengalami Degranulasi dan Tidak	8
Gambar 2.2	Quercetin	14
Gambar 5.1	Sel Mast yang Tidak Mengalami Degranulasi Dan Sel Mast yang Sedang Mengalami Degranulasi	27
Gambar 5.2	Diagram Persentase Degranulasi Sel Mast Talamus Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Strain Wistar	28



DAFTAR SINGKATAN

GABA : *Gamma-aminobutyric acid*

KLH : *Keyhole Limcoet Hemocyanin*

CRH : *Corticotropin-releasinng Hormone*

PSD : *Psychological Stress Device*

BBB : *Blood Brain Barrier*

SSRI : *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*

SSP: *Sistem Saraf Pusat*

HCBMCs : *Human Cord Blood-derived Cutured Mast Cell*

WSQ : *Water-soluble Quercetin*

P38 MAPK : *p38 Mitogen Activated Protein Kinase*

NF-kB: *Nuclear Factor-kB*

PKC: *Protein Kinase C*

HPA : *Hypothalamus-pituitary Adrenal*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

IL-6: *Interleukin-6*

IL-8 : *Interleukin-8*

TC : *Thalamocortical*

RE : *Endoplasmic Reticula*

NREM : *Non Rapid Eye Movement*

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yoris Junanto

NIM : 155070101111093

Program Studi : Program Studi Kedokteran

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 4 Oktober 2018

Yang membuat pernyataan,



(Yoris Junanto)

NIM. 155070101111093

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberi berkat dan petunjuk sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul "Pengaruh Pemberian Ekstrak Akuos Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Terhadap Degranulasi Sel Mast Otak pada Tikus Wistar yang Diberi Stres Audiogenik Subakut". Penulis tertarik untuk meneliti topik ini karena ingin mengetahui lebih lanjut mengenai potensi buah mengkudu. Quercetin merupakan salah satu kandungan dalam mengkudu yang memiliki efek menghambat degranulasi sel mast pada jaringan perifer dan dapat melintasi sawar darah otak. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan hipotesis bahwa pemberian ekstrak akuos mengkudu dapat memurunkan degranulasi sel mast otak pada tikus yang diberi stres audiogenik subakut.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. dr. Badrul Munir, Sp.S , sebagai pembimbing pertama yang membimbing peneliti dengan sangat sabar dalam penulisan naskah dan pelaksanaan penelitian, sehingga peneliti dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
2. dr. Zamroni Afif, M.Biomed, Sp.S, sebagai pembimbing kedua yang membimbing peneliti dengan sabar dalam penulisan naskah dan pelaksanaan penelitian, sehingga peneliti dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
3. dr. Obed T.K. Paundralingga, M.Sc, yang membimbing peneliti dengan sabar dalam pelaksanaan penelitian selama kegiatan PKM-PE, sehingga peneliti dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.

4. dr. Reyhan Andika Firdausi, Sp.F, yang telah menyempatkan waktunya untuk menguji Tugas Akhir ini dan banyak memberikan masukan kepada peneliti.
5. dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K), sebagai Ketua Program Studi Kedokteran yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di Program Studi Pendidikan Dokter di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
6. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes, sebagai dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
7. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB, yang telah membantu dalam hal administrasi dan kelancaran Tugas Akhir.
8. Bapak Wahyu Muji Iswanto selaku laboran yang telah meluangkan waktunya untuk membantu peneliti dalam pembuatan preparat histologi.
9. Yang tercinta papi, Hendro Susanto, dan mami, Lidya, serta kedua saudara Yoval Julianto dan Yosephine Augesvina yang selalu mendoakan dan memberikan dukungan kepada penulis selama pengerjaan Tugas Akhir. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Ivanna Yuhan, yang selalu mendampingi saat penelitian dan pengerjaan Tugas Akhir serta memberikan dukungan, doa, motivasi dan semangat kepada penulis.
10. Rekan seperjuangan dalam PKM-PE "Kupulas Tidur" Adi Kuncoro, Erwin A. Pasaribu, Shaza Nathasya, Sharon Thesalonica Delaney serta teman-teman khususnya Adolf Gideon, Alfred Tanjung, Devina Teresa, Andy Sutanto, Hannie Fransisca, dan Khansa Khairunnisa atas dukungan dan masukan yang diberikan kepada peneliti.
11. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan Tugas Akhir ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa karya ilmiah ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri segala saran dan kritik yang membangun.

Akhir kata, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi masyarakat luas dan perkembangan ilmu pengetahuan.

Malang, 4 Oktober 2018

Penulis

Yoris Junanto



ABSTRAK

Junanto, Yoris. 2018. **Pengaruh Pemberian Ekstrak Akuos Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Terhadap Degranulasi Sel Mast Otak pada Tikus Wistar yang Diberi Stres Audiogenik Subakut**. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Badrul Munir, Sp.S. (2) dr. Zamroni Afif, Sp.S.

Latar belakang: Stres diketahui berperan dalam proses terjadinya beberapa kondisi patologis dalam tubuh manusia, seperti gangguan tidur, migraine dan kondisi lainnya dimana mekanismenya berkaitan dengan proses pengeluaran mediator inflamasi oleh sel mast otak yang mengalami degranulasi. Quercetin diketahui dapat mencegah degranulasi sel mast perifer. Quercetin juga diketahui dapat menembus sawar darah otak. Buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) memiliki kandungan quercetin yang tinggi yaitu sekitar 0,21-0,75g/100g daging buahnya. Disamping itu ekstrak akuos buah mengkudu juga diketahui memiliki efek sedatif hipnotik namun belum diketahui bagaimana mekanismenya. Penelitian ini dilaksanakan untuk mengevaluasi efek dari pemberian ekstrak akuos mengkudu intraperitoneal terhadap degranulasi sel mast otak tikus yang mengalami paparan stres audiogenik subakut berupa *white noise* berdurasi 4 jam per hari selama 14 hari.

Metode penelitian: *True experimental* dengan *randomized control group design* secara *in vivo* menggunakan 30 ekor tikus strain wistar jantan dengan usia 4 bulan yang dibagi kedalam lima kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, kelompok perlakuan 1 (antihistamin I.P.), kelompok perlakuan 2 (*Quercetin* dihidrat I.P.) dan kelompok perlakuan 3 (Ekstrak akuos mengkudu I.P.). 6 tikus digunakan pada setiap kelompok perlakuan. Sel mast otak diidentifikasi dengan menggunakan pewarnaan *toluidine blue* pada regio talamus dan dihitung persentase degranulasinya. Hasil persentase dianalisis menggunakan metode *Kruskal Wallis* dan Uji lanjut *Mann-Whitney*.

Hasil: Pada kelompok perlakuan injeksi intraperitoneal ekstrak akuos mengkudu didapatkan penurunan sebanding dengan kelompok perlakuan injeksi intraperitoneal *Quercetin dihidrat* pada persentase degranulasi sel mast yang lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol (kelompok yang mendapat paparan stres namun tidak mendapat injeksi perlakuan) dan kelompok perlakuan injeksi intraperitoneal antihistamin ($p < 0.05$).

Kesimpulan: Injeksi intraperitoneal ekstrak akuos mengkudu dapat menurunkan degranulasi sel mast otak.

Kata kunci: stres, sel mast, quercetin, mengkudu

ABSTRACT

Junanto, Yoris. 2018. **The Effect of Aqueous Extract of Noni (*Morinda citrifolia*) to Brain Thalamic Mast Cell's Degranulation Given in Rats Induced Subacute Audiogenic Stress**. Final Assignment, Medical program, Faculty of medicine, University of Brawijaya. Supervisors: (1) dr. Badrul Munir, Sp.S. (2) dr. Zamroni Afif, Sp.S.

Introduction: Stress often involves in many pathological conditions, such as sleeping disorder, migraine, etc. and one of the mechanism involved is the secretion of inflammatory mediator by the brain's mast cell that undergoes degranulation in response to stress. Quercetin is known to prevent the degranulation of peripheral mast cells. Quercetin is also able to cross the blood-brain barrier. Noni fruits flesh (*Morinda citrifolia*) contains high dose of quercetin approximately 0,21-0,75g/100g. Otherwise, aqueous extract of Noni fruit also known to have sedative-hypnotic effect although the mechanism is still unknown. This study was set out to evaluate the effect of aqueous extract noni fruit via intraperitoneal injection on the brain mast cells degranulation after 4-h daily exposure to white noise stress for 14 days.

Method: True experimental with randomized control group design in vivo using 4 months old 30 male rats, divided into five groups which were control negative, control positive, antihistamine I.P. rats, Quercetin dehydrate I.P rats. and aqueous extract of noni I.P. rats. Six male rats were used for each groups. Brain mast cells were identified with touluidine blue staining in the thalamus and degranulation percentage is counted. The results then analyzed using *Kruskal-Wallis* method and post-hoc *Mann Whitney*.

Result: The percentage of mast cell degranulation in rats which were given intraperitoneal noni fruit injection is equal to the group given intraperitoneal quercetin injection but were smaller compared to the rats in the control group (stressed rats without quercetin administration) and rats given intraperitoneal antihistamine injection ($P < 0.05$).

Conclusion: Intraperitoneal aqueous extract of noni fruit administration reduces the degranulation of brain mast cells.

Keyword : stress, mast cell, quercetin, noni

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Stres merupakan sebuah kumpulan kejadian yang merangsang reaksi di otak, yang mengaktifkan respon (*fight or flight*) pada tubuh (Dhabhar, 2009). Pada saat sedang menghadapi stressor, tubuh akan melakukan proses defensif sebagai mekanisme adaptasi mempertahankan homeostasis, apabila proses ini gagal, fungsi tubuh gagal mempertahankan homeostasis sehingga berpengaruh terhadap fungsi fisiologis manusia yang dalam waktu berkepanjangan dapat memiliki dampak yang berbahaya seperti penurunan sistem imun (Dhabhar, 1996), pelepasan mediator inflamasi (misalnya sel mast), ansietas, dan gangguan tidur (Han et al., 2012).

Dari studi yang dilakukan oleh *Anxiety Disorders Association of America* pada tahun 2007 tentang efek stres dan ansietas merupakan dua penyebab masalah tidur yang sering dijumpai pada manusia dimana ansietas tersebut dapat memperparah masalah tidur orang dewasa. Hubungan ini timbal balik, bahwa tiga perempat dari seluruh orang dewasa yang terkena masalah tidur yang kronis juga meningkatkan risiko gangguan ansietas dan tidak jarang pula kondisi stres berkepanjangan menyebabkan terjadinya depresi (ADAA, 2017).

Stres dapat meningkatkan degranulasi sel mast otak dimana ini berhubungan dengan peningkatan kadar histamin di otak (Blandina et al., 2012; Westerink et al., 2002). Histamin di otak merupakan salah satu neurotransmitter di otak yang memiliki peranan penting dalam menjaga keseimbangan kondisi terganggu-tidur dan bekerja meningkatkan keterampilan dan kewaspadaan pada manusia dalam kondisi yang dianggap terdapat ancaman terhadap tubuh (Tiligada, Kyriakidis, Chazot, & Passani, 2011; Lin, Sergeeva, & Haas, 2011). Histamin di otak

2

dihasilkan dari dua sumber, yang pertama dihasilkan oleh neuron histaminergik di *nukleus tuberomamillaris* hipotalamus posterior, mengirimkan impulsnya ke beberapa regio di otak seperti korteks otak, thalamus, preoptikal dan hipotalamus anterior, batang otak, dan struktur kolinergik dan monoaminergik pada otak depan dimana ini berperan menggugah sistem saraf pusat melalui efek eksitatoris yang diperantarai reseptor H1 (Blandina, Munari, Provensi, & Passani, 2012; Green, 1978; Haas, Sergeeva, & Selback, 2008). Selain neuron histaminergik, separuh dari kadar histamin di otak dihasilkan oleh sel-sel mast, sel-sel yang juga terdapat di jaringan perifer tubuh lain seperti usus dan kulit dan berperan penting dalam reaksi alergi dan radang. Kondisi stres mental, emosional dan sosial menyebabkan peningkatan jumlah sel mast dan tingkat degranulasi yang melepaskan histamin pada otak (Baldwin, 2005; Chikahisa et al., 2013; Tiligada et al., 2011; Valent, 2013). Selain stressor yang disebutkan diatas, penelitian yang dilakukan oleh Watson & Campeau menyatakan stresor suara (audiogenik) menggunakan *white noise* juga dapat memicu kondisi stres pada tikus (Campeau & Watson 1997).

Pelepasan histamine oleh neuron histaminergik memiliki perbedaan yang dapat bermakna klinis. Histamin dari neuron histaminergik dilepaskan bersama GABA, suatu neurotransmitter inhibitor. Ini bermakna bahwa eksitasi yang dihasilkan oleh histamin dapat direm oleh inhibisi dari GABA (Yu et al., 2015). Akan tetapi, pelepasan histamin oleh sel-sel mast tidak memiliki mekanisme kontrol serupa, sehingga berpotensi mengakibatkan eksitasi berkepanjangan dimana melalui reseptor H1 dapat memicu gangguan tidur dan keadaan ansietas (Chikahisa et al., 2013). Dalam praktiknya, obat-obat sedatif yang biasa diresepkan untuk membantu gangguan tidur dan ansietas seperti barbiturat dan benzodiaepin memiliki mekanisme sebagai GABA agonis, sedangkan pada obat tidur golongan antihistamin seperti *chlorpeniramine maleat* bekerja untuk

memblokade reseptor histamin, tetapi tidak dalam mencegah pelepasan histamin dari sel-sel mast (Stahl, 2008; Tiligada et al., 2011).

Quercetin, suatu senyawa organik golongan flavonoid polifenolik, diketahui dapat mencegah degranulasi sel-sel mast di jaringan tubuh selain otak (Weng et al., 2012). Senyawa ini juga dapat melintasi sawar darah otak dan bahkan memiliki efek proteksi terhadap sistem saraf pusat (Dajas et al., 2015). Senyawa quercetin umumnya dapat ditemukan di berbagai macam tanaman, termasuk buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) (Thoo et al., 2013). Buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) telah lama dikenal di masyarakat sebagai obat tradisional dalam berbagai tujuan kesehatan. Ekstrak akuos dari buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) diketahui memiliki efek sedatif-hipnotik (Kannan, Manickam, & RajaMohammed, 2014). Akan tetapi, sampai hingga saat ini masih belum diketahui apakah efek ini diperantarai oleh kandungan quercetin dalam buah mengkudu yang mencegah pelepasan histamin oleh sel-sel mast dalam otak. Tercatat pada tahun 2014 di pulau Jawa saja telah diproduksi buah mengkudu sebanyak 6.298.276 kg, jumlah produksi yang melimpah ini tidak diimbangi oleh pemanfaatannya, oleh sebab itu dipilihlah mengkudu sebagai bahan penelitian (Dirjen Hortikultura Kementerian Pertanian, 2015).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian ekstrak akuos buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) berpengaruh terhadap degranulasi sel mast otak tikus wistar yang diberi stres audiogenik secara subakut?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak akuos mengkudu (*Morinda citrifolia*) terhadap degranulasi sel mast otak pada tikus Wistar yang diberi stres audiogenik subakut.

1.3.2 Tujuan Khusus

Untuk menghitung presentase tingkat degranulasi sel mast guna melihat pengaruh pemberian ekstrak akuos mengkudu (*Morinda citrifolia*) pada perlakuan stres audiogenik subakut dalam hubungannya terhadap degranulasi sel mast di talamus tikus wistar.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Memberikan informasi mengenai pengaruh pemberian ekstrak akuos mengkudu (*Morinda citrifolia*) terhadap penurunan degranulasi sel mast otak khususnya bagian thalamus pada tikus Wistar yang diberi stres audiogenik subakut.

1.4.2. Manfaat Praktis

1. Dapat digunakan sebagai alternatif terapi pada penderita gangguan tidur yang disebabkan oleh stres.
2. Dapat digunakan sebagai dasar teori untuk mengembangkan penelitian mengenai khasiat buah mengkudu (*Morinda citrifolia*).
3. Dapat digunakan sebagai dasar teori untuk mengembangkan penelitian mengenai analisa penurunan kadar histamin dan mediator lainnya oleh sel mast otak pada kondisi stres dengan terapi ekstrak akuos mengkudu .

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Stres

Istilah “stres” didefinisikan pertama kali oleh Hans Seyle ditahun 1956

sebagai efek dari segala hal yang mengancam homeostasis. Ancaman ini disebut

sebagai “stresor”, dan respon terhadap stresor disebut sebagai “respon stres”

(Schneiderman et al., 2005). Respon stres adalah suatu perubahan fisiologis yang

berfungsi membantu individu mengatasi stres (Padgett & Glaser, 2003).

Stres dibedakan secara garis besar menurut waktu paparannya menjadi

stres akut , sub akut dan kronik (Marković et al., 2011). Stres dengan durasi

paparan stresor selama periode menit hingga jam (satu kali pemaparan selama

empat jam) disebut sebagai stres akut. Pada stres subakut durasi paparan

beberapa jam per hari dalam beberapa minggu (pemaparan dilakukan empat jam

per hari selama empat belas hari). Sedangkan stres dengan durasi paparan

beberapa jam per hari dalam satu atau beberapa bulan (empat jam per hari selama

tiga puluh hari) disebut sebagai stres kronik (Dhabhar, 2008; Samson et al.,2006).

Variasi stresor yang berbeda dapat mengakibatkan respon stres yang berbeda

(Morilak et al., 2005). Respon stres yang berlebihan atau tidak adekuat dapat

berkontribusi pada timbulnya patologi (Smith & Vale, 2006)

Stres juga memiliki dampak terhadap sistem imun makhluk hidup. Dalam

penelitian yang dilakukan oleh Dhabhar pada tahun 1996, diketahui bahwa stres

yang dialami saat terjadinya paparan antigen primer dapat meningkatkan respon

imun secara signifikan. Hal ini dibuktikan dengan penelitian yang menyatakan

bahwa, dibandingkan dengan kontrol, tikus yang mengalami *restrain* selama 2,5

jam sebelum vaksinasi *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) mengalami peningkatan

signifikan dari sistem imun setelah mengalami paparan ulang KLH 9 bulan

kemudian. Peningkatan kinerja sistem imun tersebut terjadi oleh karena kelompok tikus tersebut mengalami peningkatan jumlah dari sel T memori dan sel T efektor pada limfonodi tikus. Penelitian yang sama juga menyatakan bahwa pemberian stres saat pemaparan ulang dari antigen dapat meningkatkan respon sekunder pada kulit.(Dhabar,2009) Stres kronis dapat menyebabkan penurunan respon imun protektif yang dimediasi oleh sitokin tipe 1 dan meningkatkan aktivitas proinflamator oleh sitokin tipe 2. Penelitian yang sama juga menyatakan bahwa stres dapat mempengaruhi risiko infeksi. Studi pada laki-laki dan perempuan yang mendapat stres kronis oleh karena merawat istri atau suami yang menderita demensia menunjukkan defisit respon imun seluler dan humoral terhadap vaksin virus influenza dibandingkan dengan laki-laki dan perempuan yang tidak merawat suami atau istri yang mengalami demensia. (Glaser & Kiecolt-glaser, 2005)

Jika dilihat hubungannya dengan sel mast, stres dapat menyebabkan degranulasi sel mast di kulit. Hal ini didasarkan pada penelitian yang menyatakan bahwa tikus yang mengalami imobilisasi selama 30 menit mengalami degranulasi sel mast kulit sebanyak 40.7 ± 1.9 %. Mekanisme terjadinya degranulasi tersebut diperkirakan karena stres diketahui dapat menyebabkan degranulasi 70% dari sel mast intracranial tikus yang diberikan stress berupa *restrain* selama 30 menit.

Mekanisme terjadinya hal tersebut diperkirakan oleh karena peran CRH (*Corticotropin-releasing Hormone*). Pada penelitian yang sama, pemberian anti-CRH serum sebelum pemaparan stres dapat menyebabkan penurunan persentasi degranulasi sel mast.(Singh, Pang, Alexacos, Letourneau, & Theorharides,1999).

Stres juga dapat menyebabkan aktivasi sel mast otak yang menyebabkan peningkatan permeabilitas dari sawar darah otak akibat adanya kinerja dari CRH dan substansi P. (Esposito et al., 2001) Hal tersebut juga didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Daeng et al pada tahun 2015 yang menyatakan bahwa tikus yang diberikan stres psikologis menggunakan psychological stress device (PSD)

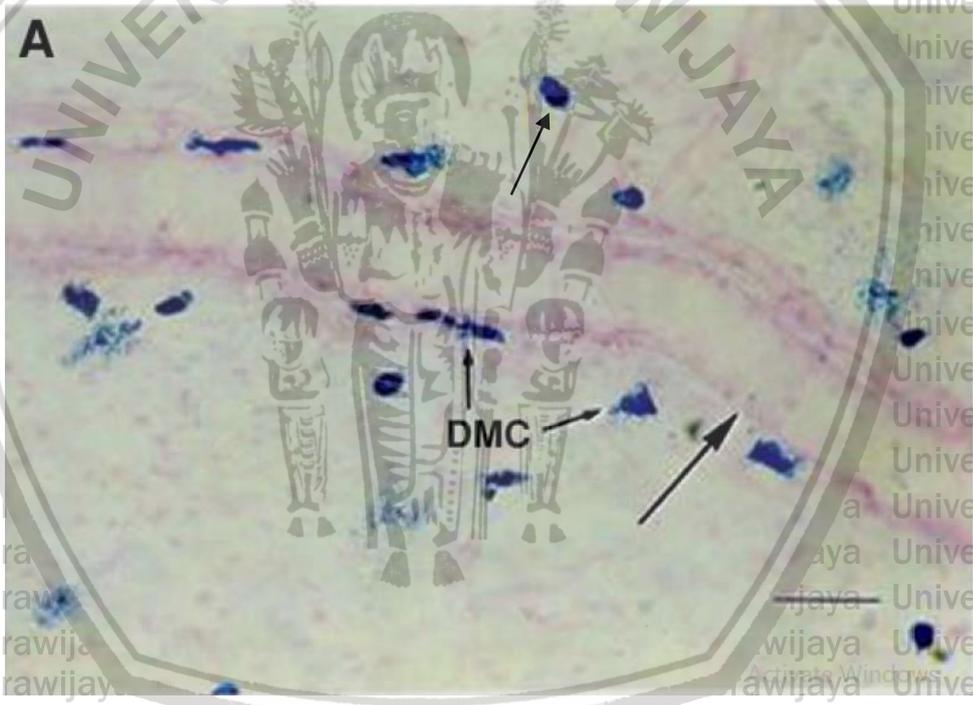
mengalami kenaikan CRH yang signifikan pada talamus otak tikus tersebut dimana kenaikan CRH pada talamus berkaitan dengan durasi pemberian stres pada tikus. Dalam kaitannya dengan sel mast otak, penelitian tersebut menyatakan bahwa terdapat tren jumlah sel mast pada talamus meningkat sebanding dengan meningkatnya durasi paparan stres pada tikus (Daeng, Paundralingga, & Widodo, 2016). Ada beberapa hal yang dapat mencetuskan stres pada tikus, misalnya stres fisik dan stres psikologis (imobilisasi, berenang, dan ketakutan) yang menyebabkan aktivasi pada beberapa bagian otak. Hal lain yang dapat mengakibatkan stres adalah stres suara (audiogenik). Penelitian yang dilakukan oleh Watson & Campeau menyatakan bahwa tikus yang diberi paparan stres audiogenik berupa *white noise* menimbulkan dihasilkannya kortikosteron pada plasma (Campeau & Watson, 1997).

2.2. Sel Mast Otak

Sel mast merupakan sel imun jaringan yang dinamai oleh Paul Ehrlich pada tahun 1887 karena sel tersebut mengandung banyak metachromatic granules yang mirip dengan "*well-fed cell*" yang dalam bahasa Jerman disebut "*Mastzellen*" (Krishnaswamy et al., 2005). Peran sel mast sering diasosiasikan dengan reaksi alergi dan anafilaksis, serta perannya pada *acquired* dan *innate immunity* (Theoharides, 2002). Sel mast ditemukan sebagai sel residen pada jaringan-jaringan di seluruh tubuh, khususnya dengan struktur tertentu seperti pembuluh darah, saraf serta struktur yang berhadapan dengan lingkungan eksternal atau beresiko (da Silva et al., 2014).

Sel mast ditemukan pada otak mamalia dan aves (Silver et al., 1996). Sel mast otak dapat diidentifikasi secara morfologis menggunakan pewarnaan *toluidine blue*, *histamine fluorescence* menggunakan *o-phthaldialdehyde* serta *histamine immunohistochemistry* (Pang et al., 1996). Pada pewarnaan *toluidine*

blue sel mast terdegranulasi melepaskan *biogenic amine granule* seperti granul histamin yang tercat biru, dan pada fase ini bada sel juga tercat warna biru. Pada sel mast yang intak secara histologis tercat warna biru, namun tidak menunjukkan gambaran granul bebas. Sel mast yang terdegranulasi secara ekstensif hanya menunjukkan gambaran *thin rim* yang berwarna biru pada bagian luar, dan beberapa menunjukkan gambaran tercat merah yang menunjukkan adanya proteoglycan dan heparin. Menggunakan metode ini, sel mast dapat diklasifikasikan menjadi intak, terdegranulasi sedang dan terdegranulasi ekstensif, serta konstituen granul dapat di karakteristikkan seperti pada gambar 2.1 (Baldwin, 2005).



Gambar 2.1 Gambaran Histologis Sel Mast yang mengalami Degranulasi dan Tidak. (Baldwin, 2005)

Distribusi sel mast otak pada setiap mamalia memiliki perbedaan yang dapat dilihat di tabel 2.1.

Tabel 2.1 Distribusi Sel Mast Berdasarkan Spesies (Khalil et al., 2007; Silver & Curley, 2013)

Spesies	Distribusi sel mast otak
Rat/tikus	Sel mast menginfiltrasi parenkim otak termasuk talamus, hipokampus, dan secara kurang ekstensif di hipotalamus. Sel mast otak berkumpul terbanyak pada talamus. Perkiraan jumlah tertinggi sel mast otak 35.000-45.000 sel, pada penelitian lain didapatkan 1.566 sel di talamus
Mouse/mencit	Sel mast pada umumnya terletak di meningen di sisi otak pada BBB, serta hipokampus dan thalamus. Jumlah sel mast intrakranial pada mencit tergantung pada strain mencit, namun jumlah tertinggi diperkirakan kurang lebih 600 sel.
Manusia	Terbanyak pada remaja dengan usia dibawah 19 tahun, terbanyak ditemukan di pituitary stalk, glandula pinealis, area postrema, pleksus koroid, area sekitar ventrikel ke-3, hipotalamus dan talamus. Belum ada penelitian yang mewakili jumlah sel mast di otak manusia.

Thalamus diketahui memiliki distribusi sel mast yang tinggi dan memiliki peran penting dalam kaitannya dengan tidur dan siklus sikardian untuk *sleep hygiene*. Thalamus memiliki peran penting dalam memproses, mengintegrasikan, dan menghubungkan informasi sensorik dan motorik. Jaras dua arah *thalamocortical* (TC) memodulasi aliran informasi sensorik dan motorik dari dan menuju korteks serebral, dimana proyeksi daripada TC terdiri dari relai eksitatorik dan neuron inhibitorik yaitu *thalamic GABAergic inhibitory reticular* (RE) yang

berperan dalam menginisiasi, menjaga, dan memodulasi fase tidur awal NREM menjadi fase tidur yang lebih dalam. (Jan et al., 2009.)

Fungsi sel mast otak berbeda dari sel mast pada umumnya. Otak tidak dapat mengalami reaksi alergi karena IgE tidak bisa melalui *blood brain barrier* (BBB) (Theoharides, 2002). Lokasi sel mast yang terletak di hippocampus dan sekitarnya, regio yang diketahui berperan dalam mediasi emosi dan kognisi mengindikasikan perannya dalam mekanisme stress. (Nautiyal & Silver, 2010). Sel mast otak berperan penting dalam menyumbang serotonin dan histamin yang merupakan neurotransmitter sistem saraf pusat (Ringvall et al., 2008; Nautiyal 2011).

Sel mast dapat mensintesis dan mensekresikan serotonin dan histamin dengan sendirinya (Ringvall et al., 2008). Pada penelitian Nautiyal bersama koleganya, tikus hasil rekayasa genetika yang tidak memiliki sel mast memiliki volume hipokampus yang ukurannya lebih kecil 12.9% dan memiliki tingkah laku cemas dibanding tikus kontrol. Namun hal ini dapat dikembalikan normal dengan pemberian *selective serotonin reuptake inhibitor* (SSRI) jangka panjang (Nautiyal et al., 2012; Silver & Curley, 2013). Hal tersebut bila dikaitkan dengan pernyataan bahwa serotonin mendukung *hippocampal neurogenesis* mengindikasikan bahwa peran sel mast berperan besar dalam menjaga homeostasis serotonin di hippocampus (Gould, 1999). Histamin dan serotonin yang diproduksi sel mast otak berperan penting dalam regulasi tidur dan tingkah laku (Chikahisa et al., 2013; Portas et al., 2000).

Selain oleh sel mast di otak, histamin juga diproduksi oleh *histamine cells* yang terletak di bagian posterior basal dari hipotalamus. Sel-sel ini memiliki proyeksi yang ekstensif pada aksis neural yang analog dengan sistem norepinefrin dan sistem 5-HT. Reseptor histamin pada sistem saraf pusat (SSP) terdiri atas reseptor H₁, H₂ dan H₃. Aktivasi reseptor H₁ berperan pada *arousal system*,

reseptor H₂ berperan dalam fungsi kognitif, sedangkan reseptor H₃ berperan pada regulasi pelepasan histamin dan neuro inflamasi (Chikahisa et al., 2013). 5-HT cells, yang memproduksi serotonin, terletak pada 2 kelompok yaitu sistem kaudal di medula dan sistem rostral di otak tengah. Serotonin memiliki banyak reseptor, dimana setiap reseptor memiliki agonis dan antagonis yang berbeda, serta dihubungkan oleh *second mesengger* yang berbeda-beda sehingga tiap reseptor memiliki efek aktivasi yang berbeda (Nestler et al., 2009)

Jumlah sel mast otak dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti jenis kelamin, kadar hormon, aktivitas seks, usia, kondisi lingkungan, stres dan tingkah laku (Silver et al., 1996). Estradiol pada merpati betina dan testosterone pada merpati jantan dapat mengakibatkan peningkatan jumlah sel mast di habenula, sedangkan pada merpati yang sejak lama mengalami kastrasi, sel mast nyaris tidak ditemukan. Walau demikian, jumlah sel mast intrakranial pada merpati jantan dua kali lebih tinggi dari merpati betina pada semua tahap reproduktif (Wilhelm et al., 2000).

Stres dapat memiliki efek yang bervariasi pada sel mast otak (Nautiyal, 2011). Stres kronik yang berbeda dapat memiliki efek yang berbeda pada sel mast otak. Stres subordinasi kronis dapat meningkatkan jumlah sel mast otak, sedangkan stres isolasi sosial kronik dapat menurunkan jumlah sel mast otak (Cirulli et al., 1998; Bugajski et al., 1994). Pada stres akut, tidak terjadi peningkatan jumlah sel mast di otak, namun terjadi aktivasi sel mast (Daeng et al., 2016; Cirulli et al., 1998).

CRH diketahui memiliki pengaruh terbesar dalam aktivasi sel mast otak pada respon stres akut. Tikus yang diberi *anti-CRH polyclonal serum* sebelum diinduksi stres akut akan memiliki persentase aktivasi sel mast lebih rendah 50% dibanding tikus kontrol yang tidak diinduksi stres sama sekali (Theoharides et al., 1995).

CRH diketahui juga dapat meningkatkan ekspresi reseptor neurotensin pada sel

mast dan sebaliknya, neurotensin dapat meningkatkan ekspresi reseptor CRH, dimana keduanya dapat mengakibatkan sensitisasi sel mast (Alysandratos et al., 2012).

Dalam banyak patofisiologi penyakit neuronal, sel mast otak memiliki peran penting. Aktivasi sel mast saat perinatal baik oleh stres, infeksi, lingkungan dan alergen dapat mengakibatkan pelepasan molekul pro-inflamasi dan neurotoksik yang berperan pada inflamasi otak dan kelainan-kelainan pada spektrum autisme (Theoharides et al., 2012; Skaper et al., 2014). Mediator yang dilepaskan oleh sel mast otak juga dapat mempengaruhi permeabilitas BBB, tingkah laku, neurogenesis hipokampus, proses belajar yang bergantung pada hipokampus, *recruitment* neutrofil ke otak saat inflamasi, dan memiliki efek neuroprotektif (Silver & Curley, 2013).

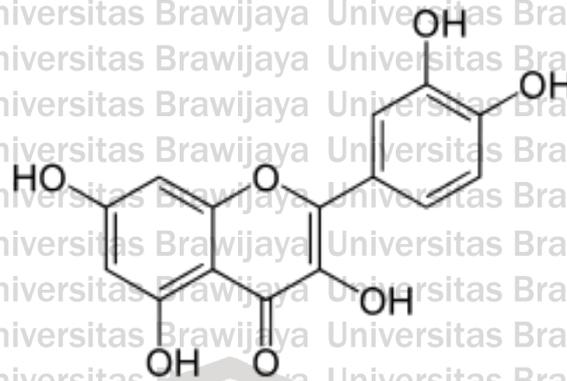
2.3. Histamin

Histamin adalah suatu senyawa hasil dekarboksilasi dari asam amino Histidin oleh enzim *L-histidine decarboxylase*. Histamin di otak mempunyai dua sumber utama yaitu neuron histaminergik, dan sel Mast otak. Histamin yang berasal dari sistem histaminergik otak, yang secara eksklusif terdapat di *tuberomamillary nucleus* dan hipotalamus posterior, mengirimkan impuls ke beberapa regio otak yang terlibat dalam siklus tidur-terjaga seperti korteks otak, talamus, preoptikal dan hipotalamus anterior, batang otak, dan struktur kolinerjik dan monoaminergik pada otak depan (Blandina, Munari, Provensi, & Passani, 2012; Green, 1978; Parsons & Ganellin, 2006). Sedangkan histamin yang berasal dari sel Mast otak dipicu dari adanya suatu kondisi stres. Stres dapat menyebabkan terjadinya peningkatan degranulasi sel Mast otak, dan hasil dari degranulasi sel Mast ini adalah pengeluaran histamin ke ekstrasel (Westerink et al., 2002).

Histamin di otak akan berikatan dengan reseptornya (*H1 receptor*), dan akan mengakibatkan respon terjaga. Melalui sistem histaminergik otak, siklus tidur-terjaga itu diatur. Ketika ada penambahan histamin yang berasal dari degranulasi sel Mast otak sebagai akibat dari respon stres, maka sistem tidur-terjaga itu akan terganggu (Blandina, Munari, Provensi, & Passani, 2012; Lin, Sergeeva, & Haas, 2011; Parsons & Ganellin, 2006) Selain itu, kadar histamin yang terlalu tinggi dalam jangka waktu lama juga berakibat terjadinya ansietas (Chikahisa et al., 2013). Pada peranannya terhadap reseptor histamin yang lain seperti reseptor H2, aktivasi akan berpengaruh terhadap fungsi kognitif seperti tingkah laku dan proses belajar yang bergantung pada hipokampus. Pada reseptor H3, aktivasi ini berperan dalam proses neuro inflamasi yang dapat mempengaruhi permeabilitas BBB, rekrutmen neutrofil ke otak saat inflamasi, dan memiliki efek neuroprotektif (Silver & Curley, 2013).

2.4 Quercetin

Quercetin merupakan satu dari 4000 fenolik tanaman yang isolasi dan identifikasi biologinya pertama kali dilakukan oleh Szent-Gyorgyi pada tahun 1936. Quercetin merupakan salah satu senyawa organik yang termasuk ke dalam golongan substansi flavonoid. Quercetin memiliki rumus kimia $C_{15}H_{10}O_7$ dan nama IUPAC 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4Hchromen-4-one (Dajas et al., 2015).



Gambar 2.2 Quercetin

Quercetin diketahui dapat menghambat keluarnya mediator inflamasi seperti histamin, prostaglandin D2 (PGD2), dan leukotrien. Pada penelitian yang dilakukan oleh Weng, et al. ditemukan bahwa preinkubasi *human cord blood-derived cultured mast cell* (HCBMCs) dengan quercetin atau WSQ (*Water-soluble quercetin*) dapat menurunkan pengeluaran histamin sebesar 82% inhibisi dan 87% inhibisi. Penelitian yang sama juga menyatakan bahwa quercetin dan WSQ menghambat pengeluaran PGD2 sebesar 77% dan 81%. Quercetin dan WSQ menghambat pengeluaran leukotrien oleh sel mast sebesar 99% dan 99%. Pada penelitian lain yang meneliti tentang hubungan sel mast dengan dermatitis kontak, ditemukan bahwa patch test nikel pada 10 orang menimbulkan dermatitis yang bervariasi yaitu antara 1+ hingga 3+ pada 48 jam dan 120 jam setelah pemberian *patch*. Pemberian WSQ (2g/hari dalam 3 hari) sebelum kontak dengan nikel mengurangi reaksi dermatitis sebesar lebih dari 50% pada 8 dari 10 pasien dan 100 % pada 2 pasien (Weng et al., 2012). Quercetin dapat menghambat pengeluaran mediator inflamasi diduga karena quercetin menghambat p38 MAPK dan Nf-kB dimana kedua hal tersebut berperan penting dalam regulasi molekul-molekul pro inflamasi dalam respon seluler. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Min et, al. pada tahun 2007 yang menyatakan bahwa pemberian

quercetin mengurangi ekspresi gen dan produksi dari sitokin pro inflamasi. (Min et al., 2007). Jika dilihat hubungannya dengan mekanisme degranulasi, quercetin diketahui dapat menghambat tirosin kinase dan protein kinase lain yang mungkin berpengaruh terhadap degranulasi sel mast. (Davies, Reddy, Caivano, & Cohen, 2000). Penelitian lain juga diketahui menghambat PKC yang diketahui berperan dalam mekanisme degranulasi sel mast (Agullo et al., 1997; Ferriola, Cody, & Middleton, 1989). Selain itu, Quercetin juga diketahui dapat melintasi sawar darah otak dan bahkan memiliki efek proteksi terhadap sistem saraf pusat (Dajas et al., 2015).

2.5. Mengkudu

Mengkudu atau *Morinda citrifolia* adalah sebuah pohon hijau kecil yang berbuah dan berbunga sepanjang tahun. Mengkudu tergolong dalam kelompok famili *Rubiaceae*, dan banyak tumbuh pada daerah-daerah tropis. Mengkudu diketahui sangat bermanfaat bagi manusia, bahkan diberi predikat sebagai “*the biggest pharmaceutical unit in the universe*” karena mempunyai lebih dari 150 *nutraceuticals* (makanan yang mempunyai kandungan kesehatan), beberapa vitamin, mineral, mikro dan makronutrien yang menolong tubuh kita mulai dari tingkat sel hingga tingkat organ (Singh, 2007).

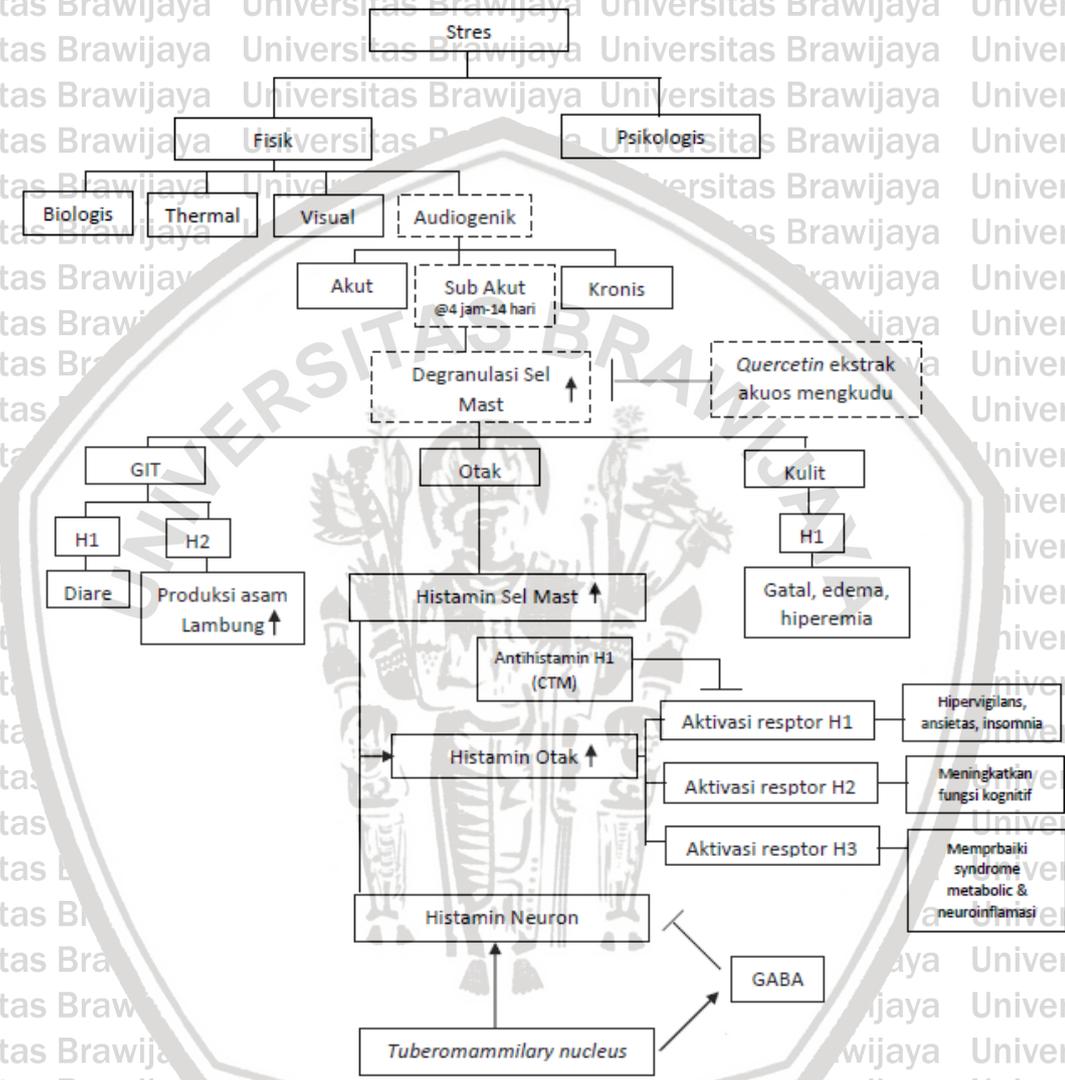
Buah *Morinda citrifolia* ini banyak dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Jus buahnya banyak dimanfaatkan untuk mengatasi beberapa penyakit seperti artritis, diabetes, hipertensi, nyeri otot, sakit kepala, bahkan juga diketahui dapat mengatasi masalah depresi mental. Selain itu, *Morinda citrifolia* ini juga diyakini memiliki efek antibakterial, anti jamur, analgesik, serta efek penguatan imun. Dan salah satu zat yang terkandung dalam *Morinda citrifolia* ini adalah *quercetin*.

Kandungan *quercetin* pada *Morinda citrifolia* adalah sekitar 0.21-0.75 g/100 g daging buahnya (Activity & Phenolics, 2007; Singh, 2007).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konsep



Keterangan:

- Tahapan
- Menghambat
- Kerangka konsep
- ⋮ Variabel yang diteliti

Stres subakut dapat meningkatkan aktivasi sel mast melalui *corticotropin releasing hormone* (CRH) yang dihasilkan baik oleh sel mast yang telah teraktivasi

itu sendiri dan sistem *hypothalamus-pituitary adrenal* (HPA axis) sebagai respon terhadap stress yang apabila CRH menempel pada reseptor sel mast, akan meningkatkan jumlah dan degranulasi sel mast yang selanjutnya menghasilkan histamin. Pada otak, hal ini akan meningkatkan kadar histamin di otak, dimana kadar histamin otak yang tinggi melalui peran reseptor H1 yang teraktivasi akan menghasilkan suatu kondisi terjaga. Histamin di otak selain berasal dari degranulasi sel mast, juga berasal dari histamin neuron. Histamin neuron bekerja sama dengan GABA, suatu neurotransmitter inhibitor berfungsi untuk mengatur siklus tidur-terjaga. Ketika histamin neuron naik, manusia akan diprogram untuk terjaga. Sedangkan pada saat GABA dikeluarkan untuk menghambat kerja histamin, maka manusia akan diprogram untuk tertidur. Histamin di otak yang berasal dari sel mast, tidak memiliki mekanisme kontrol seperti pada histamin neuron, sehingga kadarnya dapat menjadi terlalu tinggi. *Quercetin* diketahui dapat menghambat degranulasi sel mast melalui hambatan pada reseptor tirosin kinase dan PKC di sel mast, serta diketahui dapat melewati sawar darah otak. Pemberian ekstrak akuos mengkudu yang mengandung *Quercetin* dapat menghambat proses degranulasi sel mast. Akibatnya, histamin sel mast turun, histamin otak pun turun kembali ke kadar normalnya, sehingga manusia terstimulasi untuk tertidur sesuai dengan siklus tidur normal manusia tersebut (yang diatur dalam regulasi histamin neuron-GABA).

3.2. Hipotesis Penelitian

Pemberian ekstrak akuos buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) dapat menurunkan persentase degranulasi sel mast di talamus tikus wistar.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimen murni (*true experimental design*) secara *in vivo* dengan randomized *post-test only controlled group design* menggunakan hewan coba berupa tikus. Tiga puluh ekor tikus strain Wistar jantan dilakukan aklimatisasi selama 3 hari dengan siklus gelap terang masing-masing 12 jam setiap harinya. Tikus kemudian dibagi menjadi 5 kelompok secara randomisasi. Masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1 (injeksi intraperitoneal antihistamin), perlakuan 2 (injeksi intraperitoneal quercetin dihidrat) dan perlakuan 3 (injeksi intraperitoneal ekstrak akueus mengkudu). Semua kelompok selain kelompok kontrol negatif diberikan diinduksi stres audiogenik subakut berupa suara *white-noise* dengan intensitas 80dB selama 4 jam per hari pada siklus gelap selama 14 hari (Samson, Sheeladevi, Ravindran, & Senthilvelan, 2007). Setelah diinduksi stres dan diberi perlakuan, tikus dikorbankan untuk dilakukan pembedahan. Proses pembedahan akan mengambil otak tikus untuk dibuat preparat histologi dengan pewarnaan toluidine blue. Preparat selanjutnya dilihat di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x untuk diidentifikasi serta dihitung secara manual jumlah sel mast yang mengalami degranulasi dan yang tidak mengalami degranulasi pada talamus tikus yang dilakukan di Laboratorium Anatomi Histologi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2. Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini menggunakan *Rattus norvegicus* strain Wistar jantan dengan usia 4 bulan dan berat 180-250 gram. Tikus strain Wistar merupakan tikus yang sering digunakan untuk mempelajari sel mast otak dan fisiologi stres (Nishioka et al., 1993; Silverman, Sutherland, Wilhelm, & Silver, 2000; Strbian, Karjalainen-Lindsberg, Kovanen, Tatlisumak, & Lindsberg, 2007; Theoharides et al., 2008).

4.2.2 Sampel Penelitian

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

- Tikus jantan strain wistar usia 4 bulan tanpa kelainan anatomis
- Sehat selama masa aklimatisasi yang berlangsung 3 hari

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

- Tikus memiliki kelainan anatomis dan perkembangan
- Mati selama masa aklimatisasi dan perlakuan

4.2.2.3 Perolehan Sampel

Teknik randomisasi digunakan untuk pemilihan sampel dari populasi, karena teknik ini dapat meminimalisir bias. Jumlah minimal sampel yang diperlukan dihitung menggunakan rumus sampel pada studi menggunakan hewan coba, yaitu $E = \text{Jumlah total sampel} - \text{Jumlah kelompok perlakuan}$, dengan E merupakan derajat kebebasan dari analisis varian (ANOVA) yang harus bernilai $10 \leq E \leq 20$ (Charan & Kantharia, 2013). Pada penelitian ini jumlah kelompok perlakuan adalah 5 dan nilai E ditetapkan sebagai 20, sehingga didapatkan jumlah total sampel sebagai berikut:

$$E = \text{Jumlah total sampel} - \text{Jumlah kelompok perlakuan}$$

$$20 = \text{Jumlah total sampel} - 5$$

$$\text{Jumlah total sampel} = 20 + 5 = 25$$

$$\text{jumlah sampel tiap kelompok} = \frac{\text{Jumlah total sampel}}{\text{Jumlah kelompok perlakuan}}$$

$$\text{Maka, jumlah sampel tiap kelompok} = \frac{25}{5} = 5$$

jumlah sampel minimal yang dibutuhkan adalah 5 tikus per kelompok perlakuan.

Akan tetapi diperkirakan akan terjadi *drop out* pada hewan coba sehingga diberi

jumlah yang lebih satu ekor pada tiap kelompok perlakuan. Pada penelitian ini,

jumlah total sampel yang dibutuhkan adalah sebanyak 30 tikus.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

- Kontrol negatif : tikus yang tidak diinduksi stres audiogenik subakut
- Kontrol positif : tikus yang diinduksi stres audiogenik subakut
- Kelompok perlakuan 1: tikus yang diinduksi stres audiogenik subakut dan mendapat injeksi antihistamin 4mg/kgBB secara intraperitoneal
- Kelompok perlakuan 2: tikus yang diinduksi stres audiogenik subakut dan mendapatkan injeksi quercetin dihidrat 10mg/kgBB secara intraperitoneal
- Kelompok perlakuan 3: tikus yang diinduksi stres audiogenik subakut dan mendapatkan injeksi ekstrak akuos mengkudu 500mg/kgBB secara intraperitoneal.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah persentase sel mast yang mengalami degranulasi.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Anatomi Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, pada bulan April hingga Juli tahun 2017

4.5 Definisi Operasional

- *Rattus norvegicus* strain Wistar yang digunakan berbulu putih, memiliki jenis kelamin jantan dengan usia 4 bulan dan berat badan 180-250 gram.
- Stres audiogenik subakut diberikan berupa suara *white-noise* dengan intensitas 80dB diberikan selama 4 jam per hari selama 14 hari (Samson et al., 2007).
- Buah mengkudu diperoleh dari Materia Medika Batu. Buah mengkudu dibersihkan kemudian direbus dalam air dan dihancurkan, selanjutnya dikeringkan menggunakan oven dan dijadikan bentuk bubuk. Semua proses dilakukan di Materia Medika Batu.
- Untuk mewakili populasi sel mast, diambil 2 sisi irisan otak, dimana sisi A terdiri dari 3 potongan homogen pada bagian central ke anterior otak dan sisi B terdiri dari 3 potongan homogen pada bagian central ke posterior otak dari lokasi yang diperkirakan sama untuk setiap tikus.
- Penghitungan sel mast otak dilakukan secara manual menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x pada talamus tikus yang kemudian akan dibedakan yang mengalami degranulasi dan tidak
- Untuk mengetahui dan membandingkan pengaruh pemberian perlakuan terhadap aktivasi sel mast, dihitung persentase sel mast otak yang mengalami degranulasi.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan Tikus

Pada pemeliharaan tikus diperlukan kandang pemeliharaan tikus dengan tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, dan pakan standar tikus.

4.6.2 Alat dan Bahan Sanitasi dan Higienisasi

Alat dan bahan yang digunakan adalah tempat cuci tangan, jas laboratorium, masker, handscoen, alkohol 70%, kapas, dan sabun antiseptik.

4.6.3 Alat dan Bahan Ekstraksi Akuos Mengkudu

Alat yang digunakan adalah sebuah panci, mortar, blender, oven, alat pengaduk, dan *Whatmann No.1 filter paper*. Untuk bahan yang digunakan adalah buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) yang diperoleh dari Materia Medika Batu dan akuades.

4.6.4 Alat dan Bahan Induksi Stres Tikus

Alat yang digunakan dalam menginduksi stres berupa speaker yang diatur dengan intensitas 80dB yang mengeluarkan *white-noise* (Campeau & Watson, 1997) dengan timer steker mekanik.

4.6.5 Alat dan Bahan Pengambilan Otak Tikus dan Pembuatan Preparat

Untuk prosedur pengambilan otak tikus dibutuhkan gunting bedah, pot specimen, alas bedah, scalpel, dan formalin 10%.

4.6.6 Alat dan Bahan Pembuatan Preparat Histologi

Alat dan bahan yang digunakan adalah object glass poly-L-lisine, cover glass, wadah, parafin cair, paraffin blok, alkohol dengan konsentrasi 96%, pewarna *toluidine blue*, *xylene*, air, *rotary microtome*, dan *entellan*.

4.6.7 Alat dan Bahan Penghitungan Sel Mast Otak

Alat yang digunakan adalah mikroskop cahaya dan alat tulis.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Prosedur Pemeliharaan dan Seleksi Tikus

Setiap tikus ditimbang lalu dimasukkan ke dalam kandang yang telah diberi label. Tikus kemudian dipelihara selama 17 hari (3 hari aklimatisasi dan 14 hari perlakuan) dalam kandang plastik berukuran 30 cm x 20 cm x 13cm dengan alas sekam yang diganti setiap tiga hari dan diberi penutup anyaman kawat. Satu kandang berisi 1 tikus. Tikus diberi siklus terang-gelap masing-masing 12 jam, diberi makan dan minum yang cukup serta situasi yang minimal dari stresor lain.

4.7.2 Prosedur Ekstraksi Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*)

Buah mengkudu diperoleh dari Materia Medika Batu. Buah mengkudu dibersihkan kemudian direbus dalam air dan dihancurkan, selanjutnya dikeringkan menggunakan oven dan dijadikan bentuk bubuk. Semua proses dilakukan di Materia Medika Batu.

4.7.3 Prosedur Pemaparan Tikus Terhadap Alat Pemicu Stres Sub Akut

Tikus yang telah diaklimatisasi selama 3 hari akan dipapar dengan stress berupa suara *white-noise* dengan intensitas 80dB selama 4 jam per hari selama 14 hari (Samson et al., 2007). Akses ruangan dijaga dari stressor lainnya.

4.7.4 Prosedur Injeksi Perlakuan

Setiap harinya setelah tikus terpapar oleh stres audiogenik selama 4 jam, larutan perlakuan sesuai kelompok diinjeksikan secara intraperitoneal menggunakan *syringe* pada fase gelap. Dimana pada kelompok perlakuan 1 diberikan larutan antihistamin dengan dosis 4mg/kgBB (Buckle DR, Outred DJ, Smith H, 1984), pada kelompok perlakuan 2 diberikan larutan quercetin murni

dengan dosis 10mg/kgBB (Galindo et al., 2012), dan pada kelompok perlakuan 3 diberikan larutan ekstrak akuos mengkudu dengan dosis 500mg/kgBB (Kannan, Manickam, & Mohammed, 2014).

4.7.5 Prosedur Pembedahan

Setelah paparan stres audiogenik selama 14 hari beserta injeksi intraperitoneal larutan sesuai kelompok perlakuan, tikus dikorbankan dengan metode dislokasi servikal dan dibedah untuk diambil otaknya.

4.7.6 Prosedur Fiksasi Jaringan Otak

Jaringan yang telah diambil direndam dalam formalin 10% selama 18-24 jam.

4.7.7 Prosedur *Embedding* Jaringan Otak

Jaringan otak dimasukkan kedalam acetone selama 1 jam (dilakukan 4 kali dalam wadah yang berbeda). Kemudian, jaringan dimasukkan kedalam xylol selama 30 menit (dilakukan 4 kali dalam wadah yang berbeda). Selanjutnya jaringan otak dimasukkan kedalam paraffin cair selama 30 menit (dilakukan 4 kali dalam 4 wadah yang berbeda). Berikutnya, jaringan diletakkan ke dalam paraffin blok hingga membeku.

4.7.8 Prosedur Slicing Jaringan Otak

Jaringan otak yang berada di paraffin blok disayat menggunakan *rotary microtome* dengan ketebalan 4 mikron. Selanjutnya sayatan tersebut diletakkan dalam *water bath* (menggunakan air yang dipanaskan hingga suhu 30°C hingga merentang). Sayatan yang sudah merentang kemudian diambil menggunakan gelas objek poly-L-lisine dan diamkan selama 24 jam.

4.7.9 Prosedur Pewarnaan *Toluidine Blue*

Preparat dimasukkan pada xylol selama 15 menit (dilakukan 3 kali pada 3 tempat yang berbeda). Selanjutnya preparat dimasukkan kedalam alcohol 96% selama 15 menit (dilakukan 3 kali dalam 3 wadah yang berbeda). Kemudian, preparat dicuci dengan air yang mengalir selama 15 menit. Lalu, preparat ditetesi dengan pewarna *toluidine blue* selama 20 detik. Setelah itu, preparat dicuci menggunakan air mengalir selama 15 menit. Selanjutnya, preparat direndam dalam xylol selama 15 menit (dilakukan 3 kali dalam 3 wadah yang berbeda).

4.7.10 Prosedur Mounting Jaringan Otak

Preparat yang telah terwarna ditutup menggunakan *cover glass* menggunakan perekat *entellan*.

4.7.11 Prosedur Penghitungan Sel Mast Otak

Slide diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran objektif 40x dan okuler 10x. Talamus kemudian diidentifikasi dan dihitung serta dibedakan sel mast yang telah terdegranulasi dan yang masih intak. Dari pengamatan di bawah mikroskop, sel mast otak pada talamus dihitung jumlahnya yang mengalami degranulasi dan tidak kemudian dicatat menggunakan cara turus. Presentase degranulasi sel mast otak selanjutnya dihitung dengan membandingkan jumlah sel mast otak yang mengalami degranulasi dengan jumlah total sel mast otak dari hasil penghitungan turus dan dikalikan seratus persen. Dengan rumus sebagai berikut.

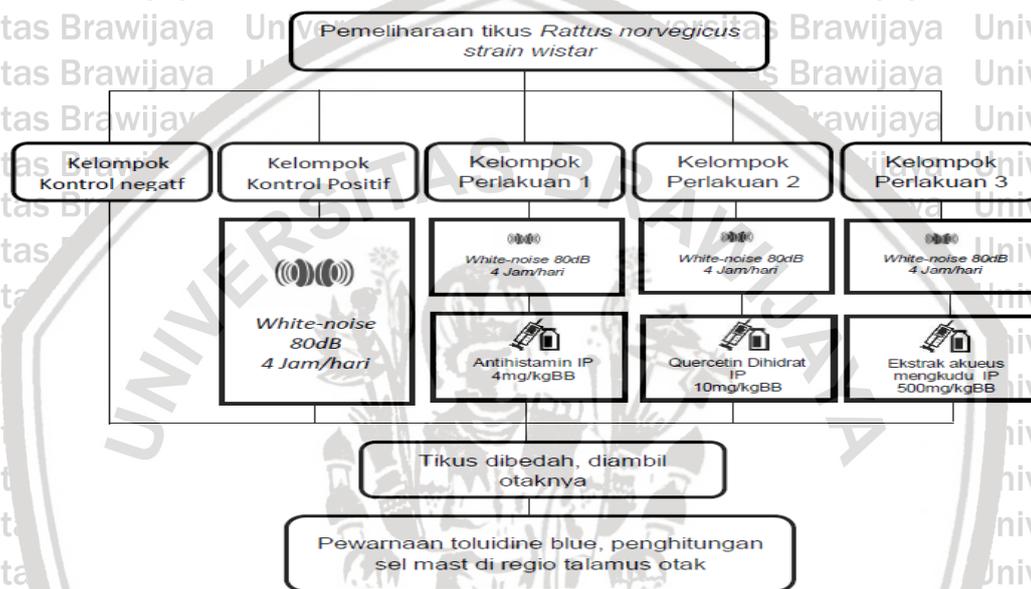
$$\frac{\text{Jumlah sel mast talamus tikus Wistar yang terdegranulasi}}{\text{Jumlah total sel mast talamus tikus Wistar}} \times 100\%$$

4.7.12 Prosedur Pengolahan Data

Data yang didapat berupa jumlah sel mast yang mengalami degranulasi dan tidak terdegranulasi dari talamus tikus, dikonversi menjadi persentase sel mast

yang mengalami degranulasi dan akan diasumsikan normalitas distribusi data dan homogenitas ragam datanya. Apabila data normal dan homogen maka akan dianalisis menggunakan uji hipotesis *one-way ANOVA*. Bila tidak normal atau tidak homogen, maka menggunakan uji hipotesis *Kruskall-Wallis*. Perbedaan yang signifikan didapatkan jika nilai ($p < 0,05$).

4.8 Bagan Alur Penelitian

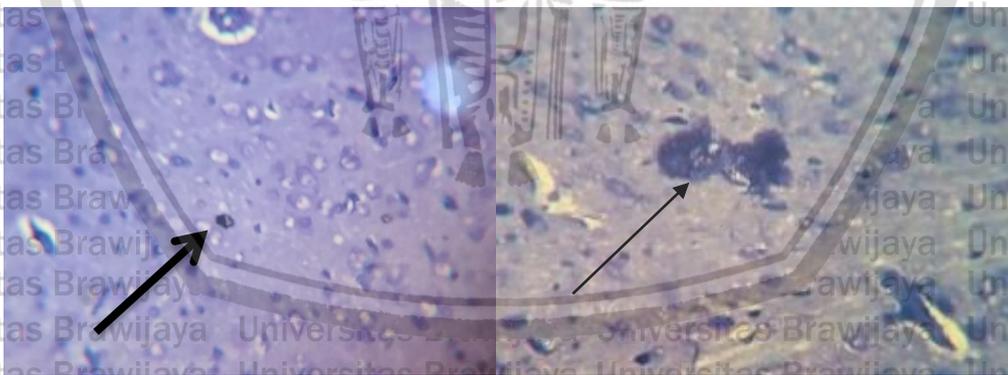


BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Hasil penelitian ini bertujuan untuk melihat apakah paparan ekstrak akuos mengkudu secara intraperitoneal dapat menurunkan persentase degranulasi sel mast pada regio talamus otak tikus (*Rattus norvegicus*) strain *Wistar* jantan yang berusia 4 bulan yang diinduksi stres audiogenik subakut. Pada kelompok yang diinduksi stres menggunakan *white noise* 80dB menunjukkan tanda-tanda stres subakut pada tikus yaitu *freezing*, defekasi, urinasi, piloreksi dan di dapatkan perubahan berat badan serta warna bulu putih yang berubah menguning seperti putih susu. Dari setiap otak tikus, didapatkan preparat histologi sejumlah 6 irisan. Setiap irisan diamati secara manual menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400x pada regio talamus, yang kemudian sel mast-nya dibedakan menjadi sel yang terdegranulasi dan yang tidak terdegranulasi seperti pada gambar 5.1.



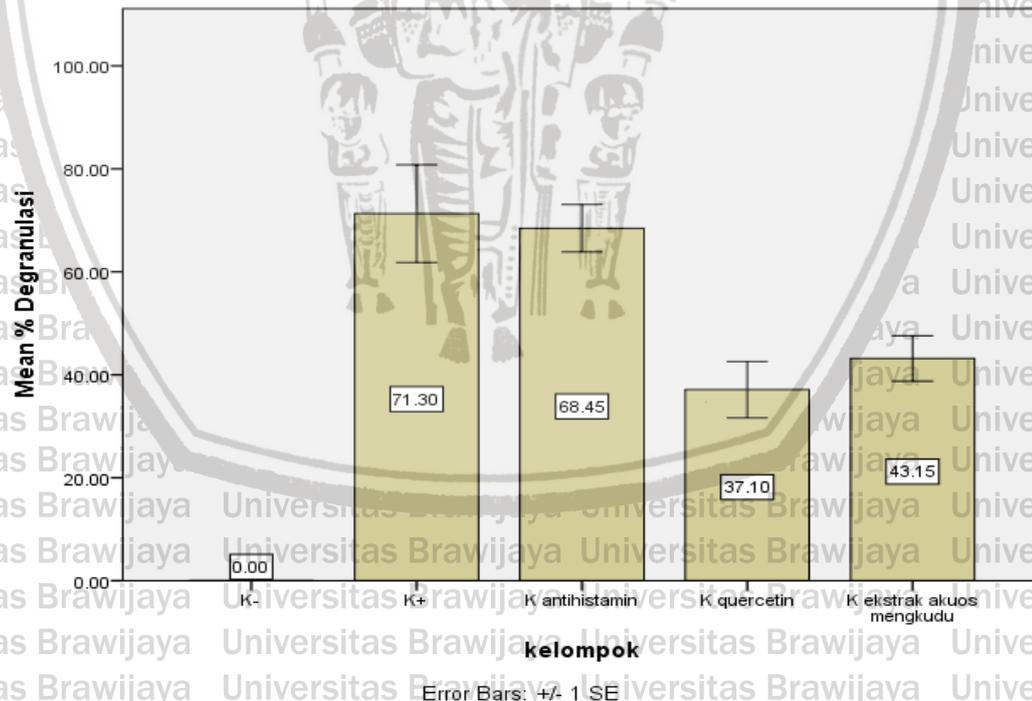
Gambar 5.1 Sel Mast yang Tidak Mengalami Degranulasi (Kiri) dan Sel Mast yang Sedang Mengalami Degranulasi (Kanan)

Data dari hasil pengamatan mikroskop tersebut selanjutnya dihitung untuk melihat persentase degranulasi sel mast. Pada Tabel 5.1, tersaji data persentase degranulasi di regio talamus yang didapatkan dari masing-masing kelompok

perlakuan tikus. Gambar 5.2 menunjukkan kurva persentase degranulasi sel mast talamus hasil penelitian berdasarkan Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Data Rerata Presentase Degranulasi Sel Mast Talamus Tikus (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar berusia 4 Bulan

Lokasi	Kelompok	Jumlah Tikus (N)	Total Sel Mast	Jumlah Sel Mast Terdegranulasi	Persentase Degranulasi (Mean \pm SD)
Talamus	Kontrol negatif	6	20	0	00,00 \pm 00,00%
	Kontrol positif	6	122	84	71,29 \pm 23,26%
	Perlakuan 1 (Antihistamin)	6	117	81	68,45 \pm 11,28%
	Perlakuan 2 (Quercetin dihidrat)	6	63	24	37,09 \pm 13,41%
	Perlakuan 3 (Ekstrak Akus Mengkudu)	6	38	16	43,15 \pm 10,81%



Gambar 5.2 Diagram Persentase Degranulasi Sel Mast Talamus Tikus (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar

5.2 Analisis Data

Data pada penelitian ini dianalisis dengan *software* SPSS versi 18 dan output analisis disertakan pada bagian lampiran.

5.2.1 Uji Asumsi Data

Sebelum data di atas dianalisis dengan uji statistik, data yang diperoleh perlu dilakukan pengujian asumsi data, yaitu uji normalitas distribusi data dan uji homogenitas data.

5.2.1.1 Uji Normalitas Distribusi Data

Pada penelitian ini, normalitas distribusi data diuji menggunakan uji *Shapiro-Wilk*, karena jumlah sampel yang digunakan sedikit (kurang dari 50 sampel) (Sopiyudin, 2013). Hasil uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan nilai signifikansi lebih dari α (0,05) yang berarti distribusi data dari masing-masing kelompok normal. Selanjutnya data di uji homogenitas ragam datanya.

5.2.1.2 Uji Homogenitas Ragam Data

Untuk mengetahui ada tidaknya heterogenitas ragam data, perlu dilakukan uji homogenitas ragam data menggunakan uji *Levene* (*Levene test homogeneity of variances*). Berdasarkan hasil uji *Levene*, didapatkan nilai signifikansi kedua data penelitian kurang dari α (0,05) yang menunjukkan bahwa data tidak homogen, dari hasil uji asumsi ini tidak memenuhi syarat untuk penggunaan analisis *One-way ANOVA* sehingga harus digunakan metode *Kruskall-Wallis* untuk menganalisis data.

5.2.2 Uji *Kruskall-Wallis*

5.2.2.1 Data Rerata Persentase Degranulasi Sel Mast

Tabel 5.2 Hasil Uji *Kruskall-Wallis* Data Rerata Persentase Degranulasi Sel Mast

Chi-square hitung	Signifikansi	Chi-square tabel	Kesimpulan
24,680	0,000	11,071	Signifikan

Berdasarkan hasil analisis *Kruskal-Wallis* yang tercantum pada table 5.2, diperoleh nilai chi-square hitung yang lebih besar dibandingkan chi-square table dan nilai signifikansi sebesar 0,00 ($\alpha < 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan rerata angka persentase degranulasi sel mast pada masing-masing perlakuan. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjutan menggunakan uji Mann-Whitney.

5.2.3 Uji Mann-Whitney

5.2.3.1 Data Rerata Persentase Degranulasi Sel Mast

Tabel 5.3 Hasil Uji Mann-Whitney Data Rerata Persentase Degranulasi Sel Mast

Kelompok	Rata-rata	Standart Deviasi	Notasi	Normalitas	Homogenitas
Kontrol negatif	0.00	0.000	a	-	a
Kontrol positif	71.29	23.260	b	0.439	
Kelompok perlakuan 1 (Antihistamin)	68.45	11.285	b	0.288	
Kelompok perlakuan 2 (Quercetin Dihidrat)	37.09	13.415	c	0.532	0.005
Kelompok perlakuan 3 (Ekstrak Akuos Mengkudu)	43.15	10.819	c	0.959	

Berdasarkan uji Mann-Whitney didapatkan nilai signifikansi $p < 0,05$.
Sehingga dapat disimpulkan bahwa:

- a. Kelompok kontrol negatif berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif, perlakuan 1 (Antihistamin), perlakuan 2 (Quercetin Dihidrat), dan perlakuan 3 (Ekstrak Akuos Mengkudu) (notasi a).
- b. Kelompok kontrol positif berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif, perlakuan 2 (Quercetin Dihidrat), dan perlakuan 3 (Ekstrak Akuos Mengkudu). Tetapi kelompok kontrol positif tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 2 (Antihistamin) (notasi b).
- c. Kelompok perlakuan 1 (Antihistamin) berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif, perlakuan 2 (Quercetin Dihidrat), dan perlakuan 3 (Ekstrak Akuos Mengkudu). Tetapi kelompok perlakuan 1 (Antihistamin) tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif (notasi b).
- d. Kelompok perlakuan 2 (Quercetin dihidrat) berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan perlakuan 1 (Antihistamin). Tetapi kelompok perlakuan 2 (Quercetin dihidrat) tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 3 (Ekstrak Akuos Mengkudu) (notasi c).
- e. Kelompok perlakuan 3 (Ekstrak Akuos Mengkudu) berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan perlakuan 1 (Antihistamine). Tetapi kelompok perlakuan 3 (Ekstrak Akuos Mengkudu) tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 2 (Quercetin Dihidrat) (notasi c).

BAB VI

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil analisa statistik *Kruskal-Wallis*, terdapat perbedaan rata-rata presentasi degranulasi sel mast pada talamus otak tikus antar kelompok perlakuan. Kelompok tikus yang diinduksi stres audiogenik (kelompok kontrol positif) dan kelompok tikus yang di berikan Antihistamin intraperitoneal (Kelompok Perlakuan 1) memiliki rata-rata persentase degranulasi sel mast yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang tidak mendapatkan stres (kelompok kontrol negatif), kelompok yang mendapat pemberian quercetin secara intraperitoneal (kelompok perlakuan 2), dan kelompok yang mendapat pemberian ekstrak akuos mengkudu intraperitoneal (kelompok perlakuan 3). Kelompok tikus yang mendapat pemberian quercetin intraperitoneal (kelompok perlakuan 2) dan kelompok yang mendapat pemberian ekstrak akuos mengkudu intraperitoneal (kelompok perlakuan 3) memiliki rata-rata persentase degranulasi sel mast lebih rendah dibandingkan dengan kelompok tikus yang tidak mendapat perlakuan tersebut.

Dari hasil diatas, menunjukkan bahwa stres audiogenik sub akut dengan menggunakan *white noise* 80dB selama 4 jam sehari untuk 14 hari (Samson, Sheeladevi, Ravindran, & Senthivelan, 2007) berhasil mempengaruhi aktivasi sel mast yang berdampak pada peningkatan jumlah sel mast dan menyebabkan sel mast tedegranulasi sehigga meningkatkan presentase degranulasi sel mast. Keadaan ini diduga terjadi diperantara *corticotropin releasing hormone* (CRH) yang dihasilkan oleh sel mast yang teraktivasi itu sendiri dan sistem aksis *hypothalamus-pituitary adrenal* (HPA axis) sebagai respon terhadap stres yang

akan menempel pada reseptor sel mast sehingga mengaktifasi dan menyebabkan degranulasi sel mast. (Kempuraj, Selvakumar, & Thangavel, 2017).

Pada kelompok perlakuan 2 (Quercetin dihidrat) dan kelompok perlakuan 3 (Ekstrak akuos mengkudu) didapatkan persentase degranulasi yang lebih rendah dan signifikan secara statistik dibandingkan dengan kelompok yang tidak mendapat perlakuan dan kelompok perlakuan 1 (antihistamin). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa quercetin dapat menyebabkan pencegahan degranulasi sel mast pada tubuh. (Weng et al., 2012).

Penelitian lain juga melaporkan bahwa quercetin menghambat pengeluaran histamin yang dimediasi oleh IgE. Quercetin dapat menghambat proses dari pengeluaran granul sel mast dengan menghambat reseptor yang berperan dalam kaskade degranulasi sel mast yaitu tirosin kinase dan PKC (Davies, Reddy, Caivano, & Cohen, 2000; Ferriola, Cody, & Middleton, 1989; Serysheva & Ludtke, 2010). Hal ini berbeda dengan mekanisme kerja antihistamin yang mengeblok reseptor histamin H1 namun tidak mencegah terjadinya pelepasan substansi atau degranulasi dari sel mast (Farmakologi FKUI Ed.6, 2007). Selain itu, quercetin juga diketahui menghambat produksi beberapa sitokin seperti TNF- α , IL-6, IL-8 pada kultur sel mast manusia. Quercetin menghambat ekspresi dari sitokin pro inflamasi dengan cara menghambat aktivasi p38 MAPK dan NF-kB. (Min et al., 2007).

Quercetin juga diketahui dapat menghambat proses degranulasi sel mast di daerah otak karena diketahui dapat melintasi sawar darah otak dan bahkan memiliki efek proteksi terhadap sistem saraf pusat (Dajas et al., 2015). Mengkudu atau *Morinda citrifolia* yang tergolong dalam kelompok famili *Rubiaceae* banyak tumbuh pada daerah-daerah tropis dan telah banyak dikenal di masyarakat sebagai tanaman obat. Mengkudu bahkan diberi predikat sebagai "*the biggest pharmaceutical unit in the universe*" karena mempunyai lebih dari 150 *nutraceuticals* (makanan yang mempunyai kandungan kesehatan), beberapa

vitamin, mineral, mikro dan makronutrien yang menolong tubuh kita mulai dari tingkat sel hingga tingkat organ (Singh, 2007). Salah satu zat yang terkandung dalam mengkudu atau *Morinda citrifolia* ini adalah quercetin, dimana buah mengkudu memiliki kandungan quercetin yang tinggi yaitu sekitar 0,21-0,75g/100g daging buahnya (Activity & Phenolics, 2007; Singh, 2007). Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Kannan et al. tahun 2014 juga menyebutkan bahwa ekstrak akuos mengkudu atau *Morinda citrifolia* memiliki efek sedatif hipnotik tetapi belum diketahui mekanismenya (Kannan, Manickam, & RajaMohammed, 2014). Dari hasil penelitian ini, diketahui bahwa pemberian quercetin intraperitoneal (perlakuan 2) dan pemberian ekstrak akuos mengkudu intraperitoneal (perlakuan 3) pada tikus yang diberi stres subakut memiliki pengaruh terhadap sel mast otak.

Ditemukannya fakta tentang penghambatan degranulasi sel mast otak tersebut membuka peluang penelitian tentang pengobatan penyakit yang berhubungan proses inflamasi sel mast otak misalnya migraine, alzheimer's dan lainnya. Selain itu, juga membuka peluang pemanfaatan ekstrak akuos mengkudu lebih luas lagi yaitu sebagai *stabilizer* sel mast otak karena *sodium cromoglycate*, obat yang sering digunakan sebagai *stabilizer* sel mast tidak dapat menembus sawar darah otak sehingga tidak dapat menimbulkan dampak pada sel mast otak dan penyakit yang berhubungan dengan inflamasi otak yang dimediasi oleh sel mast (Nautiyal, Ribeiro, Pfaff, & Silver, 2008).

Di dalam penelitian ini juga terdapat keterbatasan, sehingga diperlukan penelitian lanjutan untuk melengkapi kekurangan yang terdapat dalam penelitian ini. Pada penelitian ini, pengukuran suara dilakukan dengan menggunakan aplikasi di ruangan yang tidak dikhususkan untuk pengukuran intensitas suara. Di penelitian selanjutnya, sebaiknya pengukuran intensitas suara dilakukan menggunakan alat yang sesuai standar dan pengaturan ruangan yang sesuai standar.

BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan dengan memberikan paparan stres audiogenik subakut pada tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar menggunakan noise generator dengan suara white noise pada intensitas 80 dB yang diberikan selama 4 jam/hari untuk 14 hari pelaksanaan, didapatkan kesimpulan sebagai berikut:

1. Pemberian ekstrak akuos mengkudu (*Morinda citrifolia*) berpengaruh menurunkan persentase degranulasi sel mast otak pada talamus tikus Wistar yang diberi stres audiogenik sub akut.

7.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini, saran – saran yang dapat diambil untuk menyempurnakan penelitian yang telah dilakukan, yaitu sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian dengan pengukuran intensitas suara dengan menggunakan metode yang lebih terstandar.
2. Perlu dilakukan kualifikasi kandungan senyawa yang terdapat didalam ekstrak akuos mengkudu, yang kemungkinan dapat mempengaruhi sel mast otak seperti quercetin.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan metode farksinasi buah mengkudu dalam menghambat degranulasi sel mast otak.

DAFTAR PUSTAKA

- Activity, A., & Phenolics, T. (2007). AKTIVITAS ANTIOKSIDAN , KANDUNGAN FENOLIK TOTAL , (*Morinda citrifolia* L). *Agritech*, 27(4), 147–151.
- Alysandratos, K. et al., 2012. *Neurotensin and CRH Interactions Augment Human Mast Cell Activation*. PLoS ONE, 7(11), pp.1–9.
- Baldwin, A. L. (2005). Mast cell activation by stress. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 315(9), 349–360.
- Blandina, P., Munari, L., Provensi, G., & Passani, M. B. (2012). Histamine neurons in the tuberomamillary nucleus: a whole center or distinct subpopulations? *Frontiers in Systems Neuroscience*, 6(May), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2012.00033>
- Buckle DR, Outred DJ, Smith H, S. B. (1984). Chapter 2 (1) copy.pdf. *N-Benzylpiperazino Derivatives of 3-Nitro-4-Hydroxycoumarin with Histamine Antihistamine and Mast Cell Stabilizing Properties*, 73(4), 55–60.
- Bugajski, a J. et al., 1994. *Effect of isolation stress on brain mast cells and brain histamine levels in rats*. *Agents Actions*, 41, pp.C75–C76.
- Campeau, S., & Watson, S. J. (1997). Neuroendocrine and Behavioral Responses and Brain Pattern of c- fos Induction Associated with Audiogenic Stress, 9, 577–588.
- Charan, J., & Kantharia, N. D. (2013). How to calculate sample size in animal studies ?, 4(4). <https://doi.org/10.4103/0976-500X.119726>

Chikahisa, S., Kodama, T., Soya, A., Sagawa, Y., Ishimaru, Y., S??i, H., & Nishino,

S. (2013). Histamine from Brain Resident MAST Cells Promotes Wakefulness and Modulates Behavioral States. *PLoS ONE*, 8(10), 1–12.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078434>

Daeng, B. H., Paundralingga, O., & Widodo, A. (2016). MAST CELL IN AMYGDALAE , THALAMUS , HIPPOCAMPUS OF WISTAR RATS AND ITS CORRELATION WITH CORTICOTROPIN-RELEASING HORMONE (CRH) PLASMA LEVEL AND LENGTH, 17(June).

Dajas, F., Abin-Carriquiry, J. A., Arredondo, F., Blasina, F., Echeverry, C.,

Martínez, M., ... Vaamonde, L. (2015). Quercetin in brain diseases: Potential and limits. *Neurochemistry International*, 89, 140–148.

<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.07.002>

Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., & Cohen, P. (2000). protein kinase inhibitors, 105, 95–105.

Dhabhar, F. S. (2009). Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function : Implications for Immunoprotection and Immunopathology, 5135, 300–317. <https://doi.org/10.1159/000216188>

Dirjen Hortikultura Kementerian Pertanian. (2015). Statistik Produksi Hortikultura Tahun 2014. *Statistik Produksi 2014*, 286.

Esposito, P., Gheorghe, D., Kandere, K., Pang, X., Connolly, R., Jacobson, S., & Theoharides, T. C. (2001). Acute stress increases permeability of the blood–brain-barrier through activation of brain mast cells. *Brain Research*, 888(1), 117–127. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03026-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03026-2)

Ferriola, P. C., Cody, V., & Middleton, E. (1989). PROTEIN KINASE C INHIBITION

BY PLANT FLAVONOIDS, 38(10), 1617–1624.

Galindo, P., González-Manzano, S., Zarzuelo, M. J., Gómez-Guzmán, M.,

Quintela, A. M., González-Paramás, A., ... Jiménez, R. (2012). Different cardiovascular protective effects of quercetin administered orally or intraperitoneally in spontaneously hypertensive rats. *Food & Function*, 3(6), 643. <https://doi.org/10.1039/c2fo10268d>

Glaser, R. & Kiecolt-Glaser, J., 2005. *How stress damages immune system and health*. *Discovery medicine*, 5(26), pp.165–169.

Gould, E., 1999. *Serotonin and Hippocampal Neurogenesis*. *Neuropsychopharmacology*, 21(25), pp.46–51.

Green, M. (1978). Histamine in the central nervous system. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 21, 337–339. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2007>.

Haas, H. L., Sergeeva, O. A., & Selback, O. (2008). Histamine in the central nervous system. *Physiological Reviews*, 88(3), 1183–1241. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2007>.

Jan, J. E., Reiter, R. J. and Wasdell, M. B. (2009) 'The role of the thalamus in sleep, pineal melatonin production, and circadian rhythm sleep disorders', pp. 1–7. [doi: 10.1111/j.1600-079X.2008.00628.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2008.00628.x).

Kannan, S., Manickam, S., & Raja Mohammed, M. (2014). Anxiolytic, sedative, and hypnotic activities of aqueous extract of *Morinda citrifolia* fruit. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 5(2), 73. <https://doi.org/10.4103/0975-9476.131738>

Kempuraj, D., Selvakumar, G. P., & Thangavel, R. (2017). Mast Cell Activation in Brain Injury , Stress , and Post-traumatic Stress Disorder and Alzheimer ' s Disease Pathogenesis, 11(December), 1–15.

<https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00703>

Khalil, M. et al., 2007. *Brain mast cell relationship to neurovasculature during development*. Brain Research, 1171, pp.18–29.

Krishnaswamy, G., Ajitawi, O. & Chi, D.S., 2005. *Mast Cells: Method and Protocols*. Springer

Marković, V.M. et al., 2011. *Predictive modeling of the hypothalamic-pituitary adrenal (HPA) axis response to acute and chronic stress*. Endocrine journal, 58(10), pp.889–904.

Min, Y., Choi, C., Bark, H., Son, H., Park, H., Lee, S., ... Kim, S. (2007).

Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF- κ B and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line, 56, 210–215.

<https://doi.org/10.1007/s00011-007-6172-9>

Morilak, D. a. et al., 2005. *Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress*. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 29(8), pp.1214–1224.

Nautiyal, K.M., 2011. *Mast Cells Affect Brain Physiology and Behavior*. Columbia University

Nautiyal, K. M., Ribeiro, A. C., Pfaff, D. W., & Silver, R. (2008). Brain mast cells link the immune system to anxiety-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(46), 18053–

18057. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809479105>

Nautiyal, K.M. & Silver, R., 2010. *Mast cells influence hippocampal neurogenesis, emotionality and cognition. Brain, Behavior, and Immunity*, 24(08891591), p.S3.

Nestler, E.J., Hyman S.E., Malenka, R.C., 2009. *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience, Second Edition*. McGraw-Hill Companies, Inc.

Nishioka, T., Koichiro, I., Nakayama, T., Suemaru, S., Numata, Y., & Hashimoto, K. (1993). Effects of Ether-Laparotomy Stress on CRH Concentration Extrahypothalamic Tissues and Water Immersion-Restraint in the Hypothalamus, and Peripheral, 40(2), 213–220.

Padgett, D. a. & Glaser, R., 2003. *How stress influences the immune response. Trends in Immunology*, 24(8), pp.444–448.

Pang, X. et al., 1996. *Definitive Characterization of Rat Hypothalamic Mast Cells. Neuroscience*, 73(3), pp.889–902.

Parsons, M. E., & Ganellin, C. R. (2006). Histamine and its receptors, 127–135. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706440>

Portas, C.M., Bjorvatn, B. & Ursin, R., 2000. *Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies. Progress in neurobiology*, 60(1), pp.13–35.

Ringvall, M. et al., 2008. *Serotonin and histamine storage in mast cell secretory granules is dependent on serglycin proteoglycan. Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(4), pp.1020–1026.

Samson, J., Sheeladevi, R., Ravindran, R., & Senthilvelan, M. (2007). Stress response in rat brain after different durations of noise exposure.

Neuroscience Research, 57(1), 143–147.

<https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.09.019>

Schneiderman, N., Ironson, G. & Siegel, S.D., 2005. *Stress and Health: Psychological, Behavioral, and Biological Determinants*. Annual Review

Clinical Psychology, 1(1), pp.1–19.

Serysheva, I. I., & Ludtke, S. J. (2010). CHAPTER 8 3D Structure of IP 3

Receptor \$. *Structure and Function of Calcium Release Channels* (1st ed.,

Vol. 66). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S1063-5823\(10\)66008-5](https://doi.org/10.1016/S1063-5823(10)66008-5)

Da Silva, E.Z.M., Jamur, M.C. & Oliver, C., 2014. *Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell*.

Silver, R. et al., 1996. *Mast cells in the brain: evidence and functional significance*.

Trends in neurosciences.

Silver, R. & Curley, J.P., 2013. *Mast cells on the mind: new insights and opportunities*. *Trends in neurosciences*, 36(9), pp.513–21.

Silverman, A., Sutherland, A. K., Wilhelm, M., & Silver, R. (2000). Mast Cells Migrate from Blood to Brain, 20(1), 401–408.

Singh, L. K., Pang, X., Alexacos, N., Letourneau, R., & Theoharides, T. C. (1999).

Acute Immobilization Stress Triggers Skin Mast Cell Degranulation via Corticotropin Releasing Hormone, Neurotensin, and Substance P: A Link to

Neurogenic Skin Disorders, 239, 225–239.

Singh, K. (2007). Noni (*Morinda citrifolia* L.)- the Miracle Fruit-A Holistics Review.

International Journal of Noni Research, 2, 1–34.

Skaper, S.D., Facci, L. & Giusti, P., 2014. *Mast cells, glia and neuroinflammation:*

Partners in crime? Immunology, 141(3), pp.314–327.

Smith, S.M. & Vale, W.W., 2006. *The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress.* Dialogues in clinical neuroscience, 8(4), pp.383–395.

Stahl, S. M. (2008). Selective histamine H1 antagonism: novel hypnotic and pharmacologic actions challenge classical notions of antihistamines. *CNS Spectrums*, 13(12), 1027–38. <https://doi.org/10.1017/S1092852900017089>

Strbian, D., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Kovanen, P. T., Tatlisumak, T., & Lindsberg, P. J. (2007). Mast cell stabilization reduces hemorrhage formation and mortality after administration of thrombolytics in experimental ischemic stroke. *Circulation*, 116(4), 411–418. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655423>

Theoharides, T.C. et al., 2008. *Impact of stress and mast cells on brain metastases.* Journal of neuroimmunology, 205(1-2), pp.1–7.

Theoharides, T.C. et al., 2012. *Mast cell activation and autism.* Biochimica et biophysica acta, 1822(1), pp.34–41.

Theoharides, T.C., 2002. *Mast Cells and Stress — A Psychoneuroimmunological Perspective.* Journal of Clinical Psychopharmacology, 22(2).

Theoharides, T.C. et al., 1995. *Stress-Induced Intracranial Mast Cell Degranulation: A Corticotropin-Releasing Hormone-Mediated Effect.* The Endocrine Society, 136(12).

Thoo, Y. Y., Ho, S. K., Abas, F., Lai, O. M., Ho, C. W., & Tan, C. P. (2013). Optimal Binary Solvent Extraction System for Phenolic Antioxidants from Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Fruit, 7004–7022.

<https://doi.org/10.3390/molecules18067004>

Tiligada, E., Kyriakidis, K., Chazot, P. L., & Passani, M. B. (2011). Histamine pharmacology and new CNS drug targets. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 17(6), 620–628. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00212.x>

Valent, P. (2013). Mast cell activation syndromes: Definition and classification. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 68(4), 417–424. <https://doi.org/10.1111/all.12126>

Weng, Z., Zhang, B., Asadi, S., Sismanopoulos, N., Butcher, A., Fu, X., ... Theoharides, T. C. (2012). Quercetin is more effective than cromolyn in blocking human mast cell cytokine release and inhibits contact dermatitis and photosensitivity in humans. *PLoS ONE*, 7(3), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033805>

Westerink, B. H. C., Cremers, T. I. F. H., De Vries, J. B., Liefers, H., Tran, N., & De Boer, P. (2002). Evidence for activation of histamine H3 autoreceptors during handling stress in the prefrontal cortex of the rat. *Synapse*, 43(4), 238–243. <https://doi.org/10.1002/syn.10043>

Wilhelm, M. et al., 2000. *Gonadal steroids regulate the number and activation state of mast cells in the medial habenula*. *Endocrinology*, 141(3), pp.1178–86.

Yu, X., Ye, Z., Houston, C. M., Zecharia, A. Y., Ma, Y., Zhang, Z., ... Wisden, W.

(2015). Wakefulness Is Governed by GABA and Histamine Cotransmission.

Neuron, 87(1), 164–178. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.003>

