

repository.ub.ac.id

**PENGARUH TERAPI PREVENTIF EKSTRAK KULIT APEL
(*Malus sylvestris Mill*) VARIETAS *ROME BEAUTY* TERHADAP
AKTIVITAS PROTEASE DAN HISTOPATOLOGI JEJUNUM
TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI PLUMBUM
ASETAT**

SKRIPSI

Oleh:
TARSISIUS HANDARU CAHYO PUTRO
155130101111052



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

MALANG

2019



repository.ub.ac.id

**PENGARUH TERAPI PREVENTIF EKSTRAK KULIT APEL
(*Malus sylvestris Mill*) VARIETAS ROME BEAUTY TERHADAP
AKTIVITAS PROTEASE DAN HISTOPATOLOGI JEJUNUM
TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI PLUMBUM
ASETAT**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

**TARSISIUS HANDARU CAHYO PUTRO
155130101111052**



**PROGRAM STUDI DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2019

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH TERAPI PREVENTIF EKSTRAK KULIT APEL
(*Malus sylvestris Mill*) VARIETAS *ROME BEAUTY* TERHADAP
AKTIVITAS PROTEASE DAN HISTOPATOLOGI JEJUNUM
TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI PLUMBUM
ASETAT**

Oleh:

TARSISIUS HANDARU CAHYO PUTRO
155130101111052

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 19 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

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

drh. Analis Wisnu Wardhana, M.Biomed
NIP. 19800904 200812 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc
NIP. 19631216 198803 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Tarsisius Handaru Cahyo Putro

NIM : 155130101111052

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Terapi Preventif Ekstrak Kulit Apel (*Malus sylvestris Mill*)
Varietas *Rome Beauty* Terhadap Aktivitas Protease dan Histopatologi
Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Plumbum Asetat

Dengan ini menyatakan bahwa:

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

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 19 Juli 2019

Yang menyatakan,

(Tarsisius Handaru Cahyo Putro)

NIM. 155130101111052

**Pengaruh Terapi Preventif Ekstrak Kulit Apel (*Malus sylvestris Mill*)
Varietas *Rome Beauty* Terhadap Aktivitas Protease dan Histopatologi
Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Plumbum Asetat**

ABSTRAK

Plumbum merupakan bahan kimia yang berada di lingkungan sekitar dan termasuk salah satu kelompok logam berat yang dapat berbahaya bagi tubuh. Masuknya plumbum ke dalam tubuh dapat melalui saluran pernafasan, pencernaan, dan absorpsi melalui kulit. Akumulasi induksi plumbum terus menerus dapat meningkatkan kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam tubuh yang akan berdampak pada kerusakan organ terutama jejunum. Kerusakan jejunum dapat menyebabkan peningkatan aktivitas protease jejunum. Ekstrak kulit apel memiliki kandungan flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan dan mampu menetralkan radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh terapi preventif Ekstrak Kulit Apel terhadap aktivitas protease dan gambaran histopatologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi plumbum. Penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, yaitu kontrol negatif tanpa diberikan perlakuan, kontrol positif dengan pemberian Pb Asetat 10mg /ekor/hari selama 14 hari, dan kelompok terapi preventif dengan pemberian ekstrak kulit apel 28 mg/200 g BB, 56 mg/200 g BB, 112 mg/200 g BB selama 21 hari dan Pb Asetat dosis 10mg/ekor/hari selama 14 hari pada hari ke-15 sampai hari ke-28. Pengamatan histologi jejunum menggunakan pewarnaan HE yang diamati menggunakan mikroskop cahaya dan pengukuran kadar aktivitas protease menggunakan metode spektrofotometri. Aktivitas protease dianalisa menggunakan analisa ragam ANOVA menggunakan *software* SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) dan dilanjutkan uji BNJ ($\alpha = 5\%$). Hasil penelitian menunjukkan pemberian terapi preventif ekstrak kulit apel varietas *Rome Beauty* dapat menurunkan aktivitas protease dan memperbaiki kerusakan organ jejunum dengan dosis terbaik yaitu 112 mg/200 g BB. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak kulit apel *Rome Beauty* dapat digunakan sebagai terapi preventif untuk menurunkan radikal bebas akibat induksi plumbum asetat.

Kata Kunci : Aktivitas protease, Ekstrak kulit apel, Histopatologi jejunum, Plumbum asetat.

repository.ub.ac.id

The Preventive Therapy Effect of Rome Beauty Varieties (*Malus sylvestris Mill*) Apple Peels Extract on Protease Activity and Histopathology of White Rat (*Rattus norvegicus*) Jejenum Plumbum Acetate Induced

ABSTRACT

The entry of plumbum into the body can be through inhalation, digestion, and absorption through the skin. Continuous accumulation of plumbum induced can increase the number of Reactive Oxygen Species (ROS) which will have an impact to organ damage, especially jejunum. Jejunal damage can cause the increasing jejunal protease activity. Apple peels extract contains flavonoids which function as antioxidants to neutralize free radicals. The aims of this research were to identify the effect of apple peels extract as preventive therapy on protease activity and jejunal histopathology plumbum-induced of rat (*Rattus norvegicus*). This research used 20 rats, those were divided into 5 treatment groups, which were negative control group without treatment, positive control group which induced Pb acetate 10 mg/rat/day for 14 days, and preventive therapy group which administrated the apple peels extract with 28 mg / 200 g BW, 56 mg / 200g BW, 112mg / 200g BW doses for 21 days and also Pb acetate with 10mg/rat/day for 14 days on day 15th until 28th. Jejunal histological features was stained using HE stain which then observed using a microscope and protease activity levels measured using by the spectrophotometric method. Protease activity was analyzed using a variety of ANOVA analyzes using SPSS software (Statistical Package for Social Sciences) and continued by Tukey test ($\alpha = 5\%$). The results showed that the administration of Rome Beauty varieties apple peels extract as preventive therapy with the best dosage of 112 mg / 200 g BW can reduce protease activity and improve jejunal histopathology. The conclusion of this study is that apple peels extract of Rome Beauty can be used as a preventive therapy to reduce free radicals due to plumbum acetate induced.

Key Word : Apple peels extract, Jejunal histopathology, Plumbum acetate, Protease activity

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis haturkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat dan berkat-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal Skripsi yang berjudul **“Pengaruh Terapi Preventif Ekstrak Kulit Apel (*Malus sylvestris Mill*) Varietas *Rome Beauty* Terhadap Aktivitas Protease dan Histopatologi Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Plumbum Asetat”**.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam kelancaran Skripsi, diantaranya adalah:

1. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc selaku dosen pembimbing 1 yang telah berperan dalam mengarahkan, menasehati, membimbing, memberi dukungan kepada penulis.
2. drh. Analis Wisnu W, M. Biomed selaku dosen pembimbing 2 yang telah berperan dalam mengarahkan, membimbing, memberi dukungan kepada penulis.
3. drh. Galuh Chandra Agustina, M. Si selaku dosen penguji 1 yang telah berperan dalam mengarahkan, serta memberikan saran dan dukungan kepada penulis
4. drh. Dodik Prasetyo, M. Vet selaku dosen penguji 2 yang telah berperan dalam mengarahkan, serta memberikan saran dan dukungan kepada penulis
5. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya (FKH UB) atas kepemimpinan dan dukungan demi kemajuan FKH UB.

6. drh. Yudit Oktanella, M.Si selaku dosen pembimbing akademik yang tidak henti – hentinya membimbing, menasehati, mengarahkan, dan memberikan dukungan kepada penulis
7. Kepada Bapak, Ibu, kakak dan adik yang selama ini memberi dukungan baik moril maupun materil dan doa yang tidak ada henti-hentinya.
8. Seluruh dosen yang telah memberikan ilmu dan kolega Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
9. Kepada Gema Ernest, Devina Andini, Nur Fitria dan Afna Hanunnida selaku teman seperjuangan Skripsi dan Penelitian.
10. Seluruh anggota Classy Class yang memberikan inspirasi, semangat dan kenyamanan kepada penulis selama kuliah.
11. Kepada Esa Riana yang selama ini telah menemani dalam suka dan duka.
12. Civitas akademika FKH UB yang secara tidak langsung turut berperan selama kuliah.

Penulis berharap bahwa semua kebaikan yang diberikan kepada penulis akan dibalas berlipat oleh Tuhan YME. Penulis sadar bahwa laporan ini masih jauh dari kata sempurna dan harapannya bahwa laporan ini dapat memberi ilmu dan menambah wawasan bagi penulis dan pembaca sehingga menjadi pembelajaran yang bermanfaat dikemudian hari.

Malang, 19 Juli 2019

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Tikus Putih.....	6
2.2 Jejunum.....	7
2.3 Enzim Protease	10
2.4 Plumbum.....	12
2.5 Apel Rome Beauty	13
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	17
3.1 Kerangka Konsep	17
3.2 Hipotesis Penelitian	19
BAB 4 METODE PENELITIAN	21
4.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	21
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	21
4.2.1 Alat	21
4.2.2 Bahan.....	22
4.3 Rancangan Penelitian	22
4.4 Variabel Penelitian	23
4.5 Prosedur Kerja	24
4.5.1 Persiapan Hewan Coba.....	24
4.5.2 Pembuatan Ekstrak kulit apel.....	24
4.5.3 Pemberian Plumbum.	25
4.5.4 Pengambilan Organ Jejunum Tikus	26
4.5.5 Isolasi Protease	26
4.5.6 Pengukuran Aktivitas Protease.....	27
4.5.7 Pembuatan Preparat Histopatologi Jejunum	28
4.5.8 Pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE) Histopatologi Jejunum	30
4.5.9 Pengamatan Histopatologi.....	31



4.6 Analisa Data	31
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
5.1 Pengaruh Preventif Ekstrak Kulit Apel Terhadap Aktivitas Protease Pada Tikus (<i>Rattus nirvegicus</i>) Yang Diinduksi Plumbum Asetat	32
5.2 Pengaruh Preventif Ekstrak Kulit Apel Terhadap Histopatologi Jejunum Pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Yang Diinduksi Plumbum Asetat.....	37
BAB 6 PENUTUP	44
6.1 Kesimpulan.....	44
6.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	52



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Panjang duodenum, jejunum, dan ileum	9
Tabel 2.2 Jenis dan Karakteristik Apel Lokal	14
Tabel 2.3 Rata-rata Kadar Quercetin pada Masing-masing Jenis Pengolahan dan Varietas Apel	16
Tabel 4.1 Rancangan Penelitian "Two Ways Table"	22
Tabel 5.1 Rata-rata aktivitas protease jejunum tikus <i>Rattus norvegicus</i>	33



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	7
Gambar 2.2 Organ <i>Intestine</i> Pada Tikus.....	8
Gambar 2.3 Histologi Jejunum Normal.....	9
Gambar 2.4 Histologi Jejunum Abnormal.....	10
Gambar 2.5 Apel <i>Rome Beauty</i>	14
Gambar 3.1 Kerangka Konsep penelitian.....	17
Gambar 5.1 Histopatologi Jejenum Kelompok Kontrol Negatif (A) Perbesaran 100x, (B) Perbesaran 400x	38
Gambar 5.2 Histopatologi Jejenum Kelompok Kontrol positif, (A) Perbesaran 100x, (B) Perbesaran 400x.....	38
Gambar 5.3 Histopatologi Jejenum Kelompok Perlakuan 1, (A) Perbesaran 100x, (B) Perbesaran 400x.....	39
Gambar 5.4 Histopatologi Jejenum Kelompok Perlakuan 2, (A) Perbesaran 100x, (B) Perbesaran 400x.....	39
Gambar 5.5 Histopatologi Jejenum Kelompok Perlakuan 3, (A) Perbesaran 100x, (B) Perbesaran 400x	40



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Kerangka Operasional	53
Lampiran 2 Sertifikat Laik Etik	54
Lampiran 3 Pembuatan Ekstrak Kulit Apel <i>Rome Beauty</i>	55
Lampiran 4 Hasil Uji Kualitatif Ekstrak Kulit Apel Varietas <i>Rome Beauty</i>	56
Lampiran 5 Hasil Uji Statistik Aktivitas Protease Jejunum.....	57
Lampiran 6 Perhitungan Dosis Ekstrak Kulit Apel.....	60
Lampiran 7 Perhitungan Dosis Plumbum	60
Lampiran 8 Isolasi Organ Jejunum	61
Lampiran 9 Langkah Kerja Penelitian.	62



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Simbol/Singkatan	Keterangan
ALA	<i>Amino Levulinate Acid</i>
ALAD	<i>Aminolevulinic Acid Dehydrogenase</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
BB	Berat Badan
BNJ	Beda Nyata Jujur
HE	<i>Hematoxylin Eosin</i>
G	<i>Gram</i>
KG	<i>Kilogram</i>
MG	<i>Miligram</i>
MM	<i>Milimeter</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
Pb	Plumbum
PBS	<i>Posphat Buffer Saline</i>
pH	<i>Power of hidrogen</i>
PPM	<i>Part per million</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TCA	<i>Trichloro Acetic Acid</i>
%	Persen
°C	Derajat Celcius
μL	Mikroliter
μM	Mikrometer
μmol	Mikromol



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Plumbum merupakan salah satu hasil limbah industri pabrik seperti halnya pabrik cat, *battery*, *accu* (aki) (Luthfiyah, 2005). Logam plumbum yang mencemari lingkungan dapat berbahaya apabila tubuh terpapar dalam konsentrasi yang tinggi. Logam ini dapat menimbulkan gangguan pada sistem pernafasan, sistem pencernaan, bahkan dapat mengganggu sistem saraf pusat (Fahrudin, 2018).

Menurut BSN (2009) plumbum dapat masuk ke dalam tubuh melalui beberapa sumber seperti, diantaranya: cat usang, debu, udara, air, makanan, tanah yang terkontaminasi, dan bahan bakar berplumbum. Pencemaran plumbum juga dapat berasal dari pipa – pipa air minum yang dilapisi plumbum (Sembel, 2015). Masuknya plumbum ke dalam tubuh hewan dapat melalui saluran pernafasan, saluran pencernaan, dan absorpsi melalui kulit selanjutnya plumbum masuk melalui sirkulasi sistemik dan didistribusikan ke seluruh tubuh (Kafiar dkk, 2013).

Menurut Mulyadi dkk (2015), sapi yang dipelihara di TPA memiliki potensi tercemar logam berat seperti plumbum yang berasal dari sampah kemudian masuk ke dalam tubuh sapi yang selanjutnya menyebar ke seluruh organ – organ sapi. Menurut penelitian Janardani dkk (2018), kadar plumbum yang ditemukan didalam tubuh sapi bali yang dipelihara di TPA yakni berkisar dari 0,05 ppm hingga 1,05 ppm. Ayam merupakan hewan komersial yang besar kemungkinannya untuk dapat tercemar oleh plumbum. Menurut penelitian yang dilakukan Priyono (2013), hal ini dibuktikan oleh ditemukannya kadar plumbum sebesar 0,56 – 4,83 ppm yang

berada di dalam jaringan tubuh ayam. Hewan komersial yang mengalami keracunan plumbum apabila dimanfaatkan sebagai sumber pangan, maka dapat dimungkinkan bahwa masyarakat yang mengonsumsi bahan pangan tercemar tersebut akan mengalami gangguan kesehatan (Kafiar dkk, 2013).

Plumbum yang masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan akan diabsorpsi dalam usus. Gejala keracunan plumbum pada sistem gastrointestinal yakni berupa anoreksia, nyeri perut, muntah, dan konstipasi (Lubis dkk, 2013). Akumulasi zat toksik yang terserap akan mengganggu sistem penyerapan sari – sari makanan yang terjadi di dalam usus halus terutama jejunum. Keberadaannya logam berat seperti plumbum dapat terbentuknya radikal bebas dan peningkatan kadar ROS dalam tubuh. Peningkatan ROS yang tidak diimbangi dengan antioksidan endogen menyebabkan kondisi stress oksidatif. Keadaan stress oksidatif dapat menimbulkan kerusakan sel dan organ (Setiawan, 2014). Adanya kerusakan sel akan memicu aktivitas makrofag jaringan, sel – sel yang meradang untuk mensekresi sitokin pro inflamasi yakni TNF- α . TNF- α selanjutnya akan mengaktifasi neutrofil. Neutrofil yang teraktivasi akan menghasilkan enzim protease. (Guyton, 2013 ; Sholichah dkk, 2012).

Menurut Wani *et al* (2015), pengobatan keracunan plumbum dapat menggunakan terapi khelat. Terapi khelat melibatkan satu atau lebih agen yang akan mengikat plumbum kemudian memfasilitasi pengeluarannya. Agen terapi khelat *meso-2,3-dimercaptosuccinic acid* (DMSA) digunakan secara oral, dan *ethylenediaminetetraacetic* (EDTA) secara intravena ataupun intramuscular (Mason *et al*, 2014). Terapi khelat dapat menurunkan kadar plumbum dalam darah,

akan tetapi tidak dapat menunjukkan adanya perubahan morfologi organ yang terpapar plumbum. Oleh sebab itu diperlukan terapi pencegahan terhadap paparan plumbum secara langsung daripada pengobatan dikemudian hari.

Radikal bebas dapat dinetralisir dengan ditambahkannya antioksidan eksogen sehingga dampak negatif dari plumbum dapat berkurang (Sy dkk, 2015). Penambahan antioksidan eksogen paling baik yang berasal dari bahan alami yang berasal dari tumbuhan misalnya kulit apel (Rosahdi dkk, 2013). Kulit apel dimanfaatkan sebagai antibakteri, antiproliferatif, dan antioksidan (Boyer, 2004). Kulit apel mengandung hampir 40% flavonol, 30% askorbat, 20% total senyawa fenolik, 14% total glutathione, dan 11% L-sistein (Lata, 2007). *Quercetin* merupakan kandungan senyawa fenolik golongan flavonoid yang terdapat didalam buah apel dimana memiliki peran dalam tubuh sebagai antioksidan, dan melindungi tubuh dari penyakit degeneratif (Waji dan Sugrani, 2009). Menurut penelitian Andriani (2016), ekstrak kulit apel dapat menetralsisir radikal bebas terbukti pada dosis 28mg/200g BB selama 28 hari dapat menurunkan kadar MDA dan mengurangi degenerasi lemak pada hepatosit yang diinduksi oleh streptozotocin. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui peran ekstrak kulit apel varietas *Rome Beauty* sebagai terapi preventif terhadap aktivitas protease dan gambaran histopatologi jejunum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan plumbum.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh terapi preventif ekstrak kulit apel varietas *Rome Beauty* terhadap aktivitas protease pada tikus putih yang diinduksi dengan plumbum asetat?
2. Bagaimana pengaruh terapi preventif ekstrak kulit apel varietas *Rome Beauty* terhadap gambaran histopatologi jejunum tikus putih yang diinduksi dengan plumbum asetat?

1.3 Batasan Masalah

1. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan sejumlah 20 ekor, berumur 8-10 minggu, berat badan 150-200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini sudah memperoleh sertifikat laik etik No: 1087-KEP-UB dari Komisi Etik Penelitian (KEP) Universitas Brawijaya
2. Kulit apel yang digunakan diperoleh dari pedagang apel *Rome Beauty* kawasan kota Batu dengan dosis 28 mg/200 g BB, 56 mg/200 g BB, dan 112 mg/ 200 g BB untuk masing – masing tikus putih yang diberikan selama 21 hari berturut-turut pada setiap perlakuan.
3. Plumbum yang digunakan diperoleh dari Panadia kota Malang. Plumbum diberikan dalam bentuk serbuk (Pb asetat) yang dilarutkan dengan aquades. Induksi Pb dilakukan secara peroral menggunakan sonde dengan dosis 10

mg/ekor/hari dan diberikan selama 14 hari berturut – turut yang dimulai dari hari ke-15 hingga hari ke-28 (Suprijono dkk, 2011).

4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah aktivitas protease dan pengamatan histopatologi jejunum yang diamati secara kualitatif menggunakan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* dan diamati dengan menggunakan mikroskop *Olympus BX51*.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh terapi preventif ekstrak kulit apel varietas *Rome Beauty* terhadap aktivitas protease pada tikus putih yang diinduksi plumbum asetat
2. Mengetahui pengaruh terapi preventif ekstrak kulit apel varietas *Rome Beauty* terhadap gambaran histopatologi jejunum pada tikus putih yang diinduksi plumbum asetat

1.5 Manfaat Penelitian

Melalui penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang pemanfaatan kulit apel *Rome Beauty* sebagai terapi preventif terhadap kerusakan saluran pencernaan khususnya jejunum akibat induksi plumbum asetat.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

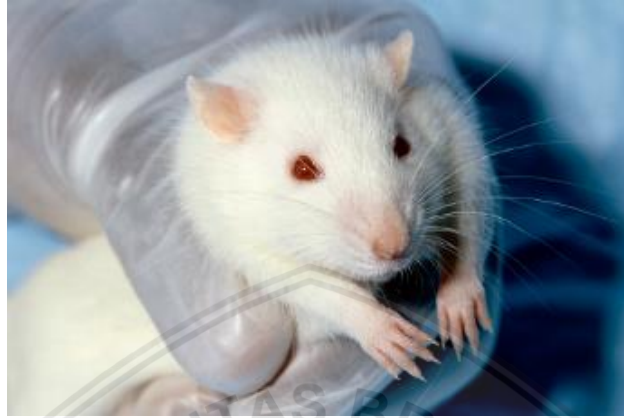
2.1 Tikus Putih

Menurut Suckow (2006), klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut:

Class	: Mamalia
Subclass	: Theria
Infraclass	: Eutheria
Order	: Rodentia
Suborder	: Myomorpha
Superfamily	: Muroidea
Family	: Muridae
Subfamily	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan salah satu jenis hewan yang sering digunakan sebagai hewan coba dalam berbagai penelitian. Ciri – ciri morfologi tikus putih (*Rattus norvegicus*) antara lain memiliki hidung tumpul, panjang badan 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekor, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20-23 mm (**Gambar 2.1**). Penggunaan tikus putih sebagai hewan coba dikarenakan tikus putih mudah berkembang biak, murah serta mudah didapatkan (Hariani, 2016). Selain itu, keunggulan tikus putih sebagai

hewan laboratorium antara lain lebih cepat dewasa, sangat mudah ditangani, dan berukuran cukup besar sehingga memudahkan pengamatan (Maula, 2014).



Gambar 2.1 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Johnson, 2012).

Tikus putih yang digunakan dalam penelitian kali ini yaitu berkelamin jantan, dikarenakan penggunaan tikus putih dengan kelamin jantan memiliki kestabilan hormonal dibanding tikus betina, karena tikus betina mengalami siklus estrus masa kehamilan dan menyusui yang akan mempengaruhi kondisi psikologis hewan uji (Rakanita dkk, 2017).

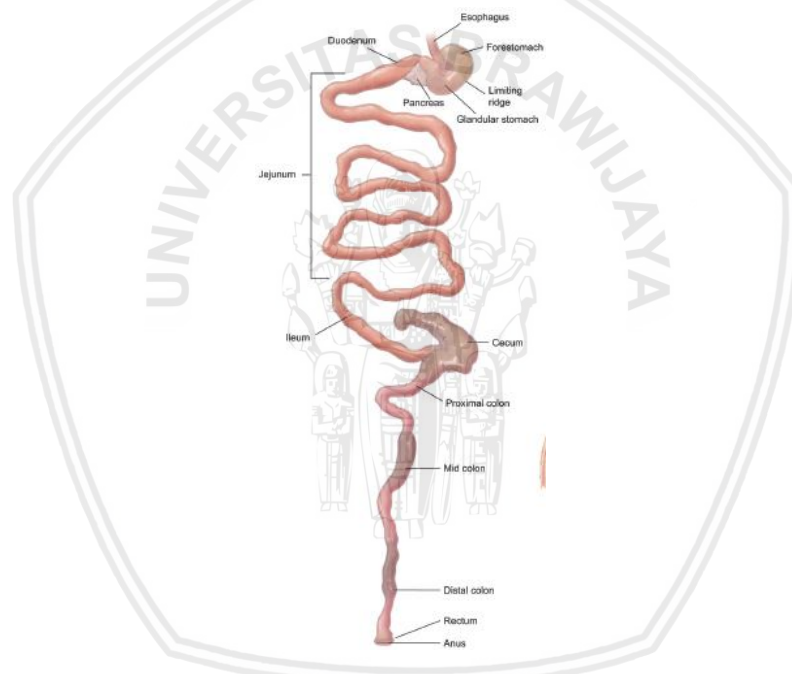
Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar merupakan salah satu galur tikus yang paling populer untuk digunakan sebagai hewan coba dalam suatu penelitian karena ekonomis, mudah berkembang biak, mudah disimpan karena ukuran tubuh yang kecil, dan mudah beradaptasi dengan lingkungan (Kiara, 2013).

2.2 Jejunum

Usus halus merupakan bagian terpanjang dari saluran pencernaan dan berfungsi dalam proses penyerapan nutrisi. Ukuran panjang usus halus pada tikus yakni kurang lebih sekitar 170 cm (Treuting *et al*, 2018). Menurut Tjay, dan

Rahardja (2007), usus halus memiliki fungsi yakni untuk pencernaan karbohidrat, protein, dan lemak dengan bantuan enzim, serta penyerapan vitamin, mineral dan sebagian besar air.

Organ usus halus pada tikus (**Gambar 2.2**) dimulai dari *pyloric sphincter* berlanjut ke distal menuju katup ileocecal (Treuting *et al*, 2018). Secara anatomis, usus halus dibagi menjadi 3 bagian yaitu duodenum, jejunum, dan ileum. Jejunum merupakan bagian kedua dari usus halus setelah duodenum.



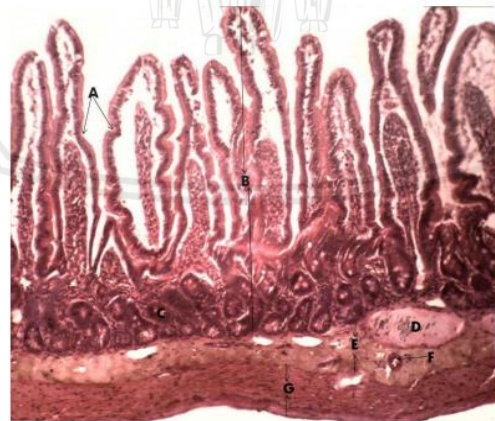
Gambar 2.2 Organ *intestine* pada tikus (Treuting *et al*, 2018)

Jejunum dimulai pada fleksura duodeno jejunal, dari fleksura duodeno jejunal, jejunum memiliki alur berkelok-kelok di rongga abdomen sebelum melanjutkan sebagai ileum. Jejunum memiliki sel goblet yang lebih banyak dari duodenum dan tidak memiliki ciri anatomis yang khusus untuk membedakan dari ileum (Hestianah dkk, 2014 ; Taylor, 2018). Ukuran panjang usus halus ditampilkan pada **Tabel 2.1**

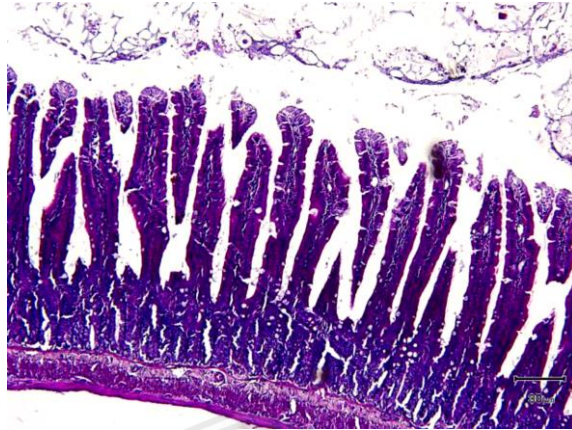
Tabel 2.1 Panjang duodenum, jejunum, dan ileum

Organ	Panjang (cm)	Sumber
Duodenum	7	Mayhew, 1985
Jejunum	90	Kararli, 1995
Ileum	20	McConnell, 2008

Setiap bagian usus halus tersusun atas empat lapisan yakni terdiri dari mukosa, submukosa, tunika muskularis, dan adventisia atau serosa. Pada lapisan mukosa usus halus terdapat bentukan khusus yaitu vili – vili, dimana vili berfungsi untuk memperluas permukaan area lumen serta memperbesar proses absorpsi (Siagian, 2016). Pada duodenum dan jejunum terjadi proses penyerapan gula, asam amino, dan lemak (Puspita, 2014). Mukosa jejunum lebih berlipat – lipat bila dibandingkan dengan mukosa ileum (Sudoyo dkk, 2016). Pada hewan pengerat, ketinggian vili hampir dua kali lipat dari manusia, guna memperbesar luas permukaan (**Gambar 2.3**) (Treuting *et al*, 2018).



Gambar 2.3 Potongan transversal jejunum normal pada tikus dengan pewarnaan HE pada perbesaran 40x. (A) lipatan mukosa, (B) mukosa, (C) intestinalglands, (D) lymphatic nodule, (E) submukosa, (F) pembuluh darah, (G) tunika muskularis (Nzalak et al, 2015)



Gambar 2.4 Gambaran histologi jejunum abnormal pada tikus (Mardasella, 2018)

Pada **Gambar 2.4**, kerusakan pada histologi jejunum dapat diamati pada bentukan vili-vili, adanya kerusakan struktur pada vili, hyperplasia sel goblet serta erosi sel epitel (Mardasella, 2018).

2.3 Enzim Protease

Enzim merupakan suatu senyawa protein yang memiliki peran yakni menjalankan dan mengatur reaksi - reaksi kimia pada sistem biologi (organisme hidup) (Sumardjo, 2009). Di dalam tubuh, enzim terdapat pada dinding atau membrane sel, sitoplasma, mitokondria, inti sel, retikulum endoplasma, dan lisosom dimana berfungsi sebagai biokatalisator yakni dengan mempercepat laju suatu reaksi kimia tanpa ikut terlibat dalam reaksi tersebut (Susanti, dan Fibriana, 2017). Menurut Poedjiadi dan Supriyanti (2006) dalam Irawati (2016), kerja suatu enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, kondisi suhu, pengaruh pH dan pengaruh inhibitor. Pengaruh tersebut dapat mengganggu stabilitas enzim dimana stabilitas suatu enzim

merupakan hal penting dalam peranannya sebagai biokatalis (Susanti, dan Fibriana, 2017)

Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Protease dapat dihasilkan oleh hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme (Yuniati dkk, 2015). Menurut Susanti dan Fibriana (2017), protease juga disebut enzim proteolitik atau proteinase memiliki peranan dalam fisiologis tubuh misalnya dalam konversi protein makanan dalam proses pencernaan makanan, daur ulang protein intraseluler, jalur pembekuan darah, dan aktivasi berbagai protein. Selain itu, protease juga berperan dalam penyembuhan luka dan membersihkan jaringan luka yang mengalami nekrosis (Weiss, 1989).

Protease dibutuhkan secara fisiologi untuk kehidupan organisme pada tumbuhan, hewan maupun mikroorganisme. Pada proses inflamasi, enzim protease bekerja dengan cara menghidrolisis protein jaringan yang mengalami infeksi (Handoko dkk, 2015). Menurut Wati dkk (2013), protease merupakan salah satu enzim yang berperan dalam proses fagositosis terhadap benda asing dalam tubuh. Proses fagositosis dapat menstimulasi produksi ROS secara berlebihan yang akan menyebabkan terbentuknya radikal bebas didalam sel dan jaringan. ROS (*Reactive Oxygen Species*) adalah molekul yang terbentuk karena adanya reaksi reduksi pada oksigen dimana sel inflamasi akan mensekresikan sitokin proinflamasi sehingga mengaktifkan neutrofil. Neutrofil yang teraktivasi melepaskan protease ke dalam sel dan jaringan.

2.4 Plumbum

Plumbum (Pb) merupakan salah satu logam berat yang terdapat didalam lingkungan. Plumbum memiliki nomor atom 82 dengan berat atom 207,2 g/mol, berat jenis 11,4 g/cm³, titik leleh 327,4°C, dan titik didih 1725°C (Handayanto dkk, 2017). Plumbum dapat berkombinasi dengan unsur – unsur lain membentuk senyawa – senyawa baik senyawa organik ataupun senyawa an-organik seperti Plumbum oksida (PbO), Plumbum klorida (PbCl₂), dan lain – lain. Plumbum sering digunakan dalam proses pembuatan gelas, penstabil pada senyawa – senyawa PVC, cat berbasis minyak, hingga bahan bakar (BSN, 2009).

Menurut Romli dkk (2016), plumbum dapat masuk ke dalam tubuh melalui saluran pernapasan, saluran pencernaan, dan kulit. Plumbum sangat berbahaya apabila masuk ke dalam tubuh meskipun dalam jumlah sedikit. Hal ini disebabkan senyawa-senyawa plumbum dapat memberikan efek racun terhadap banyak fungsi organ yang terdapat dalam tubuh.

Keracunan plumbum pada suatu individu khususnya pada saat usia muda dapat menyebabkan penurunan perkembangan otak, dan mempengaruhi sistem kerja otak (Romli dkk, 2016). Cemaran plumbum dapat mengganggu kelangsungan hidup suatu organisme. Paparan bahan tercemar plumbum dapat menyebabkan gangguan pada organ berupa gangguan neurologi, gangguan terhadap fungsi ginjal, gangguan terhadap sistem reproduksi, gangguan terhadap sistem hemopoetik, gangguan terhadap sistem syaraf (Sudarmaji dkk, 2006). Sebanyak 95% plumbum dalam aliran darah terikat dengan eritrosit. Plumbum yang telah diabsorpsi akan diangkut oleh darah ke organ-organ tubuh termasuk otak (Palar, 2008).

Menurut Sharma *et al* (2014), plumbum mampu menyebabkan stres oksidatif dengan meningkatnya ROS (*Reactive Oxygen Species*). Stres oksidatif yang disebabkan oleh logam berat merupakan hasil dari *negative shift* akibat produksi ROS yang tidak seimbang. Produksi ROS yang berlebihan mampu mengakibatkan terjadinya inflamasi pada jaringan (Wati dkk, 2013).

Adanya kandungan plumbum dalam tubuh menyebabkan peningkatan ROS dan penurunan kadar antioksidan. Berbagai penelitian mengatakan bahwa stres oksidatif pada sel disebabkan oleh ketidakseimbangan produksi radikal bebas dan peran antioksidan untuk mendetoksifikasi dan memperbaiki kerusakan yang terjadi (Jaishankar *et al.*, 2014)

2.5 Apel *Rome Beauty*

Penggunaan bahan alam sebagai pengobatan alternatif telah banyak dilakukan oleh masyarakat salah satunya dengan menggunakan buah apel sebagai antioksidan. Berikut merupakan taksonomi dari buah apel menurut Sufrida (2007)

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledone
Ordo	: Rosales
Familia	: Rosaceae
Genus	: Malus
Spesies	: <i>Malus sylvestris Mill</i>



Gambar 2.5 Apel *Rome Beauty* (Sufrida, 2007)

Apel (**Gambar 2.5**) merupakan tanaman buah yang berasal dari negara beriklim sub tropis, dapat ditemukan di berbagai wilayah di Indonesia. Menurut Nafillah (2015) dalam Nurfitriani (2017), beberapa contoh varietas apel impor dari spesies (*Malus domestica*) yaitu apel Fuji, *Red delicious*, *Granny smith*, *Golden Delicious*, dan lain-lain, sedangkan contoh varietas lokal yaitu *Rome Beauty*, Manalagi, dan Anna (**Tabel 2.2**)

Tabel 2.2 Jenis dan Karakteristik Apel Lokal

Jenis Apel	Karakteristik
Apel <i>Rome Beauty</i>	Warna kulit buah perpaduan antara warna hijau dan merah, kulit berpori agak tebal dan kasar, rasa buah segar karena mengandung cukup banyak air, dan aroma tidak tajam.
Apel Manalagi	Warna kulit buah hijau muda kekuningan, daging buah berwarna putih dan lembut, aroma buah harum segar
Apel Anna	Warna kulit buah merah, buah berbentuk seperti trapesium terbalik dengan pangkal berlekuk ke dalam, rasa buah agak asam, dan aroma buah cukup kuat

(Sufrida Y. 2007)

Penggunaan buah apel sebagai antioksidan dikarenakan apel memiliki kandungan flavonoid, tokoferol, senyawa fenolik, kumarin, turunan asam sinamat, dan asam-asam organik polifungsional di dalamnya (Nurfitriani, 2017). Kandungan total fenolik dan flavonoid paling banyak ditemukan pada kulit apel, diikuti oleh

kulit dan daging buah, kemudian oleh daging buah. Kandungan senyawa fenolik dalam 100 g kulit apel *Rome Beauty* yakni sebesar $500,2 \pm 13,7$ mg (Wolfe *et al* 2003). Menurut Octaviany dkk (2017), kulit apel mengandung senyawa-senyawa flavonoid seperti *Catechin*, *procyanidin*, *phloridzin*, *phloretin glycoside*, *caffeic acid*, *chlorogenic acid*, *quercetin glycosides* dan *cyanidin glycoside*.

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder termasuk senyawa fenolik alam yang terdapat pada tanaman hijau, kecuali alga dan bermanfaat sebagai antioksidan (Waji dan Sugrani, 2009). Menurut Viani (2015) dalam Nurfitriani (2017), flavonoid diklasifikasikan ke dalam beberapa golongan, yaitu antosianin, proantosianidin, flavonol, flavon, glikoflavon, flavonil, khalkon, auron, flavonon dan isoflavon. Berdasarkan hasil penelitian Lee *et al* (2003), kandungan terbesar senyawaan fenolik utama dalam mg/100 gr apel segar adalah quersetin glikosida (13.2 mg). *Quercetin* merupakan salah satu zat aktif kelas flavonoid yang secara biologis amat kuat. *Quercetin* mencegah proses oksidasi dari *Low Density Lipoproteins* (LDL) dengan cara menangkap radikal bebas dan mengkhelat logam transisi (Waji dan Sugrani, 2009). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Cempaka (2014), varietas apel *Rome Beauty* memiliki kandungan *quercetin* terbesar dibanding apel varietas lain. Data *quercetin* pada berbagai apel ditampilkan pada **Tabel 2.3**

Menurut Persada (2009), aktivitas *Quercetin* sebagai antioksidan lebih besar dibanding vitamin A, dan E. Berdasarkan penelitian Maalik *et al* (2014), *quercetin* dapat bermanfaat sebagai antioksidan, neurologikal, antivirus, anti inflamasi, hepatoprotektif, melindungi sistem reproduksi tubuh dan agen anti obesitas.

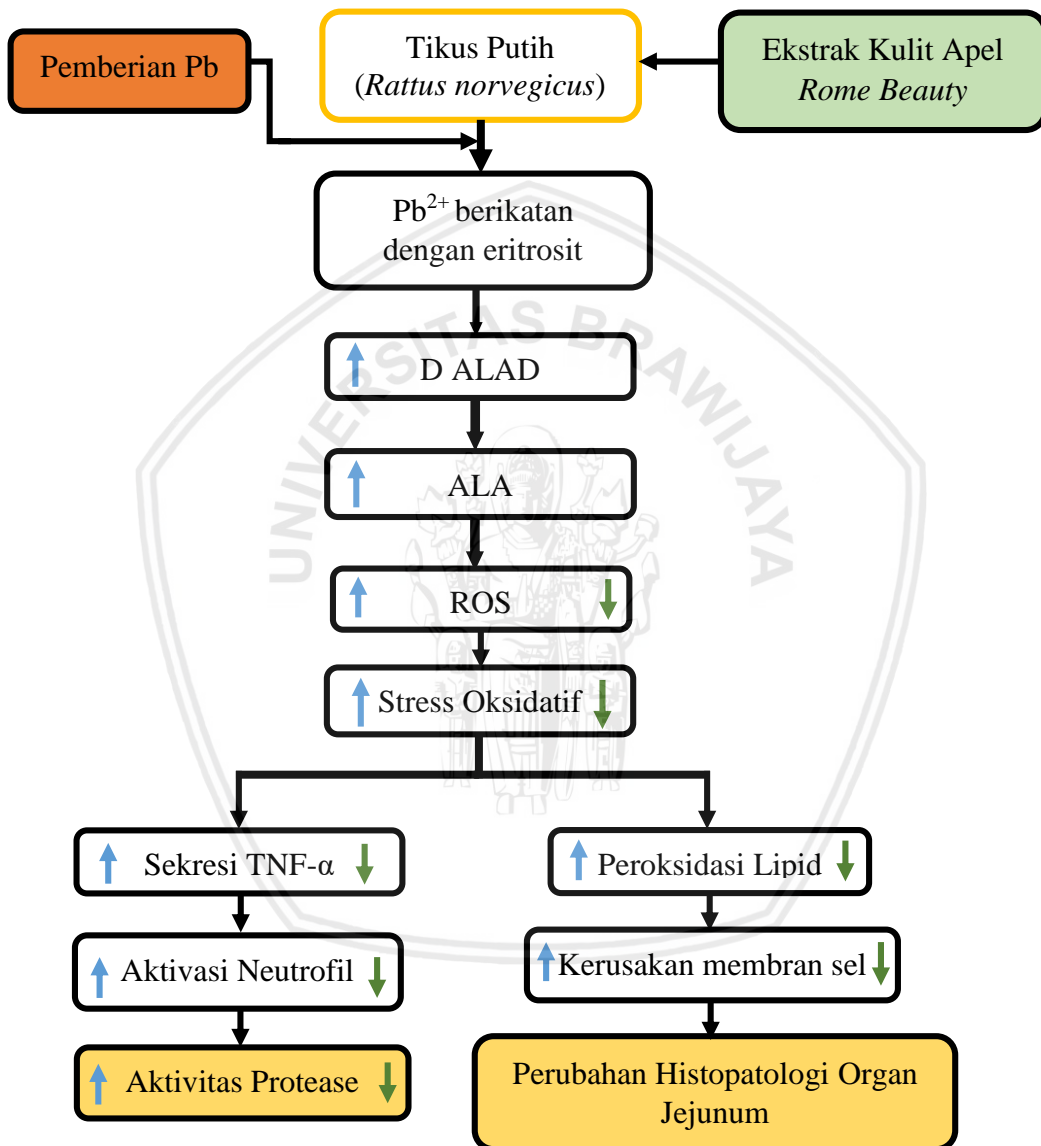
Tabel 2.3 Rata-rata Kadar Quercetin pada Masing-masing Jenis Pengolahan dan Varietas Apel

Jenis Pengolahan	Varietas Apel	Rata - rata Kadar Quercetin \pm SD (mg/L)
Apel Segar	<i>Rome Beauty</i>	477.96 \pm 11.27
	Manalagi	406.57 \pm 7.78
	Fuji	272.89 \pm 8.28
	<i>Red delicious</i>	206.54 \pm 8.42
Jus Apel (<i>juicer</i>)	<i>Rome Beauty</i>	242.96 \pm 8.80
	Manalagi	185.22 \pm 9.91
	Fuji	133.90 \pm 6.25
	<i>Red delicious</i>	98.85 \pm 8.99
Smoothies Apel (blending)	<i>Rome Beauty</i>	136.66 \pm 4.84
	Manalagi	118.12 \pm 6.09
	Fuji	86.12 \pm 8.68
	<i>Red delicious</i>	55.80 \pm 1.69



BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka konsep penelitian

Keterangan:

- ↓ : Mempengaruhi
- ↑ : Peningkatan
- ↓ : Penurunan

- : Terapi
- Orange box : Paparan plumbum
- Green box : Variabel bebas

- Yellow box : Hewan Coba
- Yellow box : Parameter

Tikus putih Galur Wistar (*Rattus norvegicus*) diberikan ekstrak kulit apel yang mengandung senyawa flavonoid sebagai terapi preventif untuk mencegah kerusakan organ di dalam tubuh sebagai akibat pemberian plumbum. Pemberian ekstrak kulit apel *Rome Beauty* berfungsi sebagai antioksidan dalam menetralkan radikal bebas karena terdapat flavonoid yang terkandung didalamnya. Secara langsung, flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonorkan elektron hidrogennya kepada radikal bebas sehingga reaksi radikal bebas dapat terhambat. Secara tidak langsung, flavonoid dapat meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen sehingga terjadi peningkatan produksi enzim antioksidan endogen dalam tubuh. Terdapat kandungan vitamin C di dalam ekstrak kulit apel yang memiliki fungsi sebagai antioksidan dengan menetralkan superoksida, hydrogen peroksida, radikal hidroksil, dan oksigen reaktif lain yang muncul.

Plumbum diberikan secara oral masuk ke dalam saluran pencernaan dan diabsorpsi oleh usus halus kemudian masuk ke dalam peredaran darah dan didistribusikan ke berbagai organ tubuh. Plumbum dalam bentuk Pb^{2+} akan berikatan dengan eritrosit kemudian menghambat aktivitas enzim δ ALAD (*Delta Aminolevulinic Acid Dehydrogenase*) dan mengganggu sintesis hemoglobin. Penghambatan aktivitas enzim δ ALAD menyebabkan peningkatan akumulasi ALA. Peningkatan kadar ALA menyebabkan pembentukan hidrogen peroksida, radikal superoksida dan juga interaksi keduanya menghasilkan radikal hidroksil, suatu radikal bebas yang paling reaktif.

Pembentukan radikal bebas akan memicu suatu kondisi stress oksidatif. Kondisi stress oksidatif merupakan suatu keadaan dimana *Reactive Oxygen Spesies*

(ROS) yang toksik meningkat dan melebihi pertahanan antioksidan endogen, mengakibatkan kelebihan radikal bebas sehingga terjadi kerusakan dan disfungsi organ. Kondisi ROS yang meningkat akan mengaktifkan NF- κ B dengan cara fosforilasi cepat dan degradasi proteasomal dari protein inhibitor ($I\kappa B\alpha$). Selanjutnya NF- κ B akan bertranslokasi di nukleus untuk meregulasi sitokin pro-inflamasi salah satunya yakni TNF- α . TNF- α akan mengaktifkan neutrofil. Neutrofil yang telah aktif akan mensekresi protease.

Keadaan stress oksidatif dapat mengakibatkan peroksidasi lipid pada membran sel jejunum sehingga dapat menimbulkan kerusakan pada vili dan mukosa jejunum

Reaksi radikal bebas yang terhambat akibat pemberian ekstrak kulit apel dapat menurunkan kondisi stress oksidatif dan mencegah terjadinya inflamasi. Inflamasi yang telah diminimalisir akan menyebabkan aktivitas protease yang disintesis oleh neutrofil mendekati normal dan kerusakan jejunum dapat dihambat

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan permasalahan, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pemberian ekstrak kulit apel *Rome Beauty* dapat mencegah perubahan aktivitas protease pada jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Plumbum asetat.

2. Pemberian ekstrak kulit apel *Rome Beauty* mampu mencegah kerusakan histopatologi jejunum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Plumbum asetat



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2019 – Maret 2019 di Laboratorium UPT Materia Medika Batu, Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang, Laboratorium Kessima Medika, dan Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : kandang tikus berupa bak plastik dan tutup kandang dari kawat, botol minum tikus, sekam berupa parutan kayu halus, alat sonde, *dissecting set*, papan bedah, sarung tangan, *microtube*, spuit 1 cc, spuit 3 cc, *microtube*, timbangan digital, gelas ukur cawan petri, spatula, objek glass, cover glass, *beaker glass*, mortar dingin, autoclave, mikroskop cahaya (*Olympus BX51*), tabung erlenmayer, mortar, pot organ, *aluminium foil*, mikropipet ukuran 10 – 100 μL , *tissue*, kapas, *centrifuge*, kertas saring, *box* pakan, spektrofotometer, *timer*, pH meter, *microtube*, *hot plate*, inkubator, dan lemari pendingin.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) ras Wistar jantan, Pb asetat (powder), ekstrak kulit apel, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *aquadest*, NaCl fisiologis 0,9% dingin, PBS-azida pH 7,4, PFA 4%, PBS-Tween : PMSF (9:1), pasir kuarsa, balok es, etanol absolut dingin, Tris-HCl (1:1) pH 6,5, substrat kasein 1%, asam trikloro asetat (TCA) 4%, *xylol* bertingkat, alkohol bertingkat, tirosin, PFA 4%, blok parafin, pewarna *Hematoxiline Eosin* (HE), alkohol 70%, alkohol 90%, dan alkohol 95%.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode *Experimental* menggunakan Rancangan acak lengkap (RAL), dipergunakan apabila media yang digunakan dalam penelitian sama atau dianggap seragam (Kusriningrum, 2008). Rancangan kelompok penelitian dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Rancangan kelompok penelitian

Kelompok	Keterangan	Variabel yang Diamati	
		Aktivitas Protease	Histopatologi Lambung
A (Kontrol negatif)	Pakan dan air minum		
B (Kontrol positif)	Pakan dan air minum + pemberian Pb 10 mg/ekor/hari		
C (Terapi 1)	Pakan dan air minum + 28 mg/kg BB ekstrak kulit apel + pemberian Pb 10mg/ekor/hari		
D (Terapi 2)	Pakan standard an air minum + 56 mg/kg BB ekstrak kulit apel + pemberian pb 10 mb/ekor/hari		

E (Terapi 3)	Pakan standard an air minum + 112 mg/kg BB ekstrak kulit apel + pemberian pb 10 mb/ekor/hari		
---------------------	--	--	--

Penentuan jumlah sampel minimal menggunakan rumus $p(n - 1) \geq 15$, dimana (p) adalah jumlah perlakuan dan (n) adalah jumlah ulangan (Kusriningrum, 2008), perhitungan banyaknya ulangan ialah sebagai berikut:

$$P(n - 1) \geq 15$$

$$5(n - 1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$N \geq 4$$

Penelitian ini memiliki lima perlakuan, dengan dasar rumus di atas diperoleh jumlah pengulangan sebanyak lebih dari atau sama dengan empat kali. Jumlah pengulangan yang diambil adalah empat, sehingga sampel yang diperoleh pada penelitian ini sebanyak 20 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*).

4.4 Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan tiga variabel, yaitu variabel bebas, variabel terikat dan variabel terkontrol.

Variabel Bebas : Dosis plumbum (Pb) dan dosis ekstrak kulit apel *Rome Beauty*.

Variabel Terikat : Aktivitas protease dan histopatologi jejunum tikus putih

Variabel Kontrol :

- Tikus putih (*Rattus norvegicus*) meliputi jenis kelamin, umur, berat badan, strain Wistar
- Ekstrak kulit apel *Rome Beauty*
- Pakan yang digunakan yaitu sebanyak 10% dari berat badan tikus yaitu 15 – 20 gram.
- Suhu ruangan yang digunakan 26 – 27°C

4.5 Prosedur Kerja

4.5.1 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) berusia 8 – 10 minggu sebagai hewan coba dengan berat rata – rata 180 hingga 200 gram. Tikus diperoleh dari Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri, Malang. Sebelum penelitian, tikus diaklimatisasi selama 7 hari pada kandang plastik di laboratorium. Alas kandang diberi litter berupa serutan kayu agar meminimalisir bau urea dari feses dan urin tikus. Pemberian pakan dan air minum selama masa aklimatisasi diberikan secara *ad libitum*. Hewan coba sebanyak 20 ekor dibagi dalam 5 kelompok perlakuan secara acak. Setiap kelompok hewan coba terdiri dari masing-masing 4 ekor hewan coba. Tikus tersebut dikandangkan sesuai kelompok.

4.5.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Apel

Pembuatan ekstraksi kulit apel pada penelitian ini dilakukan dengan metode maserasi. Adapun tahap-tahap pembuatannya ialah sebagai berikut:

Apel dipisahkan dari kulit dan dagingnya. Kulit apel yang didapatkan kemudian dicuci hingga bersih, kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40 – 60 °C hingga kulit apel mengering. Selanjutnya dilakukan proses ekstraksi yaitu dengan cara kulit apel yang telah kering diblender sampai halus, kemudian ditimbang sebanyak 500 gram dan dimasukkan ke dalam wadah proses ekstraksi. Ditambahkan etanol 70% ke dalam wadah hingga kulit apel terendam kemudian ditutup dengan aluminium foil dan dibiarkan selama 4 hari. Setelah itu dimasukkan kembali kulit apel yang sudah direndam dengan etanol 70% ke dalam wadah ekstraksi dan ditambahkan pelarut etanol 70% sampai terendam, lalu ditutup dengan aluminium foil dan dibiarkan semalaman, kemudian dikocok di atas *shaker digital* dengan kecepatan 50 rpm. Saring ekstrak cair dengan penyaring kain, lalu tampung ekstrak ke dalam tabung erlenmayer. Hasil ekstrak cair kemudian diuapkan dengan alat *rotary evaporator* dan penangas air (*water bath*) selama 2 jam lalu diperoleh ekstrak kental kulit buah apel.

Pada penelitian ini digunakan dosis yang didapat dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Andriani (2016) pada tikus yaitu dosis 28 mg/200gBB tikus, 56 mg/200gBB tikus, dan 112 mg/200gBB tikus. Ekstrak kulit apel tersebut diberikan selama 21 hari sesuai dengan dosis yang telah ditentukan.

4.5.3 Pemberian Plumbum

Pemberian Plumbum (Pb) dilakukan dengan cara melarutkan Pb asetat yang berbentuk serbuk berwarna putih dengan aquades 1 ml dan diberikan secara per oral dengan menggunakan sonde lambung. Dosis Pb asetat yang diberikan ialah 10

mg/ekor/hari pada kelompok B kontrol positif, kelompok C perlakuan 1, kelompok D perlakuan 2, dan kelompok E perlakuan 3 selama 2 minggu (14 hari). Dosis Pb dan waktu pemberian Pb disesuaikan dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, pemberian Pb sebanyak 10 mg/ekor/hari selama 14 hari yang dapat menyebabkan degenerasi dan nekrosis sel-sel organ (Suprijono dkk., 2011).

4.5.4 Pengambilan Organ Jejunum Tikus

Pengambilan organ jejunum pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan setelah perlakuan selesai dilakukan. Pada pengambilan organ proses pertama yang dilakukan adalah euthanasi dengan cara dislokasi hewan coba pada bagian leher. Kemudian Tikus direbahkan dengan posisi ventrodorsal pada papan pembedahan dan fiksasi keempat kaki tikus. Kemudian dilakukan pembedahan pada rongga abdomen. Kemudian diambil bagian jejunumnya dan dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9% dingin. Kemudian jejunum dimasukkan ke dalam larutan *Phosphate Buffer Saline-azida* (PBS-azida) pH 7,4 untuk menjaga protein dalam organ agar tidak rusak dan larutan paraformaldehid 4% (PFA) untuk menjaga atau mengawetkan jaringan agar tidak lisis.

4.5.5 Isolasi Protease

Organ jejunum yang telah diisolasi ditimbang seberat 0,5 gram dan dipotong kecil – kecil dengan menggunakan gunting bedah, setelah itu ditambahkan PBS-Tween : PMSF dengan perbandingan 9:1 sebanyak 1 mL. Tambahkan sedikit pasir kuarsa, kemudian gerus dengan mortar dingin yang diletakkan di atas balok es.

Homogenate yang telah terbentuk ditambahkan PBS-Tween : PMSF dengan perbandingan 9:1 sebanyak 2 mL dan dipindahkan ke dalam *microtube* yang telah disterilisasi dengan *autoclaf*. Setelah itu homogenkan dengan alat getar vorteks selama 10 menit, disonikasi dengan sonikator selama 10 menit dan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Supernatan diambil dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama 24 jam hingga terbentuk endapan. Setelah itu sentrifugasi kembali selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm, endapan diambil dan dikeringkan sampai bau etanol hilang. Lalu tambahkan endapan tersebut dengan larutan 0,02 M Tris-HCl pH6,5 dengan perbandingan 1:1 dan lakukan homogenisasi (Wati, 2013).

4.5.6 Pengukuran Aktivitas Protease

Pengukuran aktivitas protease dilakukan menggunakan metode Aulanni'am (2004) dalam Handoko., dkk (2015) yakni tahapan awal dimulai dari isolasi protein organ jejunum tikus (*Rattus norvegicus*), pembuatan kurva baku tirosin untuk mendapatkan persamaan kurva baku tirosin, dan dilanjutkan pengukuran aktivitas protease yaitu sebanyak 200 μ L kasein 500ppm dimasukkan ke dalam tabung effendorf, kemudian ditambahkan 300 μ L larutan buffer fosfat pH 7 dan 100 μ L enzim protease lalu didiamkan selama satu jam pada suhu 37°C di atas inkubator. Selanjutnya tambahkan 400 μ L larutan TCA 4% kemudian didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar (27°C). Selanjutnya sentrifus tabung dengan kecepatan 4000 rpm menggunakan alat sentrifugasi selama 10 menit. Supernatan diambil sebanyak 300 μ L dan diencerkan 5 kali volume sampel dengan buffer fosfat lalu

diukur nilai absorbansinya pada λ maksimal tirosin (275nm). Blanko yang digunakan dengan prosedur sama dengan penentuan aktivitas, tetapi kasein diganti dengan aquades. Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan dengan menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times fp$$

Dimana : v = volume total sampel (mL)

q = waktu inkubasi (mL)

fp = faktor pengenceran

p = jumlah enzim (mL)

4.5.7 Pembuatan preparat Histopatologi Jejunum

Proses pembuatan preparat histologi terdiri dari fiksasi, dehidrasi, *clearing*, *embedding*, *blocking*, *sectioning*, pewarnaan, *mounting*, dan *labelling* (Jusuf, 2009). Tahapan pembuatan preparat dimulai dengan melakukan fiksasi yaitu dengan merendam organ jejunum dalam PFA 4% selama 24 jam. Fiksasi dilakukan untuk mencegah kerusakan pada jaringan, menghentikan proses metabolisme, mengawetkan komponen sitologi dan histologi, dan mengeraskan materi yang lunak agar jaringan dapat diwarnai.

Tahap selanjutnya yaitu tahapan dehidrasi, yang bertujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi agar jaringan tersebut nantinya dapat diisi oleh parafin. Proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat mulai dari 70%, 80%, dan 95% masing – masing selama 5 menit.

Selanjutnya adalah tahap penjernihan organ (*clearing*) dilakukan dengan mulai pemindahan jaringan ke larutan penjernihan yaitu xylol I (1 jam), xylol II, dan xylol III (30 menit pada suhu kamar dan 30 menit pada inkubator).

Selanjutnya adalah tahapan *embedding* atau *blocking*, dimana organ dimasukkan ke dalam parafin cair dengan suhu 56°C selama 2 jam dan kemudian diambil dengan pinset dan dilanjutkan pemblokkan dengan cara menuangkan parafin cair diatas cetakan blok parafin yang berukuran sesuai dengan tempat blok *microtome* hingga jaringan terendam sempurna. Selanjutnya organ dibekukan dan disimpan di dalam freezer. *Embedding* berfungsi agar organ / jaringan menjadi lebih padat. Blok tersebut dipasang pada *microtome* dan diatur agar posisinya sejaja dengan posisi pisau.

Sectioning adalah proses pemotongan jaringan yaitu blok parafin dipotong dengan ketebalan 5 μm dan diendam pada *water bath* dengan suhu 38 – 40°C. Awal pemotongan dilakukan *trimming* karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna. Kemudian irisan yang didapat diletakkan pada *object glass*. Sediaan disimpan pada inkubator dengan suhu 37 – 38°C selama semalam lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE (Wati dkk., 2013).

Menurut Mardasella (2018), pemeriksaan histopatologi jejunum dilakukan dengan melihat bentukan vili-vili, adanya kerusakan struktur pada vili, hiperplasia sel goblet serta erosi sel epitel.

4.5.8 Pewarnaan Hematoxyline Eosin (HE) Histopatologi Jejunum

Tahapan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE) menurut muntha (2001) adalah sebagai berikut:

Tahapan awal dilakukan proses *Deparafinisasi* yakni dengan memasukkan preparat ke dalam Xylol I selama 3 menit, Xylol II selama 3 menit yang bertujuan untuk menghilangkan parafin yang terdapat pada jaringan. Proses selanjutnya adalah *Rehidrasi* yakni preparat dimasukkan ke dalam Ethanol absolut I selama 3 menit, Ethanol absolut II selama 3 menit, Ethanol 90% 3 menit, Ethanol 80% 3 menit, Kemudian dibilas dengan air mengalir selama 1 menit. Selanjutnya preparat dicelupkan pada larutan *Hematoxyline* 6 – 7 menit. Tujuannya untuk memberi warna pada inti sel. Setelah dimasukkan pada larutan *Hematoxyline*, preparat dicuci dengan air mengalir selama 1 – 2 menit, kemudian bilas dengan aquades. Selanjutnya preparat dicelupkan pada larutan eosin 1 – 5 menit. Tujuannya adalah untuk memberi warna merah pada sitoplasma sel. Preparat dibilas kembali dengan air keran selama 1 menit untuk menghilangkan pewarna eosin yang masih menempel. Dehidrasi kembali dengan Ethanol 80% 10 celupan, Ethanol 90% 10 celupan, Ethanol absolut II 10 celupan, Ethanol absolut I selama 1 menit. Preparat dicelupkan pada Xylol I selama, Xylol II dan Xylol III masing-masing 3 menit, kemudian dikeringkan. Kemudian dilakukan *mounting* dengan menggunakan entelan pada preparat, dan tahap akhir yakni preparat dengan kaca penutup.

4.5.9 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan histologi jejunum dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus BX51* dengan perbesaran 100x, 400x, dan 1000x. Pengamatan histopatologi jejunum yang diamati adalah bagian lapisan mukosa dengan bentukan vili – vili serta tanda – tanda terjadinya kerusakan vili, hiperplasia sel goblet serta erosi sel epitel.

4.6 Analisa Data

Data penelitian aktivitas protease yang diperoleh dari hasil pengukuran aktivitas enzim protease secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri dengan spektrofotometer menggunakan panjang gelombang maksimal 530 yang berfungsi untuk mengetahui aktivitas protease dengan pengamatan gambaran histopatologi jejunum. Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah kuantitatif statistik untuk aktivitas enzim protease dan analisa kualitatif deskriptif untuk gambaran histopatologi jejunum. Analisa kuantitatif dengan menggunakan analisis Ragam *one way ANOVA* menggunakan *software SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 22,0*. Perlakuan uji lanjutan *BNJ $\alpha = 5%$* untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan, sedangkan gambaran histopatologi dianalisis deskriptif dengan membandingkan kerusakan jaringan antar kelompok.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Preventif Ekstrak Kulit Apel Terhadap Aktivitas Protease Pada Tikus (*Rattus nirvegicus*) Yang Diinduksi Plumbum Asetat

Enzim protease merupakan enzim yang berfungsi untuk menghidrolisis ikatan peptida dalam rantai protein. Enzim protease secara normal terdapat dalam jaringan tubuh dan berperan dalam pertahanan tubuh yaitu sebagai pemecah protein asing yang masuk dalam tubuh (Saptono dkk, 2014). Protease juga berperan dalam sejumlah reaksi biokimia seluler seperti degradasi protein, proses koagulasi darah, dan mekanisme patogenitas (Chakraborti and Dhalla, 2017).

Pengukuran aktivitas protease dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif yang tanpa diberikan perlakuan, kontrol positif yang diinduksi plumbum dengan cara diencerkan dengan aquades 1 mL dan diberikan per oral dengan menggunakan sonde lambung. Plumbum asetat diberikan 10 mg/ekor/hari pada kelompok kontrol positif, perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3 dari hari ke-15 hingga ke-28 (14 hari) dan terapi preventif ekstrak kulit apel *Rome Beauty* pada perlakuan 1 dosis 28 mg/200g BB, pada perlakuan 2 dengan dosis 56 mg/200g BB, sedangkan perlakuan 3 dosis 112 mg/200g BB yang diberikan secara sonde lambung dari hari ke-8 hingga ke-28 (21 hari).

Hasil dari pengukuran aktivitas protease jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) dalam 5 perlakuan tersebut terdapat pada **tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Rata-rata aktivitas protease jejunum tikus (*Rattus norvegicus*)

Perlakuan	Rata-Rata Aktivitas Protease \pm SD ($\mu\text{mol/g.menit}$)	Penurunan Aktivitas Protease terhadap K+ (%)
Kontrol negatif (K-)	4,08 \pm 0,08 ^a	-
Kontrol positif (K+)	5,99 \pm 0,37 ^c	-
Perlakuan 1 (P1)	4,84 \pm 0,38 ^b	19,2%
Perlakuan 2 (P2)	4,45 \pm 0,17 ^{ab}	25,7%
Perlakuan 3 (P3)	4,25 \pm 0,16 ^a	29%

Keterangan : Notasi (a, b, c) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara perlakuan

Prinsip pengukuran aktivitas protease dalam metode Kunitz (1971) yaitu pada kemampuan enzim protease untuk menghidrolisis kasein. Kasein yang tidak terhidrolisis akan diendapkan oleh *Trichloro Acetic Acid* (TCA), selanjutnya endapan dipisahkan kemudian filtratnya dapat diukur dengan spektrofotometer (Novitasari, 2014). Protease secara normal terdapat di dalam jaringan tubuh yang berperan dalam pertahanan seluler yaitu pemecahan protein asing yang masuk ke dalam tubuh (Kasari, 2018).

Hasil analisa dengan menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa aktivitas protease kelompok kontrol negatif yang didapatkan 4,08 \pm 0,08 $\mu\text{mol/g.menit}$. Nilai aktivitas protease pada kontrol negatif digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan yang terjadi karena adanya pengaruh perlakuan. Enzim protease pada kelompok kontrol negatif (K-) secara normal berada di dalam

sel yang berfungsi untuk transduksi sinyal dan regulasi sel. Protease memiliki peran dalam transduksi sinyal untuk aktivasi hormon polipeptida, faktor perkembangan, dan pertahanan tubuh (Hardiany, 2013). Pada faktor perkembangan, protease berperan dalam perakitan kolagen dari prokolagen, proliferasi sel dan kontrol proteolitik serta berperan pada kematian sel yang terprogram (apoptosis) (Chapman, 1997). Enzim protease juga dapat digunakan sebagai penentu tingkat keparahan inflamasi, semakin tinggi nilai aktivitas protease maka semakin parah keadaan inflamasinya (Saptono dkk, 2014).

Kelompok kontrol positif terdapat perbedaan yang nyata dengan kelompok kontrol negatif. Aktivitas enzim protease pada kelompok kontrol positif yang didapatkan adalah $5,99 \pm 0,37 \mu\text{mol/g.menit}$. Peningkatan aktivitas protease disebabkan oleh adanya induksi plumbum asetat. Plumbum akan menghambat aktivitas enzim δALAD yang menyebabkan peningkatan akumulasi ALA (Nelma, 2008). Peningkatan ALA tersebut menyebabkan pembentukan radikal peroksida, radikal superoksida dan juga interaksi keduanya menghasilkan radikal hidroksil, suatu radikal bebas yang paling reaktif (Gurer-Orhan, et.al, 2004). Pada keadaan normal, terjadi keseimbangan antara pembentukan antioksidan dan radikal bebas di dalam tubuh. Induksi plumbum memicu kondisi stres oksidatif dimana terjadi ketidakseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas. Radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya kerusakan sel, sehingga memicu aktivitas makrofag jaringan, sel – sel yang meradang untuk mensekresi sitokin pro inflamasi yakni $\text{TNF-}\alpha$. $\text{TNF-}\alpha$ selanjutnya akan mengaktivasi neutrofil. Neutrofil yang teraktivasi akan menghasilkan enzim protease. (Guyton, 2013 ; Sholichah dkk, 2012).

Menurut Arief dan Widodo (2018), keseimbangan aktivitas protease memegang peranan yang penting dalam penyembuhan luka. Neutrofil akan melepaskan protease yang kemudian memiliki peranan penting dalam vasokonstriksi, peningkatan permeabilitas membran, peningkatan koagulasi, adhesi leukosit, kemotaksis, migrasi dan pembunuhan bakteri serta menghilangkan debris jaringan, dan merangsang respon inflamasi.

Hasil uji kelompok perlakuan 1 (dosis ekstrak 28 mg/200g BB) dan kelompok perlakuan 2 (dosis ekstrak 56 mg/200g BB) tidak berbeda nyata dapat dilihat dari nilai aktivitas protease sebesar $4,84 \pm 0,38 \mu\text{mol/g}\cdot\text{menit}$ dan $4,45 \pm 0,17 \mu\text{mol/g}\cdot\text{menit}$ serta penurunan aktivitas protease sebesar 19,2% dan 25,7% yang menunjukkan bahwa terjadi penurunan aktivitas protease perlakuan 1 dan 2 pada organ jejunum dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hal ini disebabkan oleh kandungan antioksidan di dalam ekstrak kulit apel *Rome Beauty* yang mampu menetralkan radikal bebas di dalam tubuh, sehingga aktivitas protease dapat menurun. Kelompok 2 dengan pemberian dosis 56 mg/200g BB mendekati dari kontrol negatif yang ditunjukkan dengan adanya persamaan notasi yang berarti dosis ini sudah cukup efektif dari yang diterapkan.

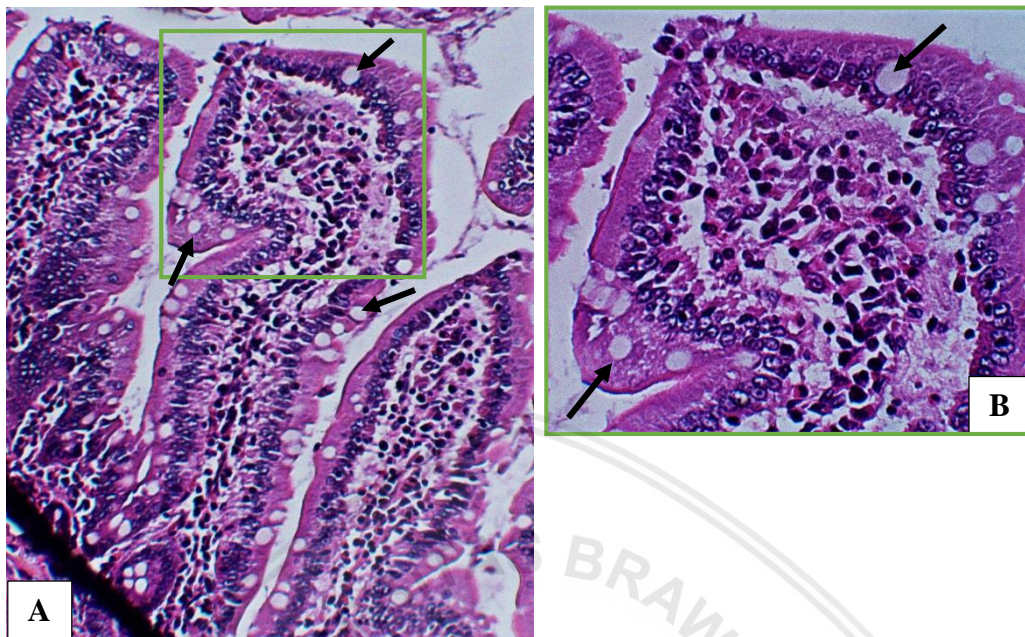
Kelompok perlakuan 3 (dosis ekstrak 112 mg/200g BB) tidak berbeda nyata terhadap kontrol negatif. Hasil yang didapatkan pada perlakuan 3 tidak berbeda nyata yang menunjukkan bahwa dosis yang diberikan pada tikus kelompok perlakuan 3 merupakan dosis terbaik diantara dosis 1 dan 2. Aktivitas protease menunjukkan hasil yang signifikan yaitu sebesar $4,25 \pm 0,16 \mu\text{mol/g}\cdot\text{menit}$ dan penurunan aktivitas protease sebesar 29% dibandingkan dengan kontrol positif.

Dosis kelompok perlakuan 3 ini mampu memberikan efek yang diharapkan. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar dosis ekstrak kulit apel *Rome Beauty* yang diberikan, maka semakin besar pula penurunan aktivitas protease jejunum. Ekstrak kulit apel *Rome Beauty* memiliki kandungan senyawa flavonoid berdasarkan uji kualitatif (**Lampiran 4**) yang bekerja sebagai antioksidan untuk menekan kenaikan aktivitas protease dalam tubuh. Hal tersebut ditunjukkan dengan hambatan peningkatan aktivitas protease pada kelompok preventif ekstrak kulit apel perlakuan 1, 2 dan 3. Flavonoid yang terkandung dalam ekstrak kulit apel *Rome Beauty* mampu menetralkan radikal bebas di dalam tubuh yang disebabkan induksi plumbum sehingga mampu menekan terjadinya stres oksidatif. Peran flavonoid sebagai antioksidan secara langsung yaitu dengan cara mendonorkan elektron hidrogennya sehingga menetralkan radikal bebas di dalam tubuh dan secara tidak langsung flavonoid bekerja di dalam tubuh dengan meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen (Purwaningsih dkk, 2018). Selain itu, adanya kandungan vitamin C pada ekstrak kulit apel berfungsi sebagai antioksidan dengan menetralkan superoksida, hydrogen peroksida, radikal hidroksil, dan oksigen reaktif lain yang muncul (Pakaya, 2014). Vitamin C bekerja dengan cara mendonorkan elektronnya untuk menetralkan radikal bebas. Vitamin C yang bersifat radikal karena kehilangan elektron nantinya akan berubah menjadi stabil kembali oleh enzim antioksidan di dalam tubuh (Iswara, 2009). Menurut Chattopadhyay *et al.*, (2006), kondisi stres oksidatif yang ditekan akan menekan aktivasi NF-KB salah satunya untuk membentuk TNF- α . TNF- α yang tidak terbentuk akan menurunkan aktivitas dari neutrofil yang berfungsi sebagai imunitas

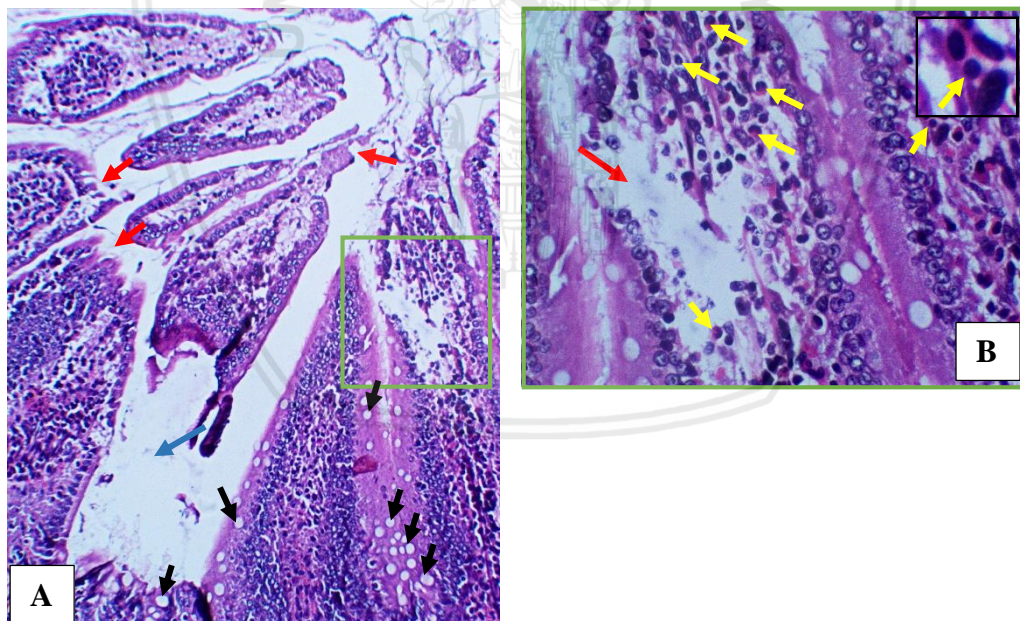
pertama. Penurunan neutrofil akan menekan pelepasan protease, sehingga aktivitas protease pada jejunum tidak meningkat.

5.2 Pengaruh Preventif Ekstrak Kulit Apel Terhadap Histopatologi Jejunum Pada Tikus (*Rattus nirvegicus*) Yang Diinduksi Plumbum Asetat

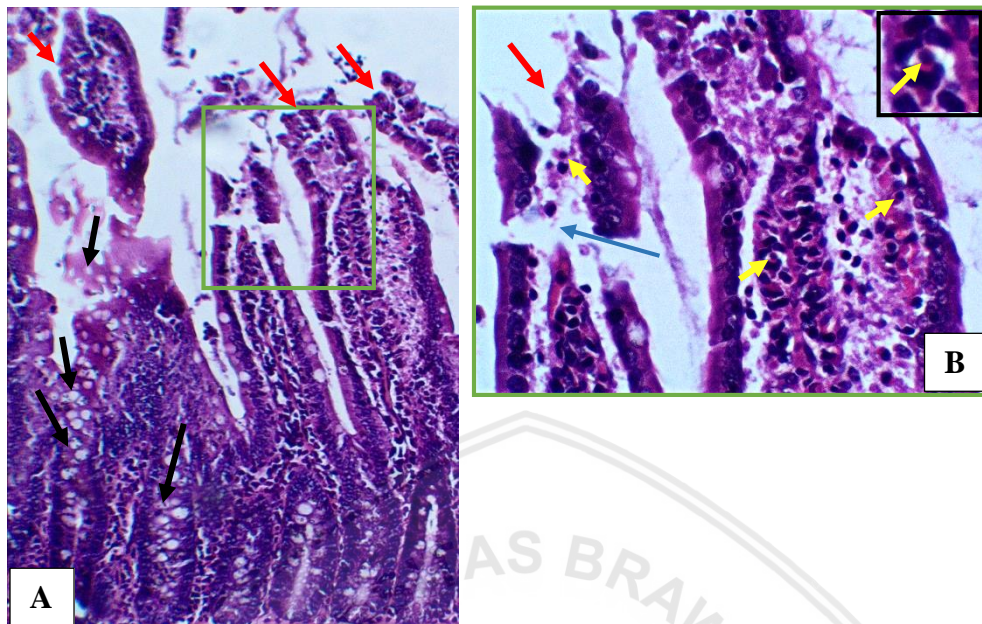
Pengaruh preventif ekstrak kulit apel *Rome Beauty* pada pengamatan preparat histopatologi jejunum tikus putih yang diinduksi plumbum asetat dengan pewarnaan Hematoxyline Eosin (HE) dianalisa menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 4 – 400x dan *discan* dengan perbesaran maksimal 400x. Bagian yang diamati yakni kerusakan pada vili – vili jejunum, infiltrasi sel radang dan sel goblet. Pada **Gambar 5.1** merupakan gambaran histopatologi dari kelompok tikus kontrol negatif tanpa diberi perlakuan induksi plumbum. Gambaran histologi normal jejunum memiliki bentuk serta ukuran villi normal, terdapat susunan sel epitel kolumnar dan sel goblet yang rapi pada tunika mukosa dan tidak ditemukan ada infiltrasi sel radang. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hestianah dkk., (2014) jejunum normal memiliki mukosa dengan vili yang tersusun rapat, sel epitel berbentuk kolumnar. Secara normal, jejunum terdiri dari empat lapisan, yaitu tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis dan tunika serosa (Treuting, 2018). Histologi jejunum pada kontrol negatif dapat dijadikan patokan ada perubahan dan kerusakan yang terjadi pada kelompok lain.



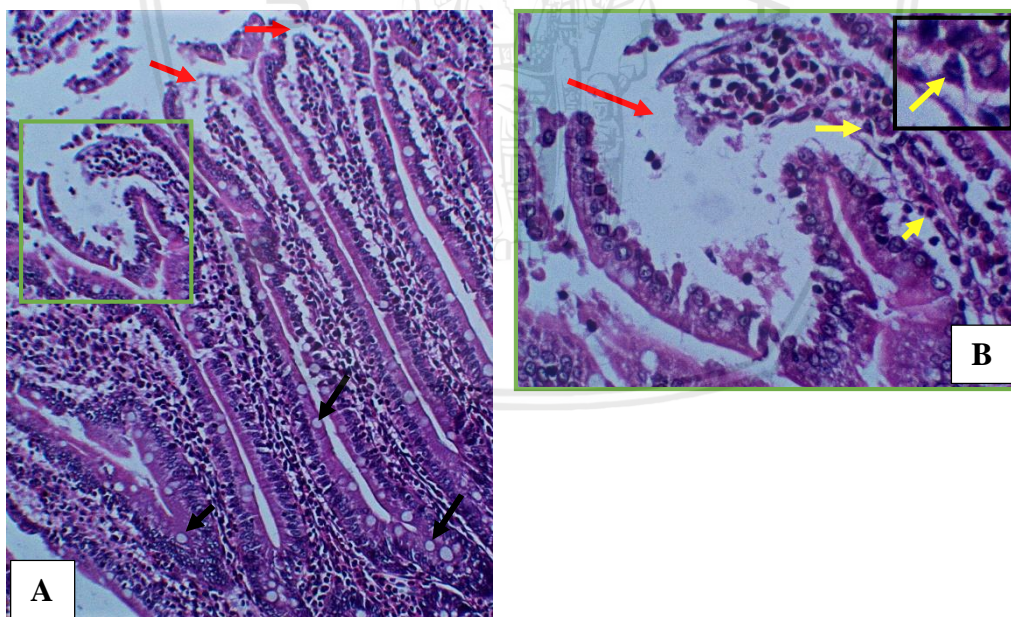
Gambar 5.1 Histopatologi Jejunum Kelompok Kontrol Negatif, (A) Perbesaran 100x, (B) Perbesaran 400x (↑) sel goblet



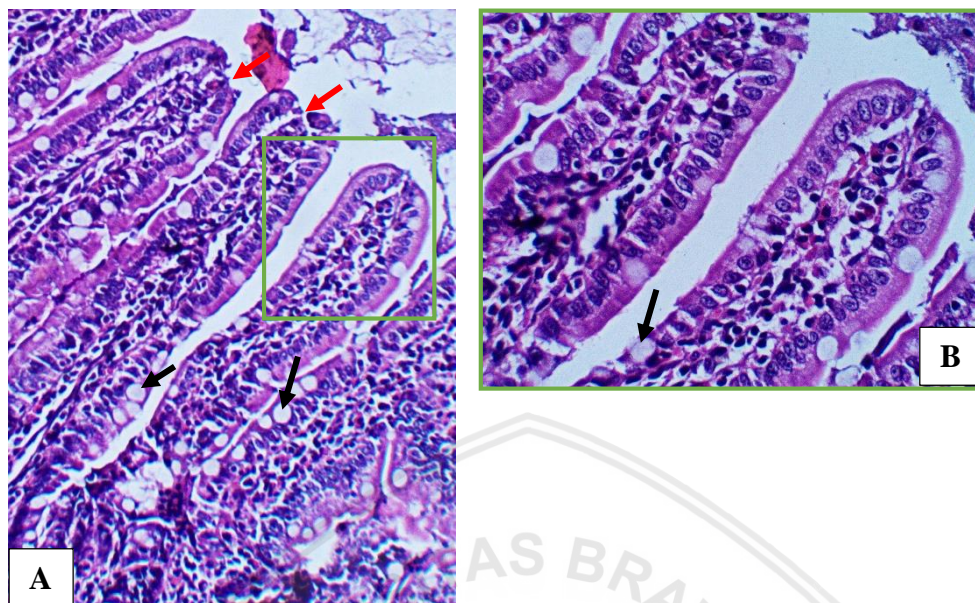
Gambar 5.2 Histopatologi Jejunum Kelompok Kontrol positif, (A) Perbesaran 100x, (B) Perbesaran 400x (↑) sel goblet, (↓) infiltrasi sel radang makrofag dan neutrofil, (↑) erosi pada vili, (↓) ruptur pada vili



Gambar 5.3 Histopatologi Jejunum Kelompok Perlakuan 1, (A) Perbesaran 100x, (B) Perbesaran 400x (↑) sel goblet, (↓) infiltrasi sel radang makrofag dan neutrofil, (↑) erosi pada vili, (↓) ruptur pada vili



Gambar 5.4 Histopatologi Jejunum Kelompok Perlakuan 2, (A) Perbesaran 100x, (B) Perbesaran 400x (↑) sel goblet, (↓) infiltrasi sel radang makrofag dan neutrofil, (↑) erosi pada vili



Gambar 5.5 Histopatologi Jejunum Kelompok Perlakuan 3, (A) Perbesaran 100x, (B) Perbesaran 400x (↑) sel goblet, (↑) erosi pada vili

Kelompok tikus kontrol positif (K+) pada **Gambar 5.2** menunjukkan adanya perbedaan gambaran mukosa jejunum dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif seperti ditunjukkan dengan adanya kerusakan pada struktur vili, hiperplasia sel goblet, erosi sel epitel, ruptur pada vili, dan infiltrasi sel radang berupa makrofag dan neutrofil. Hal ini sesuai dengan pernyataan Sharma and Barber (2014), induksi plumbum dapat menyebabkan perubahan histopatologi pada mukosa usus halus seperti kerusakan struktur vili, erosi epitel, dan infiltrasi sel radang. Vili merupakan bagian terpenting pada usus halus. Kondisi vili sejalan dengan fungsi absorpsi dalam saluran cerna. Vili pada usus halus yang utuh akan memperlancar transportasi nutrisi ke seluruh tubuh (Awad *et al*, 2008). Kerusakan struktur vili terjadi karena erosi dari sel epitel. Erosi merupakan daerah yang kehilangan sebagian mukosa (Prayoga dkk, 2016). Hal ini terjadi karena plumbum yang masuk dalam bentuk Pb^{2+} akan menghambat aktivitas enzim δ ALAD (Delta

Aminolevulinic Acid Dehydrogenase) dan menyebabkan peningkatan akumulasi ALA (Sugiharto, 2004). Peningkatan akumulasi ALA menyebabkan pembentukan radikal bebas yang akan memicu kondisi stress oksidatif dan menyebabkan peroksidasi lipid. Munculnya peroksidasi lipid dapat mempengaruhi fluiditas, struktur dan fungsi membran sel sehingga terjadi erosi epitel (Dambal, 2012). Kerusakan sel yang diakibatkan oleh plumbum akan menyebabkan sel-sel radang bermigrasi ke lokasi yang terdapat kerusakan. Menurut pernyataan Mansjoer (2003) bahwa sel – sel radang yang pertama keluar saat inflamasi adalah neutrofil. Fungsi utama neutrofil yakni sebagai fagosit partikel - partikel kecil dan materi asing termasuk mikroorganismenya. Neutrofil juga dapat melepaskan enzim protease yang berperan dalam penyembuhan luka, membersihkan jaringan luka yang mengalami nekrosis (Saptono dkk, 2014).

Sel goblet merupakan sel berbentuk seperti piala, tersebar di antara sel absorptive yang memiliki fungsi yakni menghasilkan mucus (musin) yang berfungsi untuk melindungi epitel mukosa dan memfasilitasi pergerakan ingesta makanan yang tidak terabsorpsi (Hestianah dkk, 2014). Musin yang disintesis merupakan campuran dari air, glikoprotein, glikolipid, elektrolit-elektrolit, enzim, garam, dan sekresi kelenjar. Induksi plumbum akan menyebabkan respon usus terhadap senyawa toksik yaitu dengan cara memperbanyak sel goblet sehingga dapat menghasilkan banyak mukus sebagai bentuk pertahanan jejunum dari zat toksik (Wuragil, 2007).

Gambaran histopatologi mukosa jejunum tikus kelompok perlakuan 1 dengan dosis 28 mg/200 g BB (**Gambar 5.3**) menunjukkan pada lapisan mukosa

jaringan sel epitel masih rusak, hiperplasia sel goblet, serta infiltrasi sel radang berupa makrofag dan neutrofil. Histopatologi mukosa jejunum tikus kelompok perlakuan 2 dengan dosis 56 mg/200 g BB (**Gambar 5.4**) menunjukkan pada lapisan mukosa masih adanya erosi epitel, hiperplasia sel goblet dan infiltrasi sel radang berupa makrofag dan neutrofil, namun sudah mengalami adanya perbaikan mukosa yang ditunjukkan oleh adanya jumlah sel goblet, sel – sel radang yang sedikit. Histopatologi jejunum tikus kelompok perlakuan 3 dengan dosis 112 mg/200 g BB (**Gambar 5.5**) menunjukkan perbaikan gambaran histopatologi mukosa jejunum yang hampir sama dengan kontrol negatif (K-) dimana struktur vili sudah tertata rapi, sel goblet tidak mengalami hiperplasia dan tidak ditemukannya sel radang. Berdasarkan hasil tersebut histopatologi jejunum kelompok perlakuan terapi preventif ekstrak kulit apel dengan dosis 28 mg/200 g BB (P1), 56 mg/200g BB (P2), dan 112 mg/200g BB (P3) menunjukkan adanya perbedaan bila dibandingkan dengan gambaran histopatologi jejunum pada kelompok kontrol positif (K+).

Flavonoid didalam ekstrak kulit apel *Rome Beauty* sebagai antioksidan secara langsung berfungsi untuk menetralsir efek toksik dari radikal bebas (Listyawati dkk, 2013). Peran flavonoid sebagai antioksidan yaitu dengan cara mendonorkan elektron hidrogennya kepada radikal bebas sehingga reaksi radikal bebas dapat terhambat (Rachmani, dkk, 2018). Radikal bebas yang terhambat akan menurunkan stress oksidatif sehingga kerusakan membran sel juga dapat dicegah. Antioksidan juga berfungsi membantu tunika mukosa jejunum menunjang kerjanya sebagai penyerapan nutrisi makanan yang masuk melalui proses enzimatik secara

normal (Mardasella, 2018). Pada hasil pengamatan histopatologi jejunum tikus diterapi ekstrak kulit apel *Rome beauty* menunjukkan perbaikan gambaran terbaik yaitu pada terapi ekstrak kulit apel *Rome beauty* dosis 112 mg/200g BB.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemberian terapi preventif ekstrak kulit apel *Rome Beauty* dengan dosis 112 mg/ 200 g BB merupakan dosis efektif dalam mencegah kenaikan aktivitas protease jejunum tikus yang diinduksi plumbum asetat.
2. Pemberian terapi preventif ekstrak kulit apel *Rome Beauty* dapat memperbaiki gambaran histopatologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) berupa berkurangnya hiperplasia sel goblet, infiltrasi sel radang, dan kerusakan epitel pada vili dibandingkan dengan kelompok perlakuan positif (K+) dengan dosis efektif yaitu 112 mg/ 200 g BB.

6.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaplikasian ekstrak kulit apel yang tepat

DAFTAR PUSTAKA

- Arief H., dan M.A Widodo. 2018. Peranan Stres Oksidatif Pada Proses Penyembuhan Luka. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Wijay Kusuma*. 5(2): 22-29
- Andriani, S. R. D. 2016. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Apel Manalagi (*Mallus Sylvestris* Mill) terhadap Kadar Malondialdehid dan Gambaran Histopatologi Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Yang Terkena Diabetes Mellitus Ti [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya
- Awad W. A., K. Ghareeb., and Nitch. 2008. Effect of Dietary Inclusion of Probiotic, Prebiotic, and Symbiotic on Intestinal Glucose Absorbtion of Broiler Chickens. *International Journal of Poultry Science*. 7: 688 – 691
- Badan Standarisasi Nasional, 2009. SNI 7387:2009 tentang Batas Maksimum Cemaran Logam Berat Dalam Pangan, BSN.
- Boyer, J., and R. H. Liu,. 2004. Apple Phytochemicals And Their Health Benefits. *Nutrition Journal*. 3(5): 1-15.
- Cempaka, A.R., S. Santoso., dan L.K. Tanuwijaya. 2014. Pengaruh Metode Pengolahan (Juicing Dan Blending) Terhadap Kandungan Quercetin Berbagai Varietas Apel Lokal Dan Impor (*Malus domestica*). *Indonesian Journal of Human Nutrition*. 1(1): 14-22
- Chakraborti, S., and N.S. Dhalla. 2017. *Proteases in Physiology and Pathology*. Springer. Singapore
- Chapman, H. A., R. J Riese., and G. P Shi.1997. Emerging roles for cysteine protease in human biology. *Annu Rev Physiol*. 59:63 – 88
- Chattopadhyay, I, U. Bandyopadhyay., K. Biswas., P. Maity., and R,K. Banerjee. 2006. Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen- medicated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen. *Free Radical Biology Med*. 40: 1397-1408.
- Dambal, S. S., dan S. Kumari. 2012. Evaluation of Lipid Peroxidation and Total Antioxidant Status in Human Obesity. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*. 2(3): 62-68.
- Fahrudin. 2018. *Pengelolaan Limbah Pertambangan Secara Biologis: Biological Management of Mining Waste*. Edisi pertama. Celebes Media Perkasa. Makasar. 98
- Gurer-Orhan, H., H.U Sabir., and H Ozgunez. 2004. Correlation Between Clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parametrs in control and Lead exposed wokers toxicology. 195:147-154.



- Guyton, A. C., and Hall, J. E. 2013. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 12. Jakarta: EGC
- Hardiany, N. S. 2013. *Cathepsin dan Calpain : Enzim Pemecah Protein dalam Sel* *Cathepsin and Calpain : Proteolytic Enzyme in Cell*. Departemen Biokimia & Biologi Molekuler. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Hariani, S.W. 2016. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 96% Tumbuhan Paku *Nephrolepis falcate* (Cav.) C.Chr terhadap Penyembuhan Luka Bakar Derajat Dua Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Galur *Sprague Dawley* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan. Universitas Hidayatullah Jakarta
- Handayanto, E., Y. Nuraini., N. Muddarisna., N. Syam., dan A. Fiqri. 2017. *Fitoremediasi dan Phytomining Logam Berat Pencemar Tanah*. Cetakan pertama. UB Press. Malang
- Handoko, T., Aulanni'am., dan D.A. Oktavianie. 2015. Pengaruh Terapi Ekstrak Etanol Akar Seledri (*Apium graveolens*) terhadap Aktivitas Protease dan Gambaran Histopatologi Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) Model IBD (Inflammatory Bowel Disease) Hasil Induksi Indometasin [Skripsi]. Program Studi Kedokteran Hewan Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya Malang
- Hestianah, E.P., C, Anwar., S. Kuncorojakti., dan L.R Yustinasari. 2014. *Buku Ajar Histologi Veteriner*. Surabaya: FKH UNAIR.
- Irawati, R. 2016. Karakterisasi pH, Suhu, dan Konsentrasi Substrat Pada Enzim Selulase Kasar Yang Diproduksi Oleh *Bacillus circulans* [Skripsi]. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
- Iswara, A. 2009. Pengaruh Pemberian Antioksidan Vitamin C dan E terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Putih Terpapar *Allethrin* [Skripsi]. Fakultas Ilmu Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Semarang
- Jaishankar, M., T. Tseten., N. Anbalagan., B.B. Mathew., and K.N. Beeregowda. 2014. Toxicity, Mechanism and Health Effects Of Some Heavy Metals. 7(2): 60-72
- Janardani, N.M.K., I.K Berata., dan I.M. Kardena. 2018. Studi Histopatologi dan Kadar Timbal pada Ginjal Sapi Bali di Tempat Pembuangan Akhir Suwung Denpasar. *Indonesia Medicus Veterinus*. 7(1): 42-50
- Johnson, M. 2012. Laboratory Mice and Rats. <https://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>. [10 April 2019]

- Jusuf, A.A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia Depok.
- Kafiar, F.P., P. Setyono., dan A.R. Handono. 2013. Analisis Pencemaran Logam Berat (Pb dan Cd) Pada Sapi Potong Di Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Sampah Putri Cempo Surakarta. *Jurnal Ekosains*. 5(2): 32-39
- Kararli T. T. 1995. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos*. 16(5): 351-380.
- Kasari, C. O. 2018. Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa terhadap Aktivitas Protease Dan Histopatologi Lambung Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Plumbum (Pb) [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya
- Kiara, C. 2013. Alasan Tikus Dipilih sebagai Hewan Percobaan. <http://www.ceritamu.com/cerita/Alasan-Tikus-Dipilih-Sebagai-Hewan-Percobaan> [08 Desember 2018].
- Kusrieningrum, R. 2008. Dasar Perancangan Percobaan Rancangan Acak Lengkap. Universitas Airlangga. Surabaya
- Lata, B., and Tomala K. 2007. Apple Peel As A Contributor To Whole Fruit Quantity Of Potentially Healthful Bioactive Compound. Cultivar and Year Implication. 55(26): 10795-10802
- Lee, K.W., Y.J Kim., D. Kim., H.J Lee., and C.Y Lee. 2003. Major Phenolics In Apple and Their Contribution To The Total Antioxidant Capacity. *J Agric Food Chem*. 51(22):6516-6520
- Listyawati, D.E., Aulanni'am, dan Herawati. 2013. Efek Terapi Perasan Buah Labu Siam (*Sechium edule*) terhadap Aktivitas Protease Dan Ekspresi TNF- α Pada Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) Inflammatory Bowel Disease (IBD) Hasil Induksi Indometasin. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Hewan*. Universitas Brawijaya. 4 (3): 3.
- Lubis, B., N. Rosdiana., S. Nafianti., O. Rasyianti., dan F.M. Panjaitan. 2013. Hubungan Keracunan Timbal dengan Anemia Defisiensi Besi Pada Anak. 40(1): 17-21
- Luthfiyah, S. 2005. Pengaruh Pemberian Plumbum (Pb) Asetat Peroral terhadap Gambaran Histologik Hepar Mencit (*Mus musculus*) [Tesis]. Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga
- Maalik, A., F.A. Khan., A. Mumtaz., A. Mehmood., S. Azhar., M. Atif., S. Karim., Y. Altaf., and I. Tariq. 2014. Pharmacological Applications of Quersetin and its Derivatives: A Short Review. 13(9)

- Mansjoer, A. 2003. *Kapita Selekta Kedokteran*. Media Aesculpius. Jakarta
- Mardasella, A. 2018. Pengaruh Preventif Madu Hutan Sumbawa terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) Dan Histopatologi Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Plumbum (Pb) [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya
- Mason, L.H., J.P. Harp., and D.Y. Han. 2014. Pb Neurotoxicity: Neuropsychological Effects of Lead Toxicity. *BioMed Research International*
- Maula, I.F. 2014. Uji Antifertilitas Ekstrak N-Heksana Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) Pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Galur *Sprague Dawley* Secara *In Vivo* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan. Universitas Hidayatullah Jakarta
- Mayhew, T. M., and C. Middleton. 1985. Crypts, villi and microvilli in the small intestine of the rat. A stereological study of their variability within and between animals. *Journal of anatomy*. 141:1-17.
- McConnell E. L., A. W. Basit., and S. Murdan. 2008. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 60(1): 63-70.
- Mulyadi., H.J. Mukono., dan H. Notopuro. 2015. Paparan Timbal Udara terhadap Timbal Darah, Hemoglobin, Cystatin C Serum Pekerja Pengecatan Mobil. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. 11(1): 87-95
- Muntha, M. 2001. Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (H&E). Balai Penelitian Veteriner Bogor. Hal. 156-163
- Nelma. 2008. Pengaruh Pemberian Vitamin C terhadap Aktivitas Enzim Delta Aminolevulinic Acid Dehydratase (δ -ALAD), Kadar Hemoglobin dan Basophilic Stippling Pada mencit Yang Dipapar Plumbum [Tesis]. Sekolah Pascasarjana. Universitas Sumatera Utara
- Nurfitriani, R. 2017. Respon Kalus Beberapa Varietas Apel terhadap Konsentrasi Asam Amino Fenilalanin Yang Berbeda Sebagai Prekursor Metabolit Sekunder Quersetin [Skripsi]. Fakultas Pertanian Peternakan. Universitas Muhammadiyah Malang
- Nzalak, J.O., N. Wanmi., J. Imam., M.N Ali., and A.D. Unmosen. 2015. Anatomical and Histological Studies of the Small Intestine of the African Giant Rat (*Cricetomys gambianus*-Water house)- II. 3(4): 20-26
- Octaviany, V.D., H. Yusmani., dan K. Simanjuntak. 2017. Uji Efektivitas Ekstrak Kulit Apel (*Malussylvestris*-mill) Var. Rome Beauty terhadap Kadar Enzim SGPT Tikus (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar yang Diinduksi CCL4 (Karbon Tetra Klorida). *Jurnal Profesi Medika*. 11(2)

- Palar, H. 2008. *Pencemaran dan Toksikologi Logam Berat*. Cetakan kelima. PT Rineka Cipta. Jakarta
- Pakaya, D. 2014. Peranan Vitamin C Pada Kulit. *Jurnal Ilmiah Kedokteran*. 1(2): 45-54
- Prayoga R. D., R. Kurnijasanti., dan P. Hastutiek. 2016. Pengaruh Ekstrak Batang Pisang Ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum*) terhadap Gambaran Histopatologi Jejunum Tikus (*Rattus norvegicus*) *Inflammatory Bowel Disease*. *Journal of Basic Medicine Veterinary*. 5(1): 16-21
- Purwaningsih I., R. Sapriani., dan R. Indrawati. 2018. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kesum (*Polygonum minus* Huds.) Metode DPPH. *Jurnal Laboratorium Khatulistiwa*. 2(2): 161-165
- Puspita, E C. 2014. Pengaruh Pemberian Metanil Yellow Peroral Dosis Bertingkat Selama 30 Hari terhadap Gambaran Histopatologi Duodenum Mencit Balb/c. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*
- Persada, N. I. 2009. Pengaruh Ekstrak Kulit Apel Rome Beauty dalam Mengurangi Kerusakan Histologis Hati Mencit yang Diinduksi CCl₄ [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret
- Priyono, O. 2013. Kajian Kadar Dan Sebaran Logam Berat Timbal (Pb) Dalam Daging, Hati, Dan Ginjal Ayam Broiler [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor
- Rachmani, E., S. Pramono., dan A.E. Nugroho. 2018. Aktivitas Antioksidan Fraksi Flavonoid Bebas Andrografolid Dari Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata*). *Pharmacy Medical Journal*. 1(2): 42-49
- Rakanita Y., L. Hastuti., J. Tandi., dan S. Mulyani. 2017. Efektivitas Antihiperurisemia Ekstrak Etanol Daun Seledri (EEDS) Pada Tikus Induksi Kalium Oksonat. *J. Trop. Pharm. Chem*. 4(1):1-6
- Redha A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat, Antioksidatif dan Peranannya Dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian*. 9(2): 196-202
- Romli, M., Suhartono., dan O. Setiani. 2016. Hubungan Kadar Plumbum (Pb) Dalam Darah dengan Prestasi Belajar Pada Anak Sekolah di SDN Grinting 01 Kecamatan Bulakamba Kabupaten Brebes. *Jurnal Kesehatan Lingkungan Indonesia*. 15(2): 36-41
- Rosahdi, T. D., M. Kusmiyati., dan F.R. Wijayanti. 2013. Uji Aktivitas Daya Antioksidan Buah Rambutan Rapih Dengan Metode DPPH. 7(1):1-15
- Saptono H., Aulanni'am., dan Herawati. 2014. Terapi Perasan Buah Labu Siam (*Sechium edule*) terhadap Aktivitas Protease dan Gambaran Histopatologi

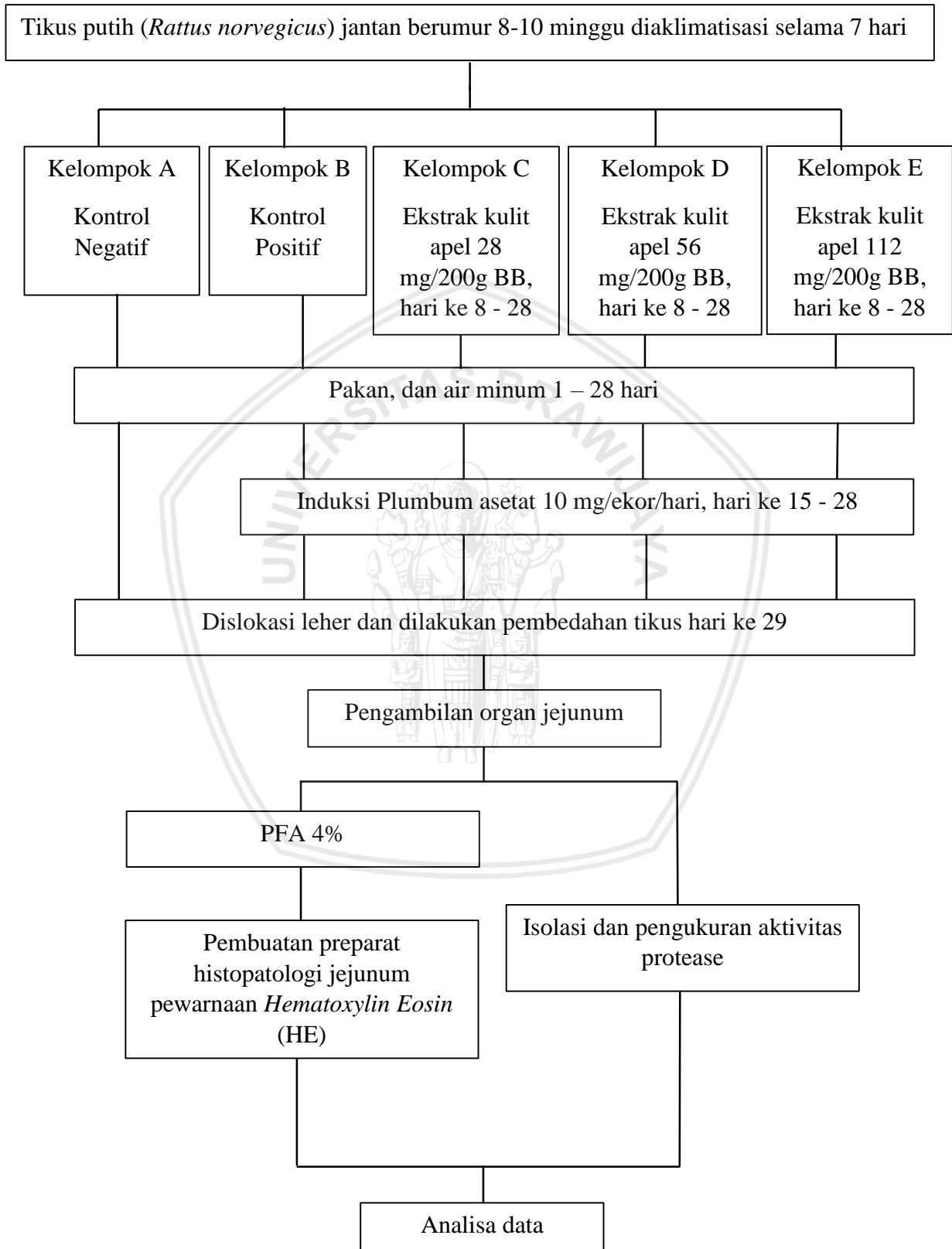
Kolon Tikus (*Rattus norvegicus*) IBD (Inflammatory bowel disease) Hasil Induksi Indometasin. 3(4): 2

- Sembel, D. T. 2015. *Toksikologi Lingkungan*. Edisi pertama. Penerbit Andi. Yogyakarta. 108
- Setiawan, T. 2014. Heavy Metal: Pb (Plumbum/ Lead) dan Interaksi Dengan Protein.//https://www.academia.edu/5992378/Heavy_metal_Pb_plumbum_Lead_dan_Interaksi_dengan_Protein. [15 November 2018]
- Sharma, B., S. Singh., and N.J. Siddigi. 2014. Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems. *BioMed Research International*. (4):1-26.
- Sharma, R. and I. Barber. 2014. Lead Toxicity and Postnatal Development of Gastrointestinal Tract. *Universal Journal of Environmental Resarch and Technology*. 4(3): 121-133
- Sholichah, N. A., Aulanni'am., dan C. Mahdi. 2012. Efek Terapi Ekstrak Air Daun Kedondong (*Lannea coromandelica*) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Aktivitas Protease pada Ileum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Inflammatory Bowel Disease (IBD) Akibat Paparan Indometasin. *Jurnal Veterinaria Medika*. 5(3): 187-194
- Suckow, M. A., S.H Weisbroth., and C.L. Franklin. 2006. *The Laboratory Rat*. London: Elsevier Academic Press
- Sudarmaji., J. Mukono., dan I.P. Corie. 2006. Toksikologi Logam Berat B3 dan Dampaknya terhadap Kesehatan. *Jurnal Kesehatan Lingkungan*.2(2): 129-142
- Sudoyo, A.W., S. Setiati., I. Alwi., M. Simadibrata., B. Setiyohadi., dan A.F. Syam. 2016. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi kelima. Interna Publishing. Jakarta
- Sufrida, Y. 2007. *Khasiat dan Manfaat apel*. Jakarta: PT Agromedia Pustaka. Hal. 23-24
- Sugiharto. 2004. Pengaruh Infus Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) terhadap Kadar Hemoglobin Jumlah Eritrosit Tikus Putih Yang Diberi Larutan Plumbum Nitrat [(PbNO₃)₂]. *Berk. Penel. Hayati*: 10 (53–57)
- Sumardjo, D. 2009. *Pengantar Kimia: Buku Panduan kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata I Fakultas Bioeksakta*. Edisi pertama. EGC. Jakarta
- Suprijono, A., Chodijah, dan S. Banun. 2011. Pengaruh Pemberian Timbal (Pb) Per Oral terhadap Gambaran Histopatologi Hepar. *Jurnal Majalah Ilmiah Sultan Agung*. Volume 49 Nomor 123


- Susanti, R., dan F. Fibriana. 2017. *Teknologi Enzim*. Edisi pertama. Penerbit Andi. Yogyakarta
- Sy, E., H. Kadri., dan E. Yerizel. 2015. Efek Pemberian Vitamin C terhadap Aktifitas Katalase Hati Tikus Galur Wistar yang Terpapar Ion Pb. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 4(1): 279-285
- Taylor. 2018. Anatomy and Fisiology of Jejunum. www.innerbody.com. [Diakses pada 26 Mei 2019].
- Tjay, T.H., dan K. Rahadja. 2007. *Obat – obatan Penting: Khasiat, Penggunaan dan Efek – efek Sampingnya*. Edisi keenam. PT Eles Media Komputindo. Jakarta
- Treuting P., S. Dintzis., and K.S. Montine. 2018. *Comparative Anatomy And Histology A Mouse, Rat, And Human Atlas*. Edisi kedua. Elsevier Inc. London
- Waji, R.A, dan Sugrani A. 2009. Flavonoid (Quercetin). // <https://pasche08.files.wordpress.com/2009/05/copy-of-copy-of-makalah-quercetin-2003.pdf>. [12 Desember 2018]
- Wani, A., A. Ara., and J.A. Usmani. 2015. Lead Toxicity: A Review. 8(2): 55-64
- Wati, I.P., Aulanni'am., dan C. Mahdi. 2013. Aktivitas Protease dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi Cyclosporine-A. *Kimia Student Journal*. 1(2): 257-263
- Weiss, S.J. 1989. Tissue Destruction by Neutrophil. *New Engl J. med*. 320: 365 – 375
- Wolfe, K., X. Wu., and R.H. Liu. 2003. Antioxidant activity of apple peel. *J Agri Food Chem*. 51(3): 609-14
- Wuragil, L. R. 2007. Gambaran Hstopatologi Pencernaan Tikus pada Pemberian Fraksi Asam Amino Non-Protein dan Fraksi Polifenol Lamtoro Merah (*Acacia villosa*) [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor
- Yuniati R., T.T. Nugroho., dan F. Puspita. 2015. *Jurnal Online Mahasiswa FMIPA*. 1(2): 116-122



Lampiran 1. Kerangka Operasional Penelitian



Lampiran 2. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 1087-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**



PENELITIAN BERJUDUL : PENGARUH TERAPI PREVENTIF EKSTRAK KULIT
APEL (*Malus sylvestris Mill*) VARIETAS ROME BEAUTY
TERHADAP PRIFIL PITA PROTEIN DAN
HISTOPATOLOGI DUODENUM TIKUS (*Rattus
norvegicus*) YANG DIPAPAR PLUMBUM ASETAT

PENELITI : NUR FITRIA RAMADHANI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 17 Februari 2019
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

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

Lampiran 3. Pembuatan Ekstrak Kulit Apel *Rome Beauty*



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL
MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu
KOTA BATU

65313

SURAT KETERANGAN EKSTRAK

No. 074 / 17C / 102.7 / 2019

Bersama ini kami sampaikan hasil ekstraksi berikut ini :

1. Identitas Pemohon

NAMA	NIM	
GEMA ERNEST NADHRATA	155130107111030	FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
TARSISIUS HANDARU CAHYO P	155130101111052	UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DEVINA ANDINI GHASSANA	155130101111043	
AFNA HANUNNIDA	155130101111047	
NUR FITRIA RAMADHANI	155130101111050	

2. Identitas Sampel

- Nama daerah sampel : Apel
- Nama latin : *Malus sylvestris* Mill
- Bagian sampel : Kulit
- Bentuk sampel : Serbuk
- Asal sampel : Batu
- Jumlah sampel : 170 gram

3. Hasil

No.	Parameter	Hasil
1	Proses	
	a. Metode	Maserasi
	b. Jumlah perlakuan	1 kali
	c. Pelarut	Etanol 70%
	d. Jumlah pelarut	1700 ml
	e. Waktu evaporasi	1.5 jam
2	Hasil	
	a. Bentuk sediaan	Cair
	b. Bahan tambahan	-
	c. Kadar air	-
	d. Berat / volume	60 ml

4. Pustaka

- Ditjen POM, 1986. "Sediaan Galenik", Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Sudjadi, 1986. "Metode Pemisahan", UGM Press, Yogyakarta.
- Nugroho, Agung. 2017. "Teknologi Bahan Alam". Lambung Mangkurat University Press. Banjarmasin.

Demikian disampaikan untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 28 Februari 2019
 Kepala UPT Laboratorium Herbal
 Materia Medica Batu

Dr. Husni R.M. Drs. Apt. MKes.
 NIP.19611102 199103 1 003



Lampiran 4. Hasil Uji Kualitatif Ekstrak Kulit Apel Varietas *Rome Beauty*



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL
MATERIA MEDICA BATU
Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu
KOTA BATU

65313

Nomor : 074 / 14D / 102.7 / 2019
Sifat : Biasa
Perihal : **Surat Keterangan Analisa Kualitatif**

Bersama ini kami sampaikan hasil analisa berikut ini :

1. Identitas Pemohon

Nama	NIM	Fakultas
Gema Ernest Nadhrata	155130107111030	Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya
Tarsisius Handaru Cahyo Putro	155130101111052	
Devina Andini Ghassana	155130101111043	
Afna Hanunnida	155130101111047	
Nur Fitria Ramadhani	155130101111050	

2. Identitas Sampel

Nama daerah sampel : Apel
Nama latin : *Malus Sylvestris Mill.*
Bagian sampel : Kulit
Bentuk sampel : Ekstrak
Pelarut : Etanol 70%
Asal sampel : -
Tanggal penerimaan : 28 Februari 2019
Tanggal pemeriksaan : 88 Februari 2019

3. Hasil

No	Identifikasi Senyawa	Parameter	Hasil
1.	Flavonoid	Merah Bata, Merah Muda, Merah Tua	Positif
2.	Vitamin C	Endapan Hijau Kekuningan sampai Merah Bata	Positif

4. Lampiran

Nama Sampel	Flavonoid	Vitamin C
Kulit Apel Manalagi (<i>Malus Sylvestris Mill.</i>)		

5. Pustaka

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1978. "Materia Medika Indonesia", Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.

Demikian disampaikan untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 01 Maret 2019
Kepala UPT Materia Medica Batu

Dr. Husin RM, Drs., Apt. MKes.
NIP.19611102 199103 1 003

Lampiran 5. Hasil Uji Statistik Aktivitas Protease Jejunum

A. Uji deskriptif

Descriptives

protease

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					K-	4		
K+	4	5.9900	.36742	.18371	5.4053	6.5747	5.54	6.44
P1	4	4.8400	.38192	.19096	4.2323	5.4477	4.56	5.38
P2	4	4.4500	.16753	.08377	4.1834	4.7166	4.24	4.65
P3	4	4.2550	.15631	.07816	4.0063	4.5037	4.08	4.46
Total	20	4.7240	.73626	.16463	4.3794	5.0686	4.00	6.44

B. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

protease

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.152	4	15	.371

Keterangan: Data dikatakan homogen jika $\text{sig} > 0,05 (\alpha)$

C. Uji Normalitas Data

Tests of Normality

kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Protease K-	.274	4	.	.939	4	.650
K+	.250	4	.	.945	4	.683
P1	.252	4	.	.841	4	.200
P2	.250	4	.	.954	4	.742
P3	.263	4	.	.954	4	.743

a. Lilliefors Significance Correction

Keterangan: Uji normalitas menunjukkan hasil p (signifikan) > 0.05 , hal ini menunjukkan bahwa data berdistribusi normal dan dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.

D. Uji *One-Way* ANOVA

ANOVA

protease

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.278	4	2.320	34.071	.000
Within Groups	1.021	15	.068		
Total	10.299	19			

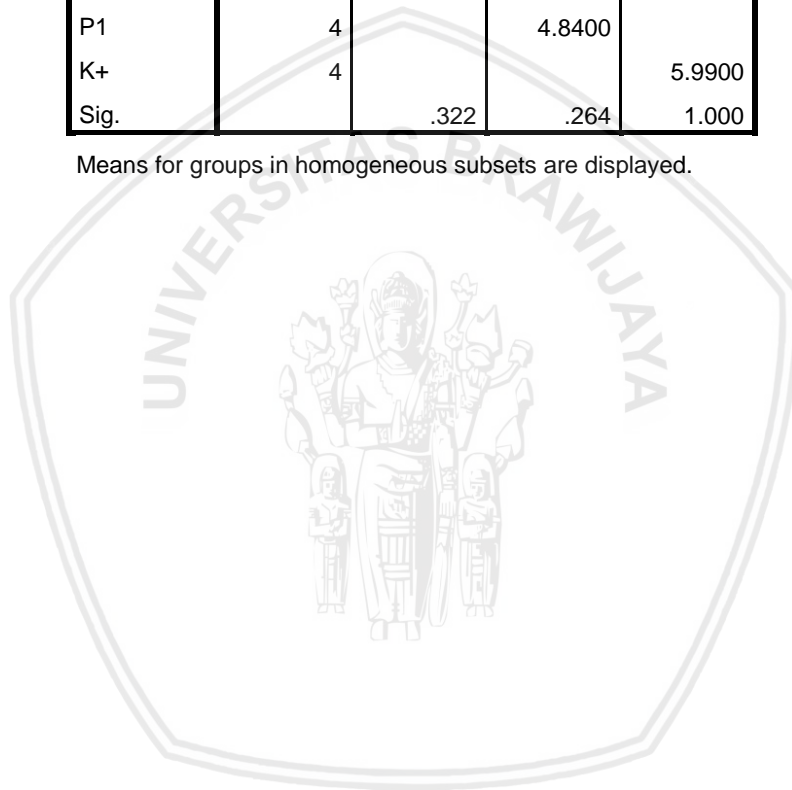
Keterangan: Sig < 0,05 ($\alpha = 5\%$) yng berarti terdapat minimal satu perbedaan antara kelompok perlakuan

E. Uji lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ) / Tukey

proteaseTukey HSD^a

kelompok	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
K-	4	4.0850		
P3	4	4.2550		
P2	4	4.4500	4.4500	
P1	4		4.8400	
K+	4			5.9900
Sig.		.322	.264	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.



Lampiran 6. Perhitungan Dosis Ekstrak Kulit Apel

1. Dosis 1 = 28 mg/ 200g
 BB rata – rata tikus kelompok 1 = 197 g
 Konsentrasi ekstrak kulit apel = 1000 mg/ mL

 Dosis yang diberikan = $\frac{28\text{mg}/200\text{g}}{1000\text{mg}/\text{mL}} \times 197\text{gram}$
 = **0,0276 mL**
 Volume aquadest = 1 mL – 0,0276 mL = 0,97 mL

2. Dosis 2 = 56 mg/ 200g
 BB rata – rata tikus kelompok 2 = 181g
 Konsentrasi ekstrak kulit apel = 1000 mg/ mL

 Dosis yang diberikan = $\frac{56\text{mg}/200\text{g}}{1000\text{mg}/\text{mL}} \times 181\text{gram}$
 = **0,0507 mL**
 Volume aquadest = 1 mL – 0,0507 mL = 0,95 mL

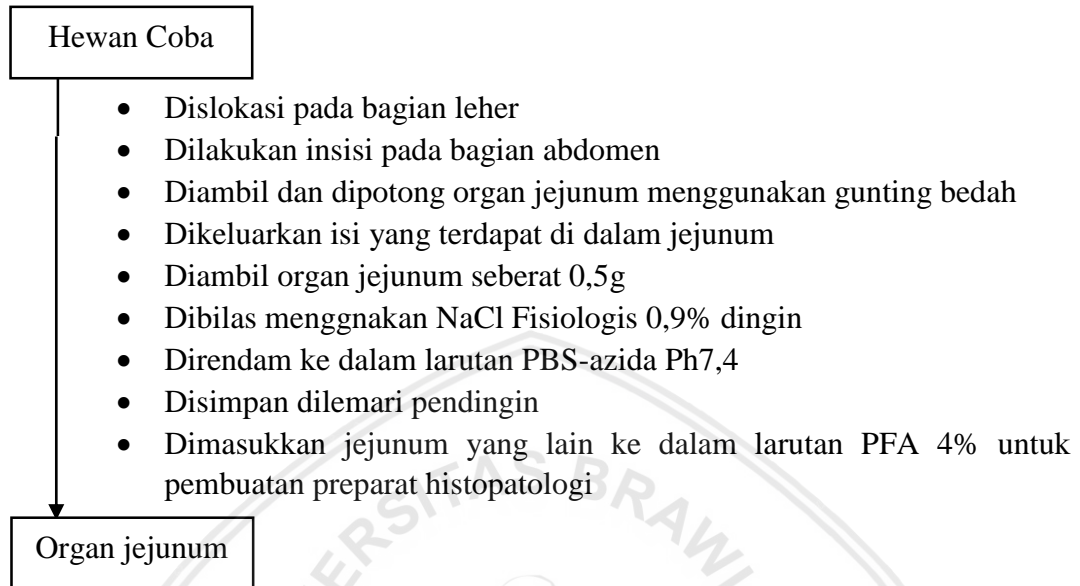
3. Dosis 3 = 112 mg/ 200g
 BB rata – rata tikus kelompok 3 = 205,6 g
 Konsentrasi ekstrak kulit apel = 1000 mg/ mL

 Dosis yang diberikan = $\frac{112\text{mg}/200\text{g}}{1000\text{mg}/\text{mL}} \times 205,6$
 Volume aquadest = 1 mL – 0,115 mL = 0,885 mL

Lampiran 7. Perhitungan Dosis Pb

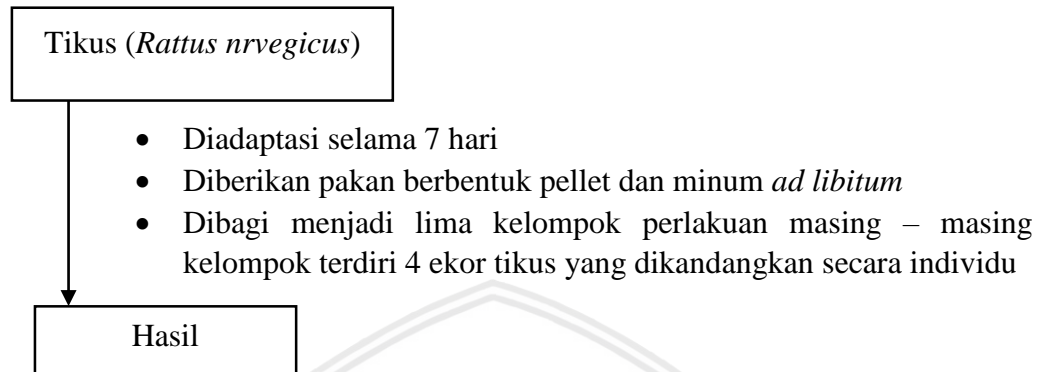
- Dosis Pb asetat = 10 mg/ ekor/ hari
- Dosis Pb asetat perhari = 10 mg x jumlah tikus
 = 10 mg x 16 ekor
 = 160 mg/ hari = 0,16 g/ hari

Pb asetat yang diberikan dilarutkan dalam 1 mL aquades sehingga volume satu kali pemberian adalah 1 mL/ekor/hari.

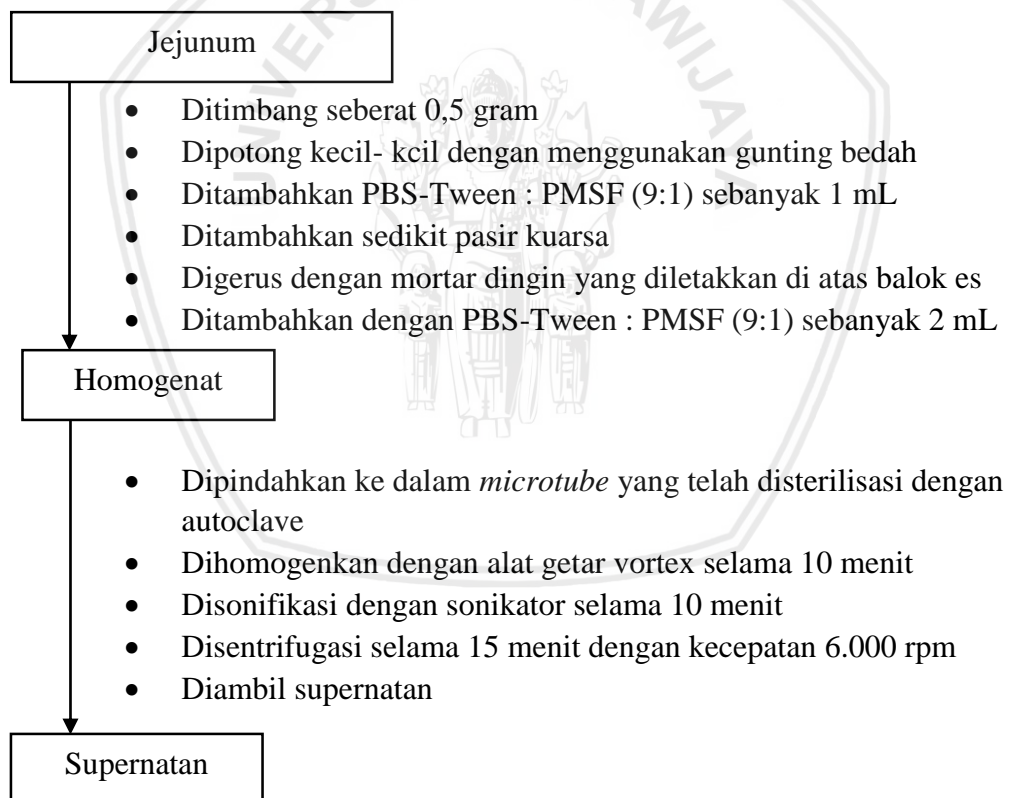
Lampiran 8. Isolasi Organ Jejunum

Lampiran 9. Langkah Kerja Penelitian

A. Persiapan Hewan Coba



B. Isolasi Protein Organ



- Ditambah etanol absolut dingin (1:1)
- Dibiarkan selama 24 jam pada suhu 4°C hingga membentuk endapan
- Disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm
- Diambil endapannya

Endapan

- Dikeringkan sampai bau etanol hilang
- Ditambahkan larutan 0,02 M Tris-Hcl pH 6,5 (1:1)
- Dihomogenisasi

Ekstrak kasar Isolat Protein

C. Pengukuran Aktivitas Protease

Kasein 1%

- Dikeringkan sampai bau etanol hilang
- Dimasukkan ke *microtube*
- Ditambahkan 150 μ L buffer fosfat 0,1 M
- Ditambahkan 50 μ L ekstrak kasar protein
- Didiamkan selama 60 menit pada suhu 37°C
- Ditambahkan 200 μ L TCA 4%
- Didiamkan 30 menit pada suhu 37°C
- Disentrifugasi 4.000 rpm selama 10 menit
- Diambil supernatan

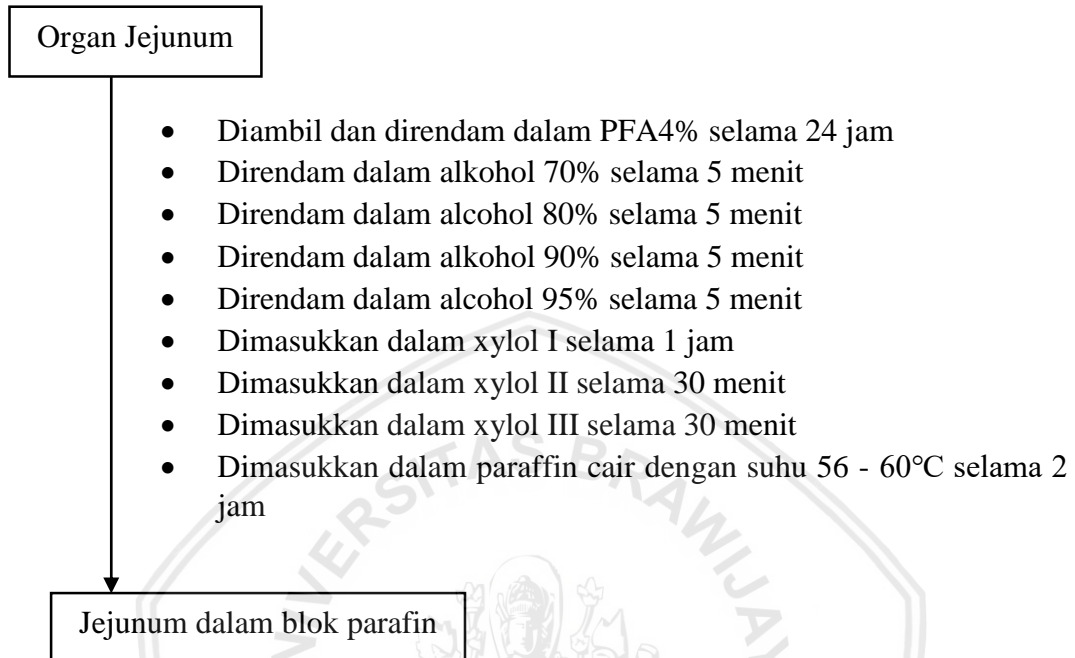
Supernatan

- Diambil 200 μ L
- Diencerkan dengan buffer fosfat pH 7 hingga 4x volume awal
- Diukur nilai awal absorbannya pada lambda maksimum tirosin (nm)

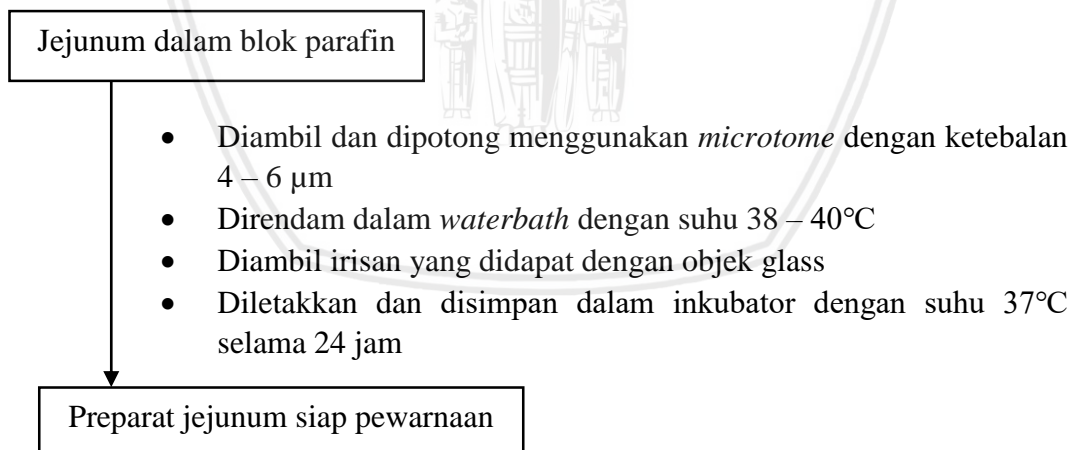
Hasil

D. Pembuatan Preparat Histopatologi

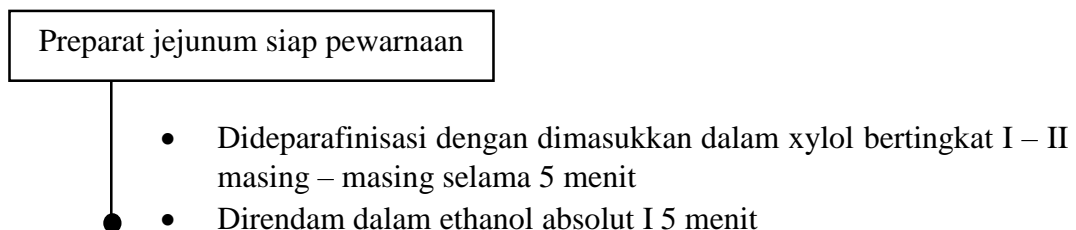
a. Tahap *Embedding* Jejunum



b. Tahap Sectioning dan Mounting



c. Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)



- Direndam dalam alkohol 90% selama 5 menit
- Direndam dalam alkohol 80% selama 5 menit
- Dicuci dengan air mengalir selama 1 menit
- Dimasukkan dalam Hematoxylin selama 5 menit
- Dicuci dengan air mengalir selama 1 menit
- Dimasukkan dalam larutan Eosin selama 5 menit
- Dicuci dengan air mengalir selama 1 menit
- Dimasukkan dalam alkohol 80% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam alkohol 90% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam ethanol absolut I selama 5 menit
- Dimasukkan dalam xylol I selama 1 menit
- Dimasukkan dalam xylol II selama 1 menit
- Diberi entelan dan ditutup dengan *cover glass*

Preparat Jejunum

