

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

SKRIPSI

Oleh:

NUR FITRIA RAMADHANI

155130101111050



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

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

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

NUR FITRIA RAMADHANI

155130101111050



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**PENGARUH TERAPI PREVENTIF EKSTRAK KULIT APEL (*Malus sylvestris Mill*) VARIETAS *ROME BEAUTY* TERHADAP PROFIL PITA PROTEIN DAN HISTOPATOLOGI DUODENUM TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIPAPAR PLUMBUM ASETAT****Oleh:****NUR FITRIA RAMADHANI
155130101111050**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 25 Juni 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP. 19630404 198701 10 010**drh. Nurina Titisari, M.Sc**
NIP. 19860122 201504 2 001

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 dibawah ini:

Nama : Nur Fitria Ramadhani
NIM : 155130101111050
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Terapi Preventif Ekstrak Kulit Apel (*Malus sylvestris Mill*) Varietas *Rome Beauty* terhadap Profil Pita Protein dan Histopatologi Duodenum Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar 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 saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 25 Juni 2019
Yang menyatakan,

(Nur Fitria Ramadhani)
NIM. 155130101111050

Pengaruh Terapi Preventif Ekstrak Kulit Apel (*Malus sylvestris Mill*) Varietas *Rome Beauty* terhadap Profil Pita Protein dan Histopatologi Duodenum Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Plumbum Asetat

ABSTRAK

Cemaran plumbum yang masuk ke dalam tubuh melalui sistem pencernaan dapat mempengaruhi organ-organ pencernaan, salah satunya duodenum. Plumbum yang masuk ke dalam tubuh akan menjadi radikal bebas dan mengakibatkan kerusakan jaringan pada duodenum. Radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh dapat dihambat dengan adanya antioksidan yang berasal dari luar tubuh (antioksidan eksogen). Salah satu buah yang kaya akan kandungan antioksidan yaitu buah apel, baik daging buah ataupun kulitnya. Kulit apel mengandung senyawa fenolik yang paling penting yaitu flavonoid yang bertindak sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh terapi preventif ekstrak kulit apel (*Malus sylvestris Mill*) varietas *Rome Beauty* terhadap profil pita protein dan histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar plumbum asetat. Penelitian ini dibagi dalam 5 kelompok perlakuan dengan setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4 tikus, yaitu kontrol negatif, kontrol positif dengan pemberian plumbum asetat 10 mg/ekor/hari selama 14 hari, dan kelompok terapi preventif dengan ekstrak kulit apel *Rome Beauty* 28 mg/200 g BB, 56 mg/200 g BB, dan 112 mg/200 g BB selama 21 hari dan pemberian plumbum asetat dengan dosis 10 mg/ekor/hari selama 14 hari. Profil pita protein duodenum dianalisa secara kualitatif dengan metode SDS-PAGE dan gambaran histopatologi duodenum dianalisa secara kualitatif menggunakan pewarnaan HE. Hasil penelitian diperoleh terapi preventif ekstrak kulit apel *Rome Beauty* dapat mencegah kerusakan histopatologi duodenum dan juga mencegah perubahan pada profil pita protein 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 paparan plumbum asetat.

Kata Kunci : Plumbum Asetat, Kulit Apel *Rome Beauty*, Histopatologi Duodenum, Profil Pita Protein

The Effect of Preventive Therapy of Rome Beauty Apple (*Malus sylvestris Mill*) Peels Extract on Protein Profile and Duodenum Histopathology of Rat (*Rattus norvegicus*) Exposure to Plumbum Acetate

ABSTRACT

Plumbum contamination that enters the body through the digestive system can affect the digestive organs, one of which is the duodenum. Plumbum that enters the body will become free radicals and induce tissue damage of the duodenum. Free radicals that enter the body can be inhibited by the presence of antioxidants from outside the body (exogenous antioxidants). One fruit that is rich in antioxidant content, namely apples, both fruit flesh and peels. Apple peels contains the most important phenolic compounds, namely flavonoids which act as antioxidants. This study aimed to determine the effect of the Rome Beauty apple peels (*Malus sylvestris Mill*) extract on the profile of protein bands and histopathology of duodenal rats (*Rattus norvegicus*) exposed to plumbum acetate. This study was divided into 5 treatment groups with each treatment group consisting of four rats, namely negative control, positive control with 10 mg/day plumbum acetate administration for 14 days, and preventive therapy group with Rome Beauty apple peels extract 28 mg/200 g BW, 56 mg/200 g BW, and 112 mg/200 g BW for 21 days and giving plumbum acetate at a dose of 10 mg / head / day for 14 days. The profile of the duodenum protein band was analyzed qualitatively with the SDS-PAGE method and the duodenal histopathology was analyzed qualitatively using HE staining. The results obtained by the group of Rome Beauty apple peels extract preventive therapy can prevent histopathological damage of duodenum and also prevent changes in the protein band profile with the best dose is 112 mg/200 g BW. The conclusion of this study is that apple peels extract of Rome Beauty can be used as a preventive therapy to alter negative effect of free radicals from plumbum acetate exposure.

Key words: Plumbum Acetate, Rome Beauty Apple Peels, Duodenum Histopathology, Protein Profile

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas anugerah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Pengaruh Terapi Preventif Ekstrak Kulit Apel (*Malus sylvestris Mill*) Varietas *Rome Beauty* terhadap Profil Protein dan Histopatologi Duodenum Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Plumbum Asetat**”

Atas terselesaikannya skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS., sebagai dosen pembimbing satu, dan drh. Nurina Titisari, M.Sc., sebagai dosen pembimbing dua yang telah menyempatkan waktu untuk membimbing penulis pada saat penulisan skripsi ini.
2. drh. Rahadi Swastomo, M.Biomed., sebagai dosen penguji satu, dan drh. Ani Setianingrum, M.Sc., sebagai dosen penguji dua yang telah menyempatkan waktu sebagai dosen penguji skripsi ini.
3. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc., sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya (FKH UB) atas kepemimpinannya demi kemajuan bersama.
4. Seluruh dosen yang telah memberikan ilmu, kolega FKH UB, keluarga besar penulis selama menjalankan studi di FKH UB.
5. Teman sejawat Perapelan Afna Hanunnida, Devina Andini Ghassana, Tarsisius Handaru, dan Gema Ernest Nadhrata yang telah membantu memberi masukan, motivasi, dan semangat selama proses penyusunan skripsi ini, teman Pengabdian

Mamang Apip Amelia Diyan Safitri, dan keluarga besar Classy Class yang telah menemani proses belajar selama 4 tahun masa pendidikan dokter hewan.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna. Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan pembaca, untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Malang, 25 Juni 2019



Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR 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	5
1.3 Batasan Masalah	5
1.4 Tujuan Penelitian.....	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 <i>Apel Rome Beauty</i>	7
2.2 Plumbum (Pb).....	10
2.3 Tikus (<i>Rattus novergicus</i>).....	13
2.4 Duodenum.....	14
2.5 SDS-PAGE	17
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN ..	19
3.1 Kerangka Konseptual.....	19
3.2 Hipotesis Penelitian	22
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN.....	23
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	23
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	23
4.2.1 Alat Penelitian.....	23
4.2.2 Bahan Penelitian	23
4.3 Tahapan Penelitian.....	24
4.3.1 Rancangan Penelitian.....	24
4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian	25
4.3.3 Variabel Penelitian.....	25
4.4 Karakteristik Sampel Penelitian	26



4.4.1 Karakteristik Inklusi.....	26
4.4.2 Karakteristik Eksekusi	26
4.5 Prosedur Kerja	26
4.5.1 Persiapan Hewan Coba	26
4.5.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Apel.....	26
4.5.3 Pemberian Plumbum (Pb).....	27
4.5.4 Pengambilan Organ Duodenum Tikus.....	28
4.5.5 Pemeriksaan Profil Pita Protein Duodenum	28
4.5.5.1 Persiapan Sampel Duodenum	28
4.5.5.2 Persiapan Gel	29
4.5.5.3 Injeksi Sampel dan Running	30
4.5.5.4 Pewarnaan dengan <i>Comassie Brilliant Blue-250</i>	30
4.5.5.5 Penentuan Berat Molekul.....	31
4.5.6 Pembuatan Preparat dan Pewarnaan <i>Hematoxyline Eosin</i> (HE) Histopatologi Duodenum.....	32
4.5.6.1 Pengamatan Histopatologi Duodenum	34
4.6 Analisis Data.....	34
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	35
5.1 Pengaruh Terapi Preventif Ekstrak Kulit Apel (<i>Malus sylvestris Mill</i>) Varietas <i>Rome Beauty</i> Terhadap Profil Protein Duodenum pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Dipapar Plumbum Asetat	35
5.2 Pengaruh Terapi Preventif Ekstrak Kulit Apel (<i>Malus sylvestris Mill</i>) Varietas <i>Rome Beauty</i> Terhadap Histopatologi Duodenum Tikus yang Dipapar Plumbum Asetat	40
BAB 6 PENUTUP.....	48
6.1 Kesimpulan	48
6.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN.....	56



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Komposisi kandungan gizi apel per 100 g bahan.....	8
4.1 Rancangan kelompok penelitian	24
5.1 Berat molekul protein duodenum tikus yang diberi paparan plumbum asetat yang diberi terapi preventif ekstrak kulit apel <i>Rome Beauty</i>	36



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Apel <i>Rome Beauty</i>	7
2.2 Plumbum	10
2.3 Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	14
2.4 Histologi duodenum dengan pewarnaan HE.....	15
2.5 Sel goblet pada duodenum tikus dengan pewarnaan HE.....	16
3.1 Kerangka Konseptual	19
5.1 Profil pita protein duodenum tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) yang dipapar plumbum asetat	35
5.2 Histopatologi duodenum tikus kontrol negatif (K-) (Pewarnaan HE 100x dan 400x)	40
5.3 Histopatologi duodenum tikus kontrol positif (K+) (Pewarnaan HE 100x dan 400x)	40
5.4 Histopatologi duodenum tikus terapi preventif dosis 28 mg/200 g BB (Pewarnaan HE 100x dan 400x)	41
5.5 Histopatologi duodenum tikus terapi preventif dosis 56 mg/200 g BB (Pewarnaan HE 100x dan 400x)	41
5.6 Histopatologi duodenum tikus terapi preventif dosis 112 mg/200 g BB (Pewarnaan HE 100x dan 400x)	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Rancangan Penelitian	57
2. Sertifikat Laik Etik	58
3. Pembuatan Ekstrak Kulit Apel Varietas <i>Rome Beauty</i>	59
4. Hasil Uji Kualitatif Ekstrak Kulit Apel Varietas <i>Rome Beauty</i>	60
5. Pemberian Plumbum Asetat	61
6. Perhitungan Dosis Ekstrak Kulit Apel	62
7. Pengambilan Organ Duodenum	63
8. Penentuan Profil Pita Protein dengan SDS-PAGE.....	64
9. Pembuatan Preparat Histopatologi Organ Duodenum	66
10. Profil Pita Protein Duodenum Tikus yang dipapar Plumbum asetat.....	68
11. Dokumentasi Penelitian.....	70



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
Pb	Plumbum
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Spesies</i>
HE	<i>Hematoxylin Eosin</i>
cm	<i>Centimeter</i>
mm	<i>Milimeter</i>
mL	Mililiter
°C	<i>Celcius</i>
ppm	<i>Part per million</i>
rpm	Rotasi per menit
kgBB	Kilogram Berat Badan
WHO	<i>World Health Organization</i>
DNES	<i>Diffuse Neuroendocrine System</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
TNF- α	<i>Tumour Necrosis Factor Alpha</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFA	<i>Paraformaldehyde</i>
LGB	<i>Lower Gel Buffer</i>
UGB	<i>Upper Gel Buffer</i>
RSB	<i>Reducing Sample Buffer</i>
APS	<i>Ammonium Phosphate</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
PMSF	<i>Poly Methyl Sulfonyl Fluoride</i>
Tris-HCL	Tris-Hidroklorida
TEMED	<i>Tetramethylendiamine</i>
Rf	<i>Retardation factor</i>
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
kDa	kilodalton
SHSP	<i>Small heat shock protein</i>
VIP	<i>Vasoactive Intestinal Polypeptide</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada era modern ini, pencemaran lingkungan merupakan masalah serius yang banyak dihadapi oleh negara-negara maju maupun negara berkembang seperti Indonesia. Aktivitas industri merupakan penyumbang utama terbesar dari timbulnya pencemaran di lingkungan. Salah satu unsur pencemaran lingkungan yang telah banyak diketahui ialah plumbum (Pb). Pencemaran lingkungan oleh plumbum dapat disebabkan oleh penggunaan plumbum yang tidak disertai dengan sistem pembuangan limbah yang memadai.

Kadar plumbum (Pb) yang cukup tinggi di lingkungan akan mengakibatkan kontaminasi pada makanan, air, dan udara, dan dapat menyebabkan keracunan. Jika dikonsumsi oleh makhluk hidup paparan timbal secara akut dapat menimbulkan berbagai gejala seperti hipersalivasi, muntah, kerusakan ginjal bahkan kematian. Sementara itu paparan timbal secara kronis dapat menyebabkan gangguan pada berbagai sistem organ seperti kardiovaskuler, sistem saraf, ginjal, sistem reproduksi, dan saluran cerna (Janardani dkk., 2018).

Salah satu sumber cemaran plumbum dapat berasal dari makanan yang terkontaminasi plumbum dan air minum yang umumnya dikonsumsi setiap hari (Aziz dan Marianti, 2014). Penelitian yang dilakukan oleh Suyanto dkk. (2010) menunjukkan adanya cemaran logam berat pada daging di 3 daerah di provinsi Jawa Tengah yaitu Semarang, Surakarta, dan Sragen yang berasal dari sapi yang banyak digembalakan di lokasi Tempat Pembuangan Akhir (TPA) karena pakan yang

terkontaminasi oleh logam berat. Cemaran logam berat tersebut dapat membahayakan kesehatan manusia. Selain itu air yang umumnya dikonsumsi juga dapat tercemar oleh plumbum. Pada penelitian yang dilakukan oleh Nurfadillah (2013) mengenai kadar cemaran timbal pada air PDAM di kota Gorontalo didapatkan kadar timbal dalam air PDAM sebesar 0.03 mg/l yang telah melebihi ambang batas cemaran timbal pada air yang ditetapkan berdasarkan SNI 7387:2009 yaitu 0.01 mg/l. Cemaran plumbum pada air dapat terjadi karena plumbum juga digunakan pada pipa air sebagai pelapis, solder dan kran air (Aziz dan Marianti, 2014).

Umumnya plumbum masuk melalui saluran pencernaan karena mengkonsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi oleh plumbum (Janardani dkk., 2018). Timbal (Pb) yang masuk ke dalam tubuh melalui sistem pencernaan dapat mempengaruhi organ-organ pencernaan, salah satunya duodenum. Plumbum yang masuk ke dalam pencernaan akan diabsorpsi oleh usus halus kemudian masuk ke dalam sistem peredaran darah dan didistribusikan ke berbagai organ dalam tubuh.

Senyawa Pb yang masuk ke dalam tubuh akan menjadi senyawa ion Pb^{2+} yang mempunyai elektron bebas pada lapisan luarnya dan menjadi radikal bebas (Pala, 2007). Radikal bebas adalah molekul yang tidak berpasangan dalam struktur kimianya sehingga radikal bebas tersebut akan mencari pasangan untuk berikatan dan mencapai kestabilan (Danusantoso, 2003). Plumbum akan berusaha untuk melengkapi lapisan terluarnya agar lebih stabil dengan mengikat molekul lain dari organ tubuh seperti protein, karbohidrat, lemak, dan DNA (Pala, 2007). Akumulasi

plumbum juga dapat menyebabkan peningkatan ROS dan stres oksidatif. *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) adalah radikal bebas yang bersifat sangat reaktif. Radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dari asam lemak tak jenuh yang dapat menyebabkan kerusakan membran sel (Aziz dan Marianti, 2014). Protein yang bereaksi dengan radikal bebas dapat menyebabkan struktur protein rusak, dan protein kehilangan fungsi biologisnya (Simanjuntak, 2012)

Radikal bebas yang tinggi dalam tubuh dapat dihambat dengan adanya antioksidan dari luar tubuh (antioksidan eksogen). Antioksidan yaitu suatu bahan yang berfungsi sebagai inhibitor yang bekerja menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tidak reaktif yang relatif stabil sehingga dapat melindungi sel dari kerusakan. Antioksidan eksogen ialah antioksidan yang berasal dari luar tubuh yang didapat dari bahan alami maupun sintetik. Antioksidan yang alami biasanya didapatkan dari tumbuhan seperti sayuran, dan buah-buahan. Senyawa-senyawa yang terkandung dalam antioksidan alami tersebut terutama berasal dari golongan senyawa turunan fenol seperti flavonoid, turunan senyawa hidroksiamat, kumarin, tokoferol, dan asam organik (Khaira, 2010).

Apel ialah salah satu buah yang banyak diminati oleh masyarakat Indonesia karena buah tersebut mengandung banyak vitamin yang bermanfaat, memiliki rasa yang enak, mudah didapatkan, dan murah. Apel selain dikonsumsi secara langsung juga dijadikan beberapa produk olahan seperti keripik apel, dan minuman sari buah apel. Umumnya dari pengolahan produk apel tersebut dihasilkan beberapa limbah seperti kulit dan ampas apel yang selama ini hanya digunakan sebagai pemupukan

tanaman (Subagyo dan Achmad, 2010). Padahal produk limbah seperti kulit apel juga dapat digunakan sebagai bahan antioksidan alami yang sangat dibutuhkan oleh tubuh untuk melawan radikal bebas.

Menurut Octaviany dkk. (2017) kulit apel mengandung senyawa fenolik yang paling penting yaitu flavonoid seperti *quercetin glycosides*, *catechin*, *phlorizidin*, *caffeic acid*, *procyanidin*, dan asam klorogenik. Flavonoid dapat berperan sebagai antioksidan disebabkan oleh adanya penangkapan radikal bebas melalui donor atom hidrogennya dari gugus hidroksil flavonoid dan mencegah terjadinya peroksidasi lipid (Amic *et al.*, 2003). Jenis antioksidan terbanyak pada buah apel yaitu *quercetin*. *Quercetin* ialah golongan senyawa flavonol yang termasuk dalam golongan flavonoid (Lee *et al.*, 2003). Berdasarkan penelitian yang sudah pernah dilakukan oleh Cempaka dkk. (2014) kandungan *quercetin* yang paling banyak terdapat pada apel segar varietas *Rome Beauty* dibandingkan dengan apel varietas Manalagi, Fuji, dan *Red Delicious*.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mempelajari pengaruh terapi preventif ekstrak kulit apel (*Malus sylvestris Mill*) varietas *Rome Beauty* terhadap profil protein duodenum dan gambaran histopatologi duodenum pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar dengan plumbum asetat.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah pemberian ekstrak kulit apel (*Malus sylvestris Mill*) varietas *Rome Beauty* dapat mencegah perubahan profil pita protein duodenum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar plumbum asetat?
2. Apakah pemberian ekstrak kulit apel (*Malus sylvestris Mill*) varietas *Rome Beauty* dapat mencegah kerusakan histopatologi duodenum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar plumbum asetat?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih strain *wistar* jantan sejumlah 20 ekor, berumur 8-10 minggu, berat badan rata-rata 180-200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang.
2. Kulit apel varietas *Rome Beauty* yang digunakan diperoleh dari penjual apel di daerah Batu yang diberikan selama 21 hari berturut-turut dengan dosis 28 mg/200 g BB, 56 mg/200 g BB, dan 112 mg/200 g BB untuk masing-masing tikus putih pada setiap perlakuan.
3. Plumbum yang digunakan diperoleh dari Panadia kota Malang. Pemberian plumbum (Pb) diberikan sebanyak 10 mg/ekor/hari. Plumbum diberikan dalam bentuk serbuk (Pb asetat) yang dilarutkan dengan aquades dan

diberikan selama 14 hari yang dimulai dari hari ke 15-28 (Suprijono dkk., 2011).

4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah profil pita protein duodenum yang dianalisis secara kualitatif menggunakan SDS-PAGE dan pengamatan histopatologi duodenum yang diamati secara kualitatif menggunakan pewarnaan HE dan mikroskop *Olympus BX51*.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang tersebut, tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh terapi preventif ekstrak kulit apel (*Malus sylvestris Mill*) varietas *Rome Beauty* terhadap profil pita protein duodenum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar plumbum asetat.
2. Mengetahui pengaruh terapi preventif ekstrak kulit apel *Rome Beauty* terhadap histopatologi duodenum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar plumbum asetat.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang pemanfaatan ekstrak kulit apel (*Malus sylvestris Mill*) varietas *Rome Beauty* sebagai terapi preventif terhadap kerusakan duodenum atau gangguan organ lain sebagai akibat paparan Plumbum (Pb).

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Apel *Rome Beauty*

Apel ialah tanaman buah yang umumnya berasal dari daerah Asia Barat dengan iklim subtropis. Apel merupakan tanaman dengan tinggi batang 7-10 m, daun berbentuk bulat telur dengan tepi bergerigi kecil, bunga yang membesar atau mengembang akan menjadi buah yang padat dan berisi, dan buah yang berbentuk bulat dan bersegi empat dengan warna buah hijau atau merah (Nuraini, 2011). Menurut Sufrida (2007) taksonomi dari apel yaitu:

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



Gambar 2.1 Apel *Rome Beauty* (Rahayu, 2016)

Apel *Rome Beauty* atau yang biasa dikenal sebagai apel malang (**Gambar 2.1**) memiliki buah yang berbentuk jorong dengan ujung (pucuk buah) berlekung dangkal dan pangkal berlekuk dalam, buah berdiameter 5-12 cm dengan berat 75-300 g per buah, kulit buah tebal, kulit berwarna merah pudar jika terkena sinar matahari dan berwarna hijau jika tidak terkena sinar matahari (Tjitrosoepomo, 2005). Kandungan gizi apel dapat dilihat pada **Tabel 2.1**.

Tabel 2.1 Komposisi kandungan gizi apel per 100 g bahan

No.	Jenis Zat Gizi	Jumlah
1.	Energi (Kkal.)	58,00
2.	Protein (g)	0,30
3.	Lemak (g)	0,40
4.	Karbohidrat (g)	14,90
5.	Air (g)	86,5
6.	Serat (g)	0,70
7.	Gula (g)	9,92
8.	Kalsium (mg)	6,00
9.	Fosfor (mg)	6,00
10.	Vitamin A (RE)	24,00
11.	Vitamin B1 (mg)	0,04
12.	Vitamin B2 (mg)	0,03
13.	Vitamin C (mg)	5,00
14.	Zat Besi (mg)	1,30

Sumber: Rahmawati (2014)

Apel memiliki beberapa manfaat seperti antibakteri, antiinflamasi, dan antoksidan (Subroto dan Saputro, 2006). Apel diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dikarenakan memiliki berbagai senyawa fenolik (Golding *et al.*, 2001). Pada bagian buahnya apel memiliki beberapa senyawa-senyawa

flavonoid seperti *catechin*, *procyanidin*, *phloridzin*, *phloretin glycoside*, *caffeic acid*, dan *chlorogenic acid* (Wolfe dan Liu, 2003). Sementara pada bagian kulitnya mengandung senyawa fenolik yang paling penting yaitu flavonoid seperti *quercetin glycosides*, *catechin*, *phlorizidin*, *caffeic acid*, *procyanidin*, dan asam klorogenik (Octaviany dkk., 2017).

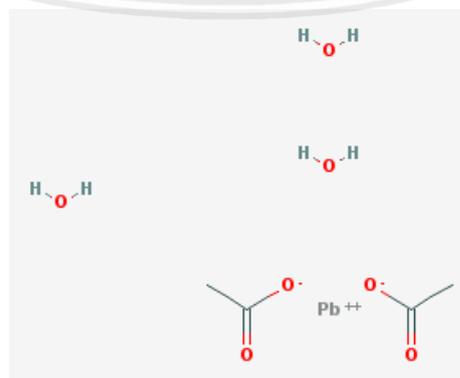
Flavonoid ialah senyawa bahan alam dari fenolik yang merupakan pigmen dari tumbuhan (Subroto dan Saputro, 2006). Flavonoid umumnya banyak ditemukan dalam jaringan tanaman, termasuk dalam golongan fenolik dengan struktur kimia $C_6-C_3-C_6$ (Redha, 2010). Flavonoid dikelompokkan menjadi beberapa golongan berdasarkan pada pola substitusi pada kedua cincin aromatik dan pola yang berbeda pada C_3 menjadi flavon, flavonol, flavanon, isoflavon, dan antosianidin (Pietta, 2000).

Flavonoid memiliki fungsi untuk melindungi struktur sel, anti inflamasi, dan sebagai anti bakteri (Subroto dan Saputro, 2006). Flavonoid juga berperan sebagai antioksidan karena sifatnya sebagai akseptor yang baik terhadap radikal bebas. Antioksidan ialah substansi yang diperlukan oleh tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein dan lemak. Radikal bebas yaitu suatu molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan dalam orbitalnya. Efek antioksidan dari flavonoid disebabkan oleh adanya penangkapan radikal bebas melalui donor atom hidrogennya dari gugus hidroksil flavonoid (Amic *et al.*, 2003). Selain itu flavonoid dapat melindungi membran fosfolipid dengan menyumbangkan salah satu ion hidrogennya kepada peroksid lipid radikal sehingga dapat menghentikan reaksi-

reaksi radikal selanjutnya, dan juga menstimulasi sistem pertahanan antioksidan seperti superoksida dismutase, katalase, glutathion, dan glutathion reduktase (Octaviany dkk., 2017).

Menurut Chinici *et al.* (2004) kulit buah apel mengandung total senyawa fenolik lebih kaya daripada daging buahnya. Senyawa fenolik yang secara khusus hanya ditemukan pada kulit apel ialah *quercetin*. *Quercetin* ialah golongan senyawa flavonol yang termasuk dalam golongan flavonoid (Lee *et al.*, 2003). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Cempaka dkk. (2014) kandungan quercetin paling banyak terdapat pada apel *Rome Beauty* dengan kadar quercetin sebesar 477.96 mg/kg, diikuti oleh Manalagi sebesar 406.57 mg/kg, Fuji sebesar 272.89 mg/kg, dan *Red delicious* sebesar 206.54 mg/kg. *Quercetin* memiliki sifat antioksidan yang dapat bermanfaat bagi kesehatan dan merupakan penyumbang aktivitas antioksidan paling besar dari apel (Chinici *et al.*, 2004). Sifat antioksidan tersebut disebabkan karena kemampuan *quercetin* untuk menangkap radikal bebas (Winarsi, 2007).

2.2 Plumbum (Pb)



Gambar 2.2 Plumbum (Kim *et al.*, 2016)

Plumbum (Pb) atau yang umumnya disebut sebagai timbal merupakan logam yang secara alami berwarna kelabu kebiruan. Timbal termasuk dalam kelompok logam golongan IV-A pada Tabel Periodik unsur kimia. Timbal mudah menguap dengan titik lebur yaitu 327,5 °C dan titik didih 1620 °C. Timbal menguap pada suhu diantara 550°C-600°C dan bereaksi dengan oksigen dalam udara dan membentuk timbal oksida (Guruswamy, 2000; Watt, 2002).

Timbal pada umumnya banyak dijumpai dilingkungan karena logam tersebut banyak dimanfaatkan oleh manusia sebagai peralatan rumah tangga, bahan pembuat baterai, peningkat nilai oktan pada bahan bakar bermotor, pewarna cat, keramik, sebagai pelapis pada pipa air, solder dan kran air (Aziz dan Marianti, 2014).

Terdapat berbagai jalur masuknya timbal ke dalam tubuh seperti melalui saluran pernafasan, oral ataupun langsung melalui permukaan kulit (Naria, 2005). Timbal yang masuk melalui saluran pernafasan akan diabsorpsi oleh paru-paru sebanyak 35% yang akan diserap dan masuk ke dalam aliran darah. Timbal juga dapat masuk ke dalam tubuh melalui oral. Penyerapan melalui oral biasanya 10%-14% dari jumlah total timbal yang masuk. Air minum atau makanan yang terkontaminasi oleh timbal akan masuk ke dalam tubuh melalui mulut. Timbal tersebut kemudian masuk ke dalam sistem peredaran darah. Sementara itu penyerapan timbal melalui kulit kurang dari 1% dari jumlah penyerapan yang ada ditubuh. Jumlah penyerapan timbal oleh kulit tergantung pada karakteristik timbal (organik dan anorganik) dan integritas kulit (Sembel, 2015).

Nilai ambang batas cemaran logam Pb pada makanan yang ditetapkan oleh Dirjen Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) yaitu 2 ppm. Cemaran Pb melalui minuman dapat berasal dari air minum yang umumnya dikonsumsi setiap hari, karena Pb juga digunakan pada pipa air sebagai pelapis, solder dan kran air (Aziz dan Marianti, 2014). Air minum yang disalurkan melalui pipa yang dilapisi oleh Pb akan menyebabkan tingginya kandungan Pb yang terlarut dalam air tersebut. *World Health Organization* (WHO) telah menetapkan nilai ambang batas Pb dalam air minum yaitu 0,01 mg/l (Aziz dan Marianti, 2014).

Pada hewan umumnya plumbum masuk melalui saluran pencernaan karena hewan tersebut mengkonsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi oleh plumbum. Plumbum yang masuk ke dalam saluran pencernaan dan diabsorpsi oleh usus halus kemudian masuk ke dalam peredaran darah dan didistribusikan ke berbagai organ tubuh seperti hati dan ginjal. Senyawa Pb yang masuk ke dalam tubuh akan menjadi senyawa ion Pb^{2+} yang mempunyai elektron bebas pada lapisan luarnya dan menjadi radikal bebas (Pala, 2007). Radikal bebas adalah molekul yang tidak berpasangan dalam struktur kimianya sehingga radikal bebas tersebut akan mencari pasangan untuk berikatan dan mencapai kestabilan (Danusantoso, 2003). Plumbum akan berusaha untuk melengkapi lapisan terluarnya agar lebih stabil dengan mengikat molekul lain dari organ tubuh seperti protein, karbohidrat, lemak, dan DNA (Pala, 2007). Akumulasi plumbum juga dapat menyebabkan peningkatan ROS dan stres oksidatif. *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) adalah radikal bebas yang bersifat sangat reaktif. Radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dari asam lemak tak jenuh yang dapat menyebabkan kerusakan

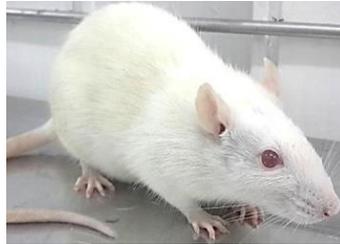
membran sel (Aziz dan Marianti, 2014). Protein yang bereaksi dengan radikal bebas dapat menyebabkan struktur protein rusak, dan protein kehilangan fungsi biologisnya (Simanjuntak, 2012).

2.3 Tikus (*Rattus novergicus*)

Tikus merupakan hewan yang paling sering digunakan sebagai hewan coba untuk suatu penelitian. Tikus memiliki beberapa karakteristik yang dapat bermanfaat untuk suatu penelitian seperti memiliki organ, kebutuhan nutrisi, metabolisme biokimia, sistem reproduksi, pernafasan, peredaran darah dan ekskresi yang menyerupai manusia, siklus hidup yang relatif pendek, dan mudah dalam pemeliharaannya (Bredo, 2011). Terdapat berbagai macam tikus putih yang umumnya digunakan sebagai hewan coba yaitu *Sprague-dawley*, *Long evans*, dan *Wistar* (Akbar, 2010). Tikus *Wistar* memiliki karakteristik yaitu kepala yang lebar, telinga panjang, dan memiliki ekor yang lebih panjang dari panjang tubuhnya (Sirois, 2005). Berikut ini taksnomi tikus putih menurut Akbar (2010), yaitu:

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Mamalia
Ordo : Rodentia
Subordo : Odontoceti
Familia : Muridae
Genus : Rattus

Spesies : *Rattus norvegicus*



Gambar 2.3 Tikus (*Rattus norvegicus*) (Fauziyah, 2016)

2.4 Duodenum

Duodenum merupakan bagian pertama dari usus halus. Duodenum pada umumnya merupakan tabung berbentuk C yang dimulai dari sfingter pilorus lambung hingga *flexura duodenojejunalis*. Duodenum terletak retroperitoneal kecuali pada bagian awalnya, yang dihubungkan dengan hepar oleh suatu *ligamentum hepatoduodenal*, yang merupakan bagian omentum usus (Snell, 2006).

Secara makroskopis usus halus terdiri dari 3 bagian yaitu duodenum, jejunum, dan ileum. Secara histologis ketiga bagian usus halus tersebut memiliki struktur yang hampir sama. Secara umum lapisan-lapisan penyusun dinding usus halus dari dalam ke luar yaitu tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis, dan tunika serosa (Frappier, 2006).

Usus halus mempunyai fungsi utama yaitu pencernaan dan absorpsi. Duodenum mencerna makanan yang telah dilakukan oleh organ saluran digestivus sebelumnya (Price dan Wilson, 2005). Pada duodenum terjadi pencernaan karbohidrat, lemak, dan protein menjadi zat yang lebih sederhana oleh bantuan enzim-enzim dari pankreas. Pada epitel usus halus juga terdapat berbagai enzim penting untuk memecah disakarida maupun polimer glukosa kecil menjadi monosakarida yaitu laktase, sukrase, maltase, dan alfa dekstrinase (Faiz dan Moffat,

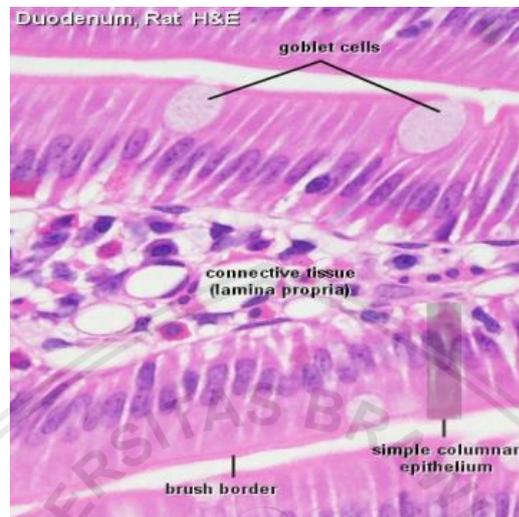
2004). Penyerapan asam amino, gula, dan lemak sebagian besar terjadi di duodenum dan jejunum. Terjadi juga absorpsi besi dan kalsium yang membutuhkan vitamin D. Vitamin larut lemak yaitu vitamin A, D, E, K di absorpsi juga di duodenum (Price dan Wilson, 2005; Guyton dan Hall, 2006). Secara histologis dinding duodenum terdiri dari tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis, dan tunika serosa seperti pada **Gambar 2.4** (Frappier, 2006).



Gambar 2.4 Histologi duodenum dengan pewarnaan HE. (1) tunika mukosa, (2) tunika submukosa, (3) tunika muskularis, (4) tunika serosa, (5) vili, (6) kripta pada mukosa, (7) kelenjar Brunner pada submukosa (Gunin, 2000)

Lapisan mukosa duodenum terdiri dari beberapa lapisan, yaitu epitelium, lamina propia, dan muskularis mukosa. Duodenum memiliki epitel silindris sebaris yang terdiri dari beberapa sel, yaitu sel penyerap, sel goblet, dan sel DNES (*Diffuse Neuroendocrine System*). Sel goblet tersebar diantara sel penyerap, dan sel goblet ini akan membuat musinogen yang merupakan mukus lapisan pelindung lumen **Gambar 2.5**. Sel DNES berfungsi memproduksi hormon parakrin dan endokrin (Gartner dan Hiatt, 2001). Lamina propia duodenum terdiri atas jaringan ikat

retikular, dan fibroplastik yang longgar dan kaya akan pembuluh darah, dan saraf (Shackelford dan Elwell, 1999).



Gambar 2.5 Sel goblet pada duodenum tikus dengan pewarnaan HE (SAHB, 2009)

Usus halus memiliki beberapa ciri khas seperti adanya vili, lapisan sel epitel kolumnar berjajar dengan mikrovili yang membentuk *striated borders*, dan kelenjar intestinal yang tubular dan pendek (kripte Lieberkuhn). Vili yaitu penjurulan mukosa yang berbentuk jari dan merupakan modifikasi dari mukosa, diantara vili terdapat muara kecil dari kelenjar tubular simplek yang disebut kripte Lieberkuhn atau kelenjar intestinal. Struktur lain yang terdapat pada duodenum yaitu plika sirkularis yang merupakan lipatan-lipatan mukosa yang sangat khas pada duodenum dan jejunum (Junqueira dan Carneiro, 2007).

Lapisan kedua dari duodenum yaitu submukosa yang terdiri dari kelenjar *Brunners* yang mensekresikan lendir. Pada submukosa ditemukan juga adanya serabut-serabut saraf dan sel ganglion yang disebut pleksus submukosa atau pleksus *Meissner*. Pleksus tersebut berfungsi untuk mengatur sekresi dan aliran darah, serta membantu beberapa fungsi sensorik seperti menerima sinyal-sinyal terutama dari

epitel usus, dan dari reseptor regangan didalam dinding usus (Guyton dan Hall 1997).

Lapisan ketiga dari duodenum ialah tunika muskularis yang terdiri dari lapisan eksterna longitudinal dan lapisan interna sirkular yang memiliki serabut otot halus berbentuk sirkuler, diantara kedua lapis tersebut terdapat plexus saraf parasimpatis yang disebut plexus *Auerbach's*. Suplai darah pada usus halus diberikan melalui cabang-cabang arteri mesenterica celiaca dan cranialis yang menembus tunika muskularis kemudian tunika submukosa. Lapisan keempat merupakan lapisan terluar dari duodenum yaitu tunika serosa yang merupakan suatu lapisan jaringan penyambung yang tertutup mesotel (Frappier, 2006).

2.5 SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)

Elektroforesis ialah sebuah metode yang digunakan untuk memisahkan sebuah molekul seperti protein, fragmen DNA, dan RNA. Elektroforesis memisahkan molekul bermuatan berdasarkan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik (Yuwono, 2008). Pergerakan molekul dalam medan listrik dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, besar muatan, dan sifat kimia molekul tersebut. Pemisahan dilakukan berdasarkan perbedaan muatan listrik dan berat molekul yang dikandung oleh makromolekul tersebut. Saat arus listrik dialirkan pada suatu media penyangga yang telah berisi sampel maka komponen-komponen tersebut akan mulai bermigrasi (Pratiwi, 2001).

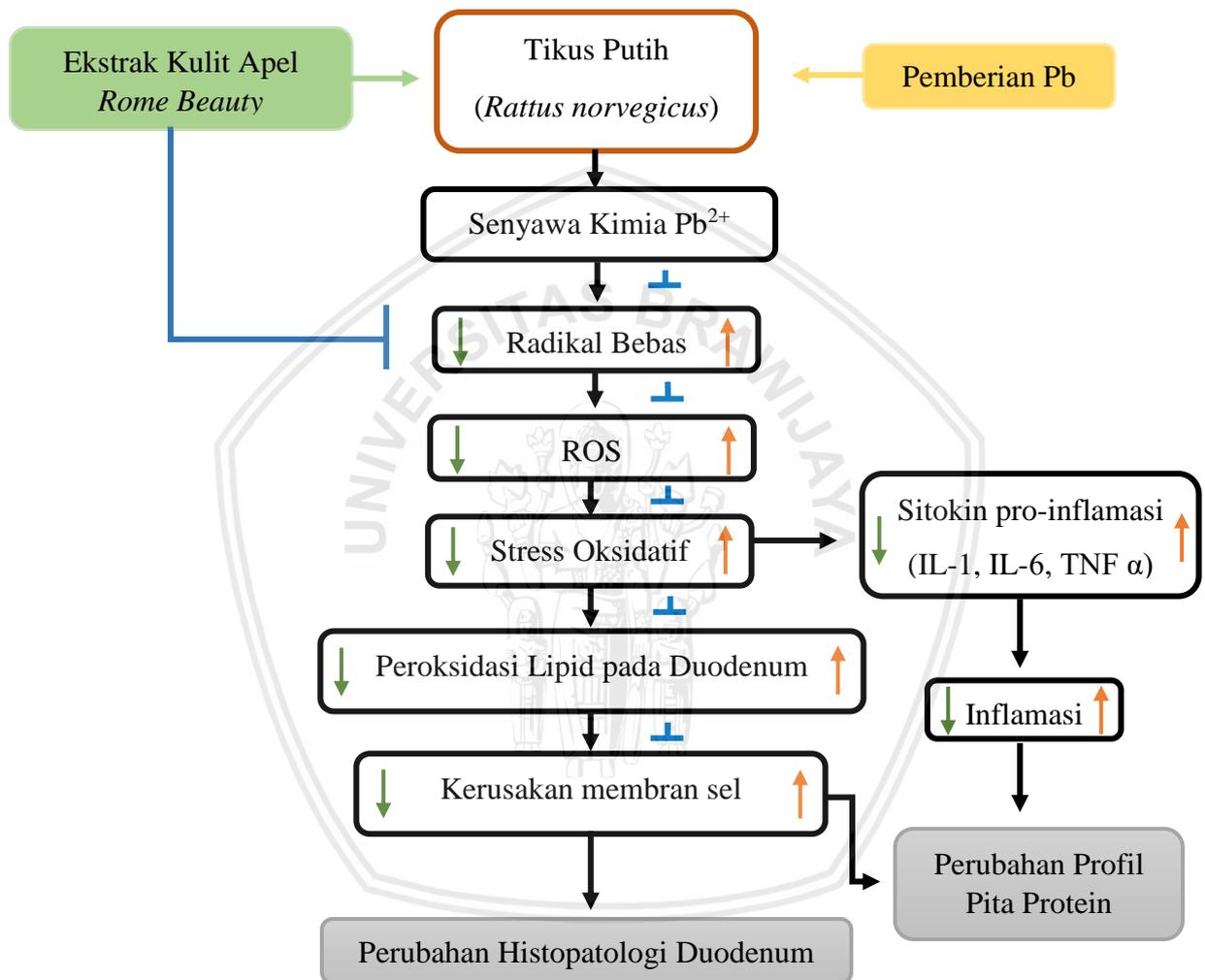
Salah satu teknik elektroforesis yang sering digunakan ialah elektroforesis gel poliakrilamida (SDS-PAGE). *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel*

Electroforesis (SDS-PAGE) merupakan teknik yang digunakan untuk memisahkan rantai polipeptida berdasarkan kemampuan untuk bergerak dalam arus listrik (Anam, 2009). Hal tersebut dicapai dengan merusak struktur tiga dimensi pada protein dengan terpecahnya ikatan disulfida yang selanjutnya direduksi menjadi gugus sulfhidril. *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) akan berikatan dengan gugus sulfhidril sehingga protein bermuatan sangat negatif dan dapat bergerak ke arah kutub positif (Bintang, 2010).

Prinsip kerja dari metode elektroforesis SDS-PAGE menurut Saputra (2014) ialah sampel yang akan dianalisis terlebih dahulu dicampur dengan SDS. *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) merupakan deterjen anionik yang bila dilarutkan molekulnya memiliki muatan negatif dalam range pH yang luas. Muatan negatif SDS akan mendenaturasi sebagian besar struktur kompleks protein, dan secara kuat protein akan tertarik ke arah anoda bila ditempatkan pada medan listrik. Pada saat arus listrik diberikan, molekul akan bermigrasi melalui gel poliakrilamid menuju kutub positif, molekul yang kecil akan bermigrasi lebih cepat daripada yang besar sehingga terjadi pemisahan. Molekul tersebut akan melalui pori-pori gel poliakrilamid sehingga tingkat kecepatan/kemudahan pergerakan melalui pori-pori gel bergantung pada diameter molekul. Saat molekul diberikan SDS molekul tersebut akan terdenaturasi, sehingga diameter molekulnya bergantung pada berat molekul. Semakin besar diameter molekulnya, maka semakin lambat pergerakannya. SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electroforesis*) akan memisahkan molekul berdasarkan berat molekulnya.

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka konseptual

Keterangan:

- ↓ : Mempengaruhi
- ↑ : Peningkatan
- ↓ : Penurunan
- : Hewan coba
- ⊥ : Menghambat
- : Paparan Plumbum
- : Variabel bebas
- : Parameter yang diamati

Hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) diberikan ekstrak kulit apel dengan jenis *Rome Beauty* yang mengandung senyawa flavonoid terutama kuersetin yang berfungsi sebagai antioksidan sebagai terapi preventif untuk mencegah kerusakan organ yang disebabkan oleh pemberian plumbum (Pb). Plumbum asetat 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 seperti hati dan ginjal. Senyawa Pb yang masuk ke dalam tubuh akan menjadi senyawa ion Pb^{2+} yang memiliki atom bebas pada lapisan luarnya dan menjadi radikal bebas (Pala, 2007). Radikal bebas adalah molekul yang tidak berpasangan dalam struktur kimianya sehingga radikal bebas tersebut akan mencari pasangan untuk berikatan dan mencapai kestabilan (Danusantoso, 2003). Plumbum akan berusaha untuk melengkapi lapisan terluarnya agar lebih stabil dengan mengikat molekul lain dari organ tubuh seperti protein, karbohidrat, lemak, dan DNA (Pala, 2007). Aksi dari radikal bebas tersebut akan berakibat destruktif untuk molekul yang elektronnya diambil. Aksi dari pengambilan elektron tersebut akan menyebabkan reaksi berantai sehingga radikal bebas yang ada semakin banyak. Radikal bebas akan merusak molekul makro pembentuk sel, seperti protein, karbohidrat, lemak, dan DNA (Sadikin, 2008).

Adanya akumulasi timbal di dalam tubuh akan memicu peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Spesies*). *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) adalah senyawa radikal bebas yang berada di dalam tubuh. Terbentuknya ROS didalam tubuh juga dapat menyebabkan stress oksidatif. Stress oksidatif yaitu ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan didalam tubuh (Hazra *et al.*, 2010).

ROS juga dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dari asam lemak tak jenuh (PUFA) (Robbin, 2007). Peroksidasi lipid ialah reaksi berantai yang memasok radikal bebas sehingga terjadi reaksi peroksida berikutnya (Asterina, 2014). Ikatan lipid peroksida pada radikal bebas akan menjadi radikal lipid. Radikal lipid kemudian akan berikatan dengan oksigen menjadi rantai radikal bebas. Rantai radikal bebas yang terbentuk akan berikatan dengan radikal lipid atau radikal bebas lainnya, sehingga akan menimbulkan stress oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan pada membran sel (Aziz dan Marianti, 2014). Kerusakan membran sel dapat menyebabkan perubahan struktur dan fungsi sel yang selanjutnya dapat diamati melalui gambaran histopatologi yang diwarnai dengan *Hematoxyline Eosin* (HE).

Reactive Oxygen Spesies (ROS) juga dapat menyerang berbagai molekul seperti asam nukleat, protein dan asam amino. Radikal bebas yang bereaksi dengan protein dapat menyebabkan terbentuknya ikatan silang antar protein dan oksidasi rantai utama sehingga terjadi fragmentasi. Protein yang mengalami kerusakan akan menjadi target proteolisis dan kehilangan fungsi biologisnya (Simanjuntak, 2012). Selain itu stress oksidatif juga dapat menyebabkan inflamasi dengan menginduksi sitokin pro-inflamasi seperti IL-1, IL-6, dan TNF- α yang dapat menyebabkan perubahan profil pita protein (Putri dkk., 2015). Profil protein tersebut dapat diamati secara kualitatif menggunakan metode SDS-PAGE dan diidentifikasi berdasarkan berat molekulnya.

Ekstrak kulit apel *Rome Beauty* mengandung flavonoid. Senyawa tersebut berpotensi sebagai antioksidan. Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan

cara menyumbangkan satu atau lebih elektronnya kepada radikal bebas sehingga reaksi radikal bebas dapat terhambat (Kumalaningsih, 2007). Ekstrak kulit apel juga memiliki kandungan *quercetin* yang termasuk dalam golongan flavonoid. *Quercetin* memiliki sifat antioksidan yang disebabkan karena kemampuan senyawa tersebut untuk menangkap radikal bebas (Winarsi, 2007). Radikal bebas yang terhambat akan menurunkan stress oksidatif dan dapat menurunkan kerusakan yang disebabkan oleh peroksida lipid terhadap sel normal, protein, dan lemak. Peroksidasi lipid yang menurun juga dapat menghambat kerusakan pada sel-sel dan jaringan di usus halus.

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 profil pita protein pada duodenum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar Plumbum asetat.
2. Pemberian ekstrak kulit apel *Rome Beauty* mampu mencegah kerusakan histopatologi duodenum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar Plumbum asetat.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai dari 14 Februari 2019 sampai 31 Maret 2019 di Laboratorium UPT Materia Medika Batu, Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang, Laboratorium Kessima Medika, Laboratorium Histologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu kandang tikus berupa bak plastik dan tutup kandang dari kawat, botol minum tikus, sekam berupa parutan kayu halus, alat sonde, *dissecting set*, papan bedah, *gloves*, spuit 1 cc, spuit 3 cc, *beaker glass*, tabung erlenmayer, *microtube*, timbangan digital, *object glass*, *cover glass*, *vortex*, *centrifuge*, pot organ, mortar, aluminium foil, tabung *ependorf*, *blue tip*, *yellow tip*, *autoclave*, *digital shaker*, kertas saring, box pakan, *timer*, dan lemari pendingin, alat elektroforesis, mikroskop cahaya.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan, pakan tikus standar, Pb asetat (*powder*), kulit

apel *Rome Beauty*, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *aquadest*, NaCl fisiologis, *xylol* bertingkat, PFA (*Paraformaldehyde*) 4%, blok parafin, pewarna *Hematoxyline Eosin* (HE), *Lower Gel Buffer* (LGB), *Upper Gel Buffer* (UGB), Tris-HCl pH 6,8, *Reducing Sample Buffer* (RSB), *Ammonium Phosphate* (APS), PMSF, Tris-HCL, TEMED, akrilamid 30%.

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan Acak Lengkap digunakan apabila media yang digunakan dalam penelitian relatif homogen (Soehono, 2016). Pengukuran profil pita protein dan histopatologi duodenum dilakukan dengan *post test on control group*. Rancangan kelompok penelitian dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Rancangan kelompok penelitian

Kelompok	Perlakuan
A (Kontrol negatif)	Pakan standar dan air minum
B (Kontrol positif)	Pemberian Pb asetat 10 mg/ekor/hari
C (Perlakuan 1)	Pakan standar dan air minum + ekstrak kulit apel 28 mg/200 g BB dan pemberian Pb asetat 10 mg/ekor/hari
D (Perlakuan 2)	Pakan standar dan air minum + ekstrak kulit apel 56 mg/200 g BB dan pemberian Pb asetat 10 mg/ekor/hari
E (Perlakuan 3)	Pakan standar dan air minum + ekstrak kulit apel 112 mg/200 g BB dan pemberian Pb asetat 10 mg/ekor/hari

4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian

Penentuan jumlah sampel minimal yang digunakan dihitung dengan rumus $p(n - 1) \geq 15$, dimana (p) ialah jumlah perlakuan, dan (n) ialah 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 tersebut dapat diperoleh jumlah pengulangan yang dibutuhkan 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 (*Rattus norvegicus*).

4.3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini yaitu:

- a. Variabel bebas : Dosis plumbum (Pb) dan dosis ekstrak kulit apel
- b. Variabel terikat : Profil pita protein dan histopatologi duodenum tikus putih
- c. Variabel kontrol : Tikus putih (*Rattus norvegicus*) meliputi jenis kelamin, umur, berat badan, dan strain wistar, pakan, jenis kulit apel, suhu dan lingkungan

4.4 Karakteristik Sampel Penelitian

4.4.1 Karakteristik Inklusi

- Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar berumur 8-10 minggu
- Berat badan rata-rata 180-200 gram
- Jenis kelamin jantan
- Sehat, ditandai dengan gerak yang aktif dan mata yang jernih

4.4.2 Karakteristik Eksekusi

- Tikus yang mati dalam perjalanan penelitian atau mengalami sakit

4.5 Prosedur Kerja

4.5.1 Persiapan Hewan Coba

Persiapan hewan coba dimulai dengan hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari di laboratorium. Pemberian pakan selama masa adaptasi berupa pakan standar dan air minum 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

Ekstraksi kulit apel pada penelitian ini menggunakan metode maserasi, dengan pelarut etanol 70%. Pelarut etanol 70% dipilih karena flavonoid merupakan senyawa polar sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol

(Junka *et al.*, 2017). Tahap-tahap pembuatannya yaitu dimulai dengan pemisahan kulit dan buah apel. 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, kulit apel yang kering dihaluskan dengan cara diblender sampai halus, lalu ditimbang sebanyak 500 gram dan dimasukkan ke dalam wadah proses ekstraksi. Kulit apel kemudian ditambahkan etanol 70% sampai 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 selama 24 jam, dan di *shaker* di atas *shaker digital* dengan kecepatan 50 rpm. Saring ekstrak cair dengan penyaring kain, lalu ditampung ekstrak dalam 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/200 g BB, 56 mg/200 g BB, dan 112 mg/200 g BB. Ekstrak kulit apel tersebut diberikan selama 21 hari sesuai dengan dosis yang telah ditentukan.

4.5.3 Pemberian Plumbum (Pb)

Plumbum (Pb) yang diberikan adalah Pb yang berbentuk serbuk berwarna putih yang dilarutkan dengan aquades 1 ml dan diberikan secara per oral dengan

menggunakan sonde lambung. Dosis Pb yang diberikan ialah 10 mg/ekor/hari pada kelompok B kontrol positif, kelompok C perlakuan, perlakuan D, dan perlakuan E 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 Duodenum Tikus

Pengambilan duodenum tikus dilakukan setelah perlakuan selama 4 minggu selesai dilakukan. Pengambilan duodenum dilakukan dengan cara euthanasi melalui dislokasi pada leher tikus, kemudian difiksasi ke empat kaki tikus. Pembedahan tikus diletakkan dengan posisi rebah dorsal diatas papan bedah, dan selanjutnya dilakukan pembedahan pada rongga abdomen. Pembedahan rongga abdomen dimulai dari arah caudal ke cranial hingga terbuka rongga thorax. Setelah itu duodenum diambil dan dipotong menggunakan gunting bedah yang, kemudian duodenum dipotong menjadi 2 bagian yaitu bagian pertama disimpan dalam *ice box* untuk pemeriksaan profil protein, dan bagian kedua disimpan dalam PFA 4% untuk pembuatan preparat histopatologi menggunakan pewarnaan HE.

4.5.5 Pemeriksaan Profil Pita Protein Duodenum

4.5.5.1 Persiapan Sampel Duodenum

Isolasi protein dilakukan dengan cara yaitu pengambilan organ duodenum tikus putih (*Rattus norvegicus*). Sampel duodenum ditimbang sebanyak 0,5 gram

dan dipotong kecil-kecil menggunakan gunting bedah Mayo, lalu ditambahkan larutan PBS-Tween : PSMF (9:1) sebanyak 1 mL, dan digerus dengan mortar yang diletakkan diatas balok es. Tahap selanjutnya yaitu dimasukkan ke dalam *microtube* dan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm, supernatan yang dihasilkan kemudian diambil dan ditambahkan etanol absolut dengan perbandingan (1:1) dan dibiarkan selama satu malam sampai terbentuk endapan. Setelah itu disentrifugasi kembali selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm, lalu diambil endapan dan dikeringkan dengan cara dianginkan sampai bau etanol hilang. Setelah itu endapan ditambahkan dengan larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,8 dengan perbandingan 1:1.

4.5.5.2 Persiapan Gel

Pada persiapan gel, yang dilakukan yaitu membuat plate gel dengan merangkai dua plate kaca dengan jarak antar plate kurang lebih 1 mm. Gel dibuat sebanyak dua lapis, yaitu gel sebagai tempat sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisah protein (*separating gel*).

Stacking gel memiliki konsentrasi 4%, sedangkan *seperating gel* memiliki konsentrasi 7,5%. Setelah itu *seperating gel* dimasukkan ke dalam *plate* menggunakan mikropipet, lalu didiamkan selama 10-30 menit hingga memadat. Setelah *seperating gel* memadat dituangkan *stacking gel* diatasnya, dibuat sumur gel dengan bantuan sisir. Setelah kedua gel tersebut memadat, sisir diangkat, dan *plate* dipasang pada alat elektroforesis.

4.5.5.3 Injeksi Sampel dan Running

Ekstrak kasar hasil isolasi dari duodenum diambil sebanyak 150 μ l, ditambahkan 150 μ l *Reducing Sampel Buffer* (RSB) dan dipanaskan pada penangas air dengan temperatur 100°C selama 3 menit. Setelah dingin dimasukkan 20 μ l sampel pada masing-masing sumuran dan pada salah satu sumuran gel diisi dengan protein standar marker. Setelah itu anoda pada alat elektroforesis dihubungkan pada *reservoir* bawah, dan katoda dihubungkan pada *reservoir* atas, lalu *power supply* dinyalakan dengan arus listrik sebesar 42 mA dan tegangan 200 volt. Alat elektroforesis kemudian dihentikan apabila warna penanda biru berada kurang lebih 0,5 cm dari batas bawah plate gel. Gel kemudian diambil dari alat elektroforesis.

4.5.5.4 Pewarnaan dengan *Comassie Brilliant Blue-250*

Gel hasil elektroforesis ditaruh dimasukkan ke dalam petridish kemudian dilakukan pewarnaan dengan *Comassie Brilliant Blue-250* selama 30-60 menit. Selama proses pewarnaan dilakukan dengan gel yang digoyang pada *shaker* kemudian gel dicuci dalam larutan destaining untuk menghilangkan *Comassie Brilliant Blue-250* dengan tetap digoyang. Setelah itu dilakukan pencucian lagi menggunakan aquades serta dimasukkan potongan kertas saring untuk menyerap warna yang akan dibilas hingga gel menjadi jernih dengan pita terpisah jelas satu sama lainnya. Setelah pewarnaan selesai akan diperoleh pita-pita protein yang tampak pada gel. Hasil elektroforesis kemudian *discan* dan dianalisa.

4.5.5.5 Penentuan Berat Molekul

Jenis-jenis protein diketahui dengan membandingkan berat molekul hasil SDS-PAGE dengan marker protein pada sampel. Setelah itu dilakukan pengukuran panjang *tracking* pita, panjang *tracking* pita ialah panjang *track* dari atas pita sampai dasar pita. Jarak *tracking* dari tiap band yaitu panjang *track* dari atas pita sampai *band* yang akan dicari berat molekulnya. Pita protein marker harus dihitung pertama karena pada protein marker telah diketahui berat molekulnya sehingga digunakan sebagai panduan mencari berat molekul sampel lainnya. Selanjutnya dilakukan penentuan berat molekul dengan menghitung nilai Rf (*Retardation factor*) menggunakan rumus sebagai berikut:

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Rf diperoleh dengan membagi jarak *tracking* dengan panjang *tracking*. Setelah didapatkan nilai Rf dilakukan pembuatan kurva standar dengan harga Rf sebagai sumbu X dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu Y. Setelah itu dihitung berat molekul dengan persamaan linier [$Y = a + bX$]. Mobilitas dari suatu protein dapat diukur menggunakan rumus tersebut selanjutnya dapat dicari berat molekulnya dengan mengplotkan langsung pada kurva standar berat molekul atau dapat dihitung menggunakan persamaan garis dari kurva standar berat molekul.

4.5.6 Pembuatan Preparat dan Pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE)

Histopatologi Duodenum

Menurut Junquiera dan Carneiro (2005) proses pembuatan preparat histologi terdiri dari beberapa tahap yaitu fiksasi, dehidrasi, *clearing*, *embedding*, *sectioning*, deparafinisasi, rehidrasi, pewarnaan, dehidrasi, *clearing*, dan *mounting*.

Tahapan pembuatan preparat dimulai dengan fiksasi yaitu merendam organ duodenum dalam PFA 4% selama 24 jam. Setelah 24 jam sampel di *trimming* 1 x 1 cm lalu dimasukkan ke dalam *tissue cassette*.

Tahap selanjutnya yaitu dehidrasi. Proses tersebut menggunakan alkohol bertingkat mulai dari 70%, 80%, 90%, dan 95%, ethanol absolut I, II, III masing-masing 1 jam. Setelah itu dilakukan *clearing* (tahap penjernihan organ) dilakukan dengan memindahkan sampel dari ethanol absolut III ke larutan penjernihan yaitu xylol I, xylol II, dan xylol III masing-masing 20 menit hingga terlihat jernih. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam parafin cair I, II, dan III pada inkubator parafin dengan suhu 56°-60°C masing-masing 5 menit.

Tahapan berikutnya yaitu *embedding*, parafin IV dicairkan diatas alas kompor listrik kemudian *tissue cassette* dari parafin III dikeluarkan dan ditaruh diatas kompor listrik, lalu dikeluarkan sampel dari *tissue cassette*. Parafin IV kemudian dituangkan ke dalam cetakan parafin. Sampel organ kemudian ditanam pada parafin IV dicetakan dan ditutup dengan *tissue cassette*. Setelah itu blok tersebut dipasang pada *microtome* dan diatur agar posisinya sejajar dengan posisi pisau.

Selanjutnya dilakukan pemotongan blok parafin (*sectioning*) dengan ketebalan 5 μm . Irisan yang didapat kemudian diletakkan pada *object glass* yang sudah diolesi EWIT secara tipis dan direndam pada *waterbath* dengan suhu 38°-40°C. Setelah itu preparat yang didapat disimpan pada inkubator dengan suhu 37°-38°C selama semalam lalu diwarnai dengan pewarnaan HE.

Tahapan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE) dimulai dengan proses deparafinisasi yaitu dengan memasukkan preparat ke dalam xylol bertingkat I-III masing-masing selama 20 menit. Tahapan selanjutnya yaitu dilakukan proses rehidrasi dengan alkohol bertingkat, dimulai dari ethanol absolute I, II, III, dan alkohol 95%, 90%, 80%, 70% masing-masing selama 5 menit.

Setelah itu dilakukan pewarnaan preparat yang dimasukkan ke dalam pewarna *hematoxyline* selama 10 menit. Setelah itu *object glass* diberi larutan alkohol asam (4-10 detik) untuk menghilangkan pewarna di sitoplasma. *Object glass* kemudian dicuci dengan air mengalir selama 5 menit, lalu dimasukkan ke dalam pewarna *eosin* selama 5 menit. Selanjutnya preparat direndam dalam aquades untuk menghilangkan pewarna *eosin* yang masih menempel.

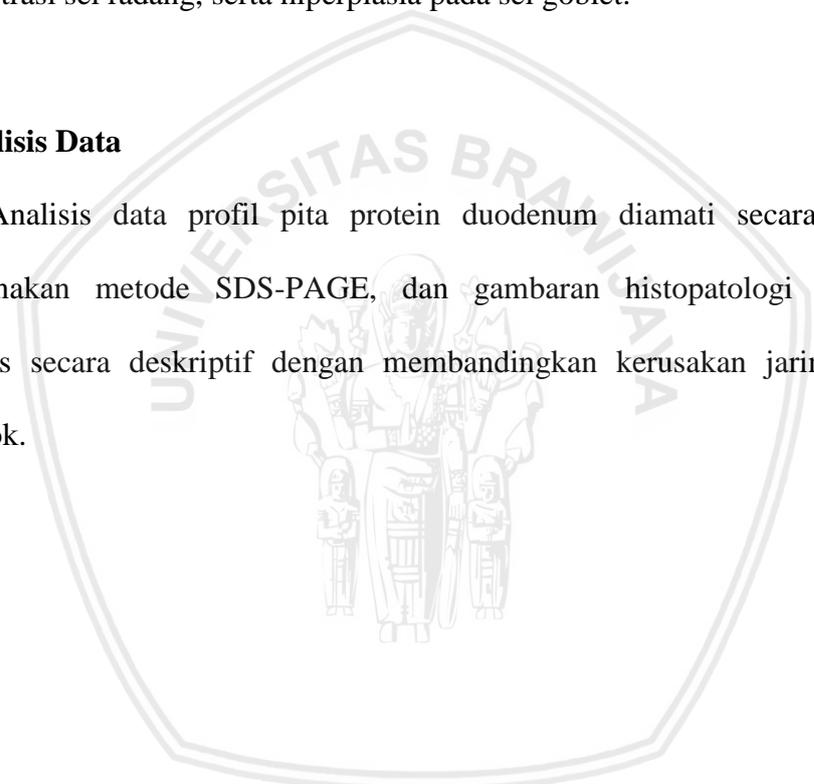
Tahap selanjutnya yaitu dilakukan dehidrasi dengan memasukkan preparat pada alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, ethanol absolut I, II, dan III masing-masing selama 5 menit. Setelah itu dilakukan proses *clearing* dengan memasukkan preparat pada xylol I-III dan dikeringkan, lalu dilakukan proses mounting dengan entelan dan ditutup dengan *cover glass*.

4.5.6.1 Pengamatan Histopatologi Duodenum

Pengamatan preparat histopatologi dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x dan 400x. Pengamatan histopatologi duodenum yang diamati ialah lapisan mukosa dengan bentukan vilinya serta tanda-tanda terjadinya kerusakan pada struktur vili, erosi epitel, infiltrasi sel radang, serta hiperplasia pada sel goblet.

4.6 Analisis Data

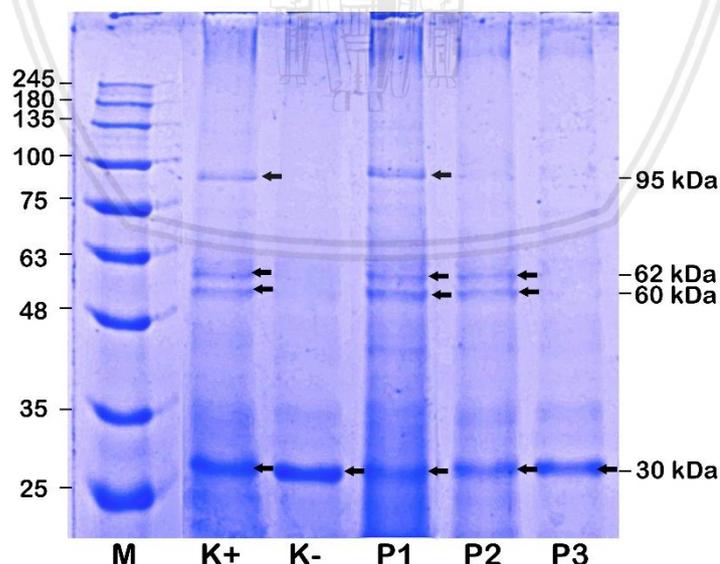
Analisis data profil pita protein duodenum diamati secara kualitatif menggunakan metode SDS-PAGE, dan gambaran histopatologi duodenum dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan kerusakan jaringan antar kelompok.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Terapi Preventif Ekstrak Kulit Apel (*Malus sylvestris Mill*) Varietas *Rome Beauty* Terhadap Profil Protein Duodenum pada Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Plumbum Asetat

Profil pita protein (**Gambar 5.1**) dianalisa menggunakan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) dari duodenum tikus kelompok kontrol negatif (K-), kontrol positif (K+), kelompok pemberian ekstrak kulit apel dengan dosis 28 mg/200 g BB (P1), 56 mg/200 g BB (P2), dan 112 mg/200 g BB (P3). Marker protein yang digunakan dalam pengujian ini yaitu GangNam-Stain™ dengan berat molekul (BM) berkisar antara 11 kDa sampai dengan 245 kDa. Hasil pengamatan profil pita protein dapat dilihat pada **Gambar 5.1**.



Gambar 5.1 Profil pita protein duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar plumbum asetat

Keterangan: M = Marker K- = kontrol negatif K+ = kontrol positif
 P1 = preventif ekstrak kulit apel dosis 28 mg/ 200 g BB
 P2 = preventif ekstrak kulit apel dosis 56 mg/ 200 g BB
 P3 = preventif ekstrak kulit apel dosis 112 mg/ 200 g BB

Hasil perhitungan berat molekul dari pita protein yang muncul didapatkan perbandingan pada masing-masing perlakuan. Perbandingan tersebut dapat dilihat dalam **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Berat molekul protein duodenum tikus yang diberi paparan plumbum asetat yang diberi terapi preventif ekstrak kulit apel *Rome beauty*

BM (kDa)	K-	K+	P1	P2	P3
95	-	✓	✓	-	-
62	-	✓	✓	✓	-
60	-	✓	✓	✓	-
30	✓	✓	✓	✓	✓

Berdasarkan perbandingan dengan berat molekul protein diperoleh adanya perubahan profil pita protein duodenum tikus pada masing-masing kelompok perlakuan. Pada semua kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif (K-), kontrol positif (K+), kelompok pemberian preventif ekstrak kulit apel dengan dosis 28 mg/ 200 g BB (P1), 56 mg/ 200 g BB (P2), dan 112 mg/ 200 g BB (P3) ditemukan ekspresi pita protein dengan berat molekul 30 kDa. Protein tersebut diduga merupakan *small heat shock protein* (SHSP). *Small heat shock protein* (SHSP) merupakan subkelas dari HSP (*heat shock protein*) yang memiliki berat molekul antara 15-30 kDa (Budhy dkk., 2006). *Small heat shock protein* (SHSP) merupakan protein yang umumnya muncul pada sel normal dan berfungsi sebagai molekul pendamping yang mencegah agregasi dan kesalahan pelipatan protein, dan menjaga protein dalam komponen lipatan yang benar, serta proteksi protein terhadap beberapa jenis stress (Borges dan Ramos, 2005).

Pada kelompok kontrol positif (K+), kelompok pemberian preventif ekstrak kulit apel dengan dosis 28 mg/ 200 g BB (P1), dan 56 mg/ 200 g BB (P2) terekspresi

pita protein dengan berat molekul 60 kDa dan 62 kDa. Protein dengan berat molekul 60 kDa dan 62 kDa tersebut diduga sebagai *vasoactive intestinal polypeptide* (VIP). *Vasoactive intestinal polypeptide* (VIP) merupakan protein yang memiliki berat molekul 60-62 kDa (Kusuma, 2013). Protein tersebut umumnya muncul pada saat inflamasi. *Vasoactive intestinal polypeptide* dapat memperbesar permeabilitas jaringan duodenum dan menginduksi vasodilatasi pembuluh darah. Selain itu *vasoactive intestinal polypeptide* juga memfasilitasi sekresi cairan dan elektrolit (Igarashi *et al.*, 2011).

Pada kelompok perlakuan kontrol positif (K+) dan kelompok perlakuan 1 (P1) ditemukan pita protein dengan berat molekul 95 kDa yang diduga sebagai *heat shock protein 90* (HSP90). *Heat shock protein 90* (HSP90) ialah protein yang memiliki berat molekul dari 83-95 kDa yang umumnya muncul baik dalam keadaan normal maupun stress (Feng *et al.*, 2010). Keadaan stress tersebut dapat berupa infeksi, gangguan metabolisme, dan adanya radikal bebas. Protein ini dalam keadaan stress berfungsi untuk mendenaturasi protein yang rusak (Budhy dkk., 2006).

Pada kelompok perlakuan kontrol positif (K+) terekspresi *vasoactive intestinal polypeptide* karena paparan plumbum akan menyebabkan inflamasi dan menyebabkan terekspresinya protein tersebut. Pada kelompok perlakuan kontrol negatif (K-) *vasoactive intestinal polypeptide* (VIP) tidak muncul karena tikus tersebut dalam keadaan sehat, sedangkan pada perlakuan 3 (P3) *vasoactive intestinal polypeptide* (VIP) tidak muncul karena inflamasi yang diakibatkan oleh paparan plumbum asetat sudah berkurang akibat pemberian ekstrak kulit apel yang

mengandung flavonoid. Namun pada kelompok perlakuan 1 (P1) dan 2 (P2) masih terekspresi *vasoactive intestinal polypeptide* (VIP) yang menunjukkan pemberian preventif ekstrak kulit apel dengan dosis 28 mg/200 g BB dan 56 mg/200 g BB belum mampu mencegah inflamasi yang disebabkan oleh paparan plumbum.

Pada kelompok perlakuan kontrol positif (K+) dan kelompok perlakuan 1 (P1) ditemukan adanya ekspresi *heat shock protein 90* (HSP90). *Heat shock protein 90* (HSP90) muncul pada kedua kelompok tersebut untuk mendenaturasi protein yang rusak. Protein ini tidak terekspresi pada kelompok kontrol negatif (K-) karena tikus dalam keadaan sehat, pada kelompok perlakuan 2 (P2) tidak terekspresi diduga karena pemberian ekstrak kulit apel yang mengandung flavonoid dapat mengurangi kerusakan protein yang disebabkan oleh paparan plumbum, sedangkan pada kelompok perlakuan 3 (P3) tidak terekspresi HSP90 dikarenakan pemberian ekstrak kulit apel yang mengandung flavonoid mampu mencegah inflamasi dan kerusakan protein.

Paparan plumbum asetat akan membentuk radikal bebas. Radikal bebas tersebut dapat akan memicu peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) yang dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid, dan aktivasi NF-kB. Aktivasi NF-kB terjadi karena *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) menyebabkan fosfolirasi I κ B yang akan menyebabkan ikatan NF-kB-I κ B terlepas. Ikatan yang terlepas tersebut menyebabkan NF-kB bertranslokasi ke dalam inti sel dan menginduksi ekspresi sitokin yang terlibat dalam inflamasi seperti IL-1, IL-6, dan TNF- α (Lestari, 2012). Inflamasi tersebut dapat mengakibatkan terekspresinya *vasoactive intestinal polypeptide*. Selain itu radikal bebas dapat berikatan dengan gugus -SH dari protein

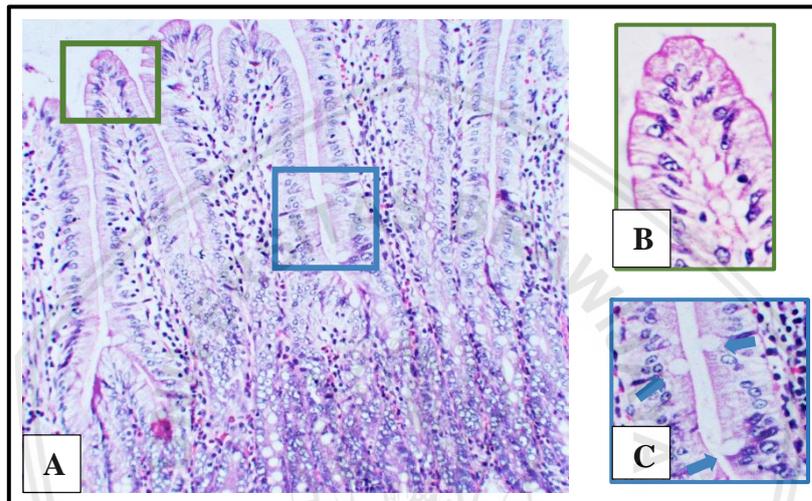
yang akan menyebabkan rantai protein terputus sehingga struktur protein rusak dan kehilangan fungsi biologisnya (Simanjuntak, 2012). Struktur protein yang rusak akan mengakibatkan terekspresinya *heat shock protein 90* (HSP90) yang berfungsi untuk mendenaturasi protein yang rusak.

Kandungan flavonoid dalam ekstrak kulit apel dapat bertindak sebagai antioksidan dengan mencegah peningkatan radikal bebas yang memicu terjadinya stress pada sel. Flavonoid bekerja sebagai antioksidan dengan cara mendonorkan ion hidrogennya pada radikal bebas yang akan menghambat pembentukan radikal bebas, peroksidasi lipid, dan aktivasi NF- κ B yang dapat menyebabkan inflamasi (Kumalaningsih, 2007). Aktivasi NF- κ B yang terhambat akan menyebabkan tidak terekspresinya protein *vasoactive intestinal polypeptide* (VIP) pada kelompok perlakuan 3 (P3). Selain itu terhambatnya pembentukan radikal bebas juga dapat menyebabkan penurunan kerusakan pada protein yang menyebabkan tidak terekspresinya *heat shock protein 90* (HSP90) pada kelompok perlakuan 2 (P2) dan kelompok perlakuan 3 (P3).

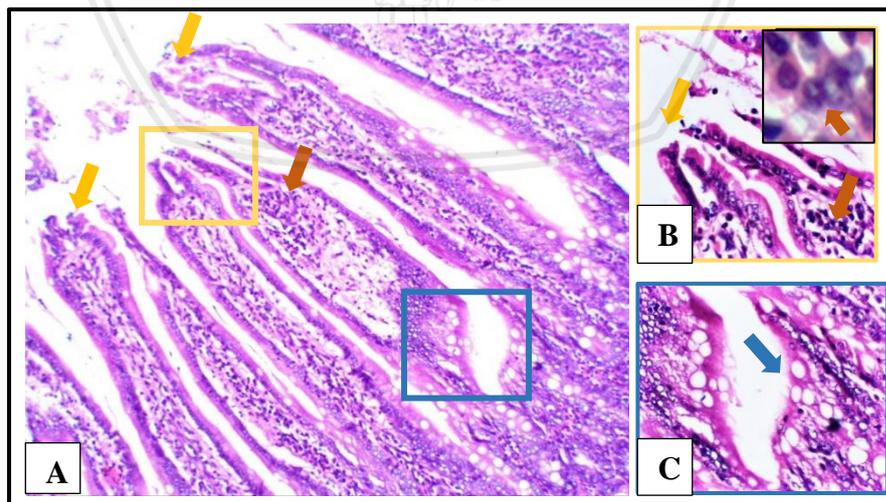
Berdasarkan hasil uji SDS-PAGE (**Gambar 5.1**) kelompok preventif ekstrak kulit apel dengan dosis 112 mg/200 g BB (P3) menunjukkan hasil profil protein yang hampir sama dengan kontrol negatif (K-). Kelompok P3 mampu mencegah ekspresi protein dengan berat molekul 95 kDa (HSP90), 60 kDa (VIP), dan 62 kDa (VIP), sehingga kelompok perlakuan 3 (P3) merupakan dosis yang paling memberikan pengaruh terhadap profil protein duodenum karena paparan plumbum asetat.

5.2 Pengaruh Terapi Preventif Ekstrak Kulit Apel (*Malus sylvestris* Mill) Varietas *Rome Beauty* Terhadap Histopatologi Duodenum Tikus yang Dipapar Plumbum Asetat

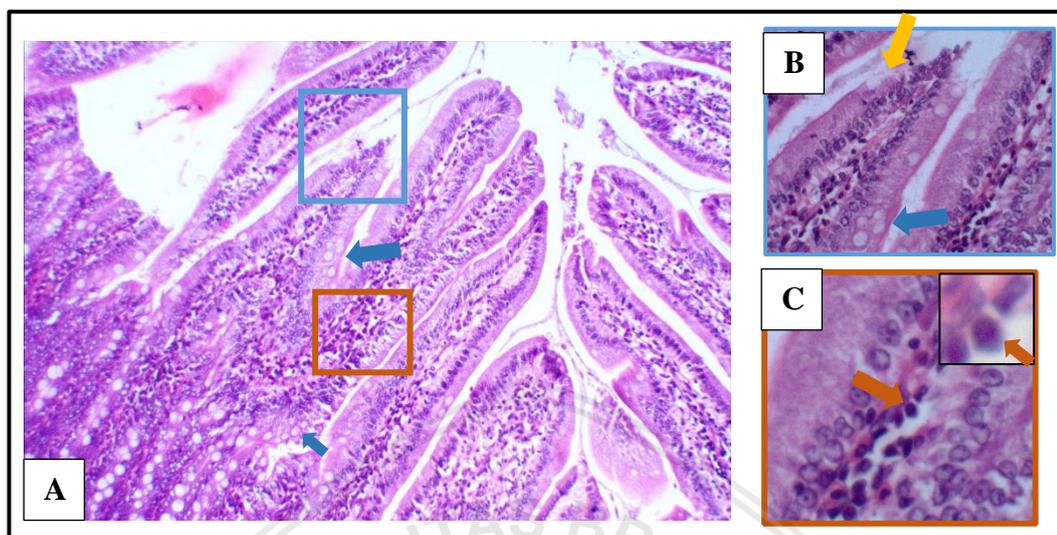
Berikut ini ialah hasil pengamatan histopatologi duodenum tikus putih (*Rattus norvegicus*).



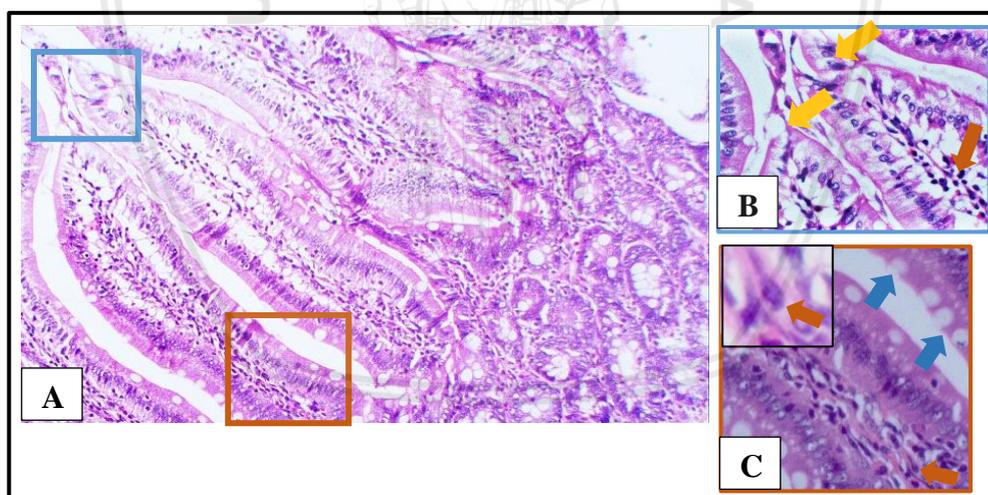
Gambar 5.2 Histopatologi duodenum tikus kontrol negatif dengan pewarnaan HE, perbesaran 100x (A) dan 400x (B,C). (B) Sel epitel normal (kotak hijau). (C) Sel goblet normal tertata rapi (kotak biru)
Keterangan: Panah biru (sel goblet normal)



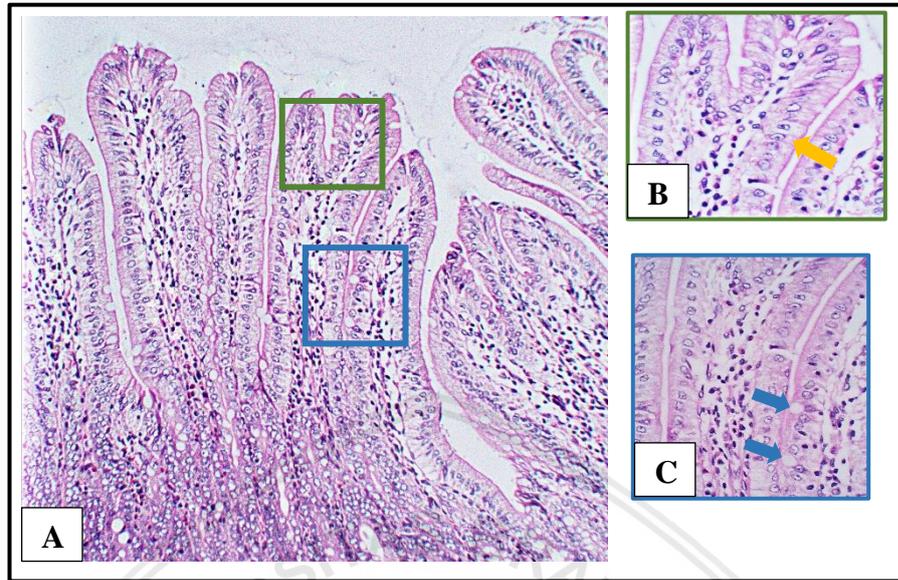
Gambar 5.3 Histopatologi duodenum tikus kontrol positif dengan pewarnaan HE, perbesaran 100x (A) dan 400x (B,C). (B) Erosi epitel (kotak kuning); (C) hiperplasia sel goblet (kotak biru).
Keterangan: Panah kuning (erosi epitel); panah biru (hiperplasia sel goblet); panah merah (infiltrasi sel radang)



Gambar 5.4 Histopatologi duodenum terapi preventif dosis 28 mg/ 200 g BB dengan pewarnaan HE, perbesaran 100x (A) dan 400x (B,C). (B) erosi epitel dan hemoragi (kotak biru). (C) Infiltrasi sel radang (kotak merah)
 Keterangan: Panah biru (hiperplasia sel goblet); panah kuning (erosi epitel); panah merah (infiltrasi sel radang)



Gambar 5.5 Histopatologi duodenum tikus terapi preventif dosis 56 mg/200 g BB dengan pewarnaan HE, perbesaran 100x (A) dan 400x (B,C). (B) erosi epitel (kotak biru). (C) Infiltrasi sel radang (kotak merah)
 Keterangan: Panah biru (erosi sel epitel); panah merah (infiltrasi sel radang); panah biru (sel goblet normal)



Gambar 5.6 Histopatologi duodenum tikus terapi preventif dosis 112 mg/200 g BB dengan pewarnaan HE, perbesaran 100x (A) dan 400x (B,C). (B) sel epitel normal (kotak hijau). (C) sel goblet normal tertata rapi (kotak biru)
Keterangan: Panah kuning (sel epitel normal), panah biru (sel goblet normal)

Pembuatan preparat histopatologi menggunakan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE) menggunakan perbesaran 100x dan 400x dengan mengamati struktur vili, sel epitel, infiltrasi sel radang, dan sel goblet. Secara normal dinding duodenum terdiri atas beberapa lapisan yaitu tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis, dan tunika serosa (Frappier, 2006). Lapisan mukosa duodenum terdiri atas vili yang tersusun oleh sel-sel epitel silindris sebaris, sel goblet, dan pada lapisan submukosa terdapat kelenjar brunner (Eroschenko, 2008).

Pada kelompok negatif (K-) (**Gambar 5.2**) menunjukkan gambaran histologi mukosa duodenum tikus sehat yang tanpa diberi paparan plumbum asetat. Pada lapisan mukosa duodenum kelompok negatif (K-) terlihat normal dengan vili-vili dalam bentuk yang normal tersusun rapi, dan rapat, sel epitel silindris sebaris tertata rapi dan sel goblet yang berada diantara sel epitel tidak mengalami hiperplasia.

Pada kelompok kontrol positif (K+) (**Gambar 5.3**) menunjukkan perbedaan gambaran mukosa duodenum dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif seperti adanya kerusakan pada struktur vili, erosi sel epitel, hiperplasia sel goblet, dan juga infiltrasi sel radang pada lamina propria. Hal tersebut sesuai dengan literatur menurut Sharma dan Barber (2014) bahwa paparan plumbum akan menyebabkan perubahan histopatologi pada mukosa usus halus seperti kerusakan struktur vili, erosi epitel, dan infiltrasi sel radang pada lamina propria. Vili yaitu penjuruan mukosa yang berfungsi untuk memperluas penyerapan, sehingga proses absorpsi nutrisi dapat dilakukan dengan baik (Abdullah, 2007). Kerusakan struktur vili yang terjadi pada duodenum dapat terjadi karena adanya erosi epitel yang disebabkan oleh paparan plumbum asetat (Harahap, 2017). Erosi epitel ialah kehilangan sebagian epitel pada lapisan mukosa usus halus (Ismaya dkk., 2017). Plumbum asetat yang masuk akan menjadi ion Pb^{2+} dan menjadi radikal bebas. Radikal bebas tersebut dapat berikatan dengan molekul lain dari organ tubuh seperti protein, lemak, dan DNA. Aksi dari radikal bebas tersebut akan menyebabkan peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) yang dapat memicu terjadinya peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid ialah aksi dari radikal bebas yang berikatan dengan lipid. Peroksidasi lipid tersebut dapat merusak membran sel dengan mengganggu fluiditas, dan permeabilitas sel sehingga sel akan mengalami kerusakan dan epitel vili duodenum tidak dapat mempertahankan keutuhan membrannya sehingga terjadi erosi epitel (Hidayat dkk., 2013).

Plumbum memiliki sifat lipofilik yang mudah berikatan dengan lipid bilayer pada sel sehingga sel dapat mengalami kerusakan. Sel yang rusak dapat

menginduksi terjadinya inflamasi (Wahyuni, 2011). Plumbum juga dapat menyebabkan inflamasi dengan menginduksi sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6, dan TNF- α (Lestari, 2012). Inflamasi akan menyebabkan sel-sel radang bermigrasi ke lokasi yang terdapat kerusakan. Sel radang yang mendominasi yaitu neutrofil. Neutrofil, limfosit, dan makrofag adalah sel radang yang pertama kali mencapai di jaringan yang rusak. Fungsi utama neutrofil yaitu memfagosit sel-sel rusak dan materi asing termasuk mikroorganisme. Neutrofil juga akan mengeluarkan protease untuk mendegradasi jaringan yang rusak (Primadina, 2019).

Selain itu aktivasi sitokin tersebut dapat merangsang hiperplasia sel goblet (Balqis dkk., 2007). Sel goblet adalah salah satu komponen pertahanan usus halus yang berfungsi untuk mensintesis dan mensekresikan mukus glikoprotein untuk melindungi sel-sel epitel intestinal dari berbagai benda atau zat asing yang masuk. Paparan plumbum akan menyebabkan respon kompensasi dari mukosa duodenum untuk melindungi mukosa dengan memperbanyak sel goblet sebagai bentuk pertahanan duodenum dari zat toksik (Mustafa *et al.*, 2018).

Gambaran histopatologi mukosa duodenum tikus kelompok perlakuan 1 dengan dosis 28 mg/200 g BB (**Gambar 5.4**) menunjukkan lapisan mukosa dengan jaringan sel epitel yang masih rusak, adanya hiperplasia sel goblet, dan juga infiltrasi sel radang pada lamina propria. Histopatologi mukosa duodenum tikus kelompok perlakuan 2 dengan dosis 56 mg/200 g BB (**Gambar 5.5**) menunjukkan pada lapisan mukosa masih adanya erosi epitel dan adanya infiltrasi sel radang, namun sel goblet tidak mengalami hiperplasia. Histopatologi duodenum tikus kelompok perlakuan 3 dengan dosis 112 mg/200 g BB (**Gambar 5.6**) menunjukkan

perbaikan gambaran histopatologi mukosa duodenum yang hampir sama dengan kontrol negatif (K-) dimana terlihat struktur vili yang normal, dengan epitel yang utuh serta tertata rapi, tidak ada infiltrasi sel radang, dan sel goblet yang tidak mengalami hiperplasia. Berdasarkan hasil tersebut histopatologi duodenum kelompok perlakuan terapi preventif ekstrak kulit apel dengan dosis 28 mg/200 g BB (P1), 56 mg/200 g BB (P2), dan 112 mg/200 g BB (P3) menunjukkan perbedaan dibandingkan dengan gambaran histopatologi duodenum pada kelompok kontrol positif (K+).

Pemberian ekstrak kulit apel *Rome Beauty* sebagai terapi preventif bertujuan untuk mencegah terbentuknya radikal bebas dalam tubuh tikus yang diberi paparan plumbum asetat sehingga diharapkan kerusakan duodenum dapat dicegah. Berdasarkan hasil uji fitokimia secara kualitatif ekstrak kulit apel *Rome Beauty* mengandung senyawa antioksidan yaitu flavonoid dan vitamin C (**Lampiran 4**).

Flavonoid dapat bertindak sebagai antioksidan yang mencegah terbentuknya radikal bebas karena paparan plumbum asetat dengan cara meningkatkan aktivitas enzim antioksidan endogen. Menurut Sumardika dan Jawi (2012) flavonoid dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan endogen dengan cara menginduksi ekspresi gen antioksidan endogen melalui aktivasi *nuclear factor erythroid 2 related factor 2* (Nrf2) yang dapat mengakibatkan peningkatan gen yang berperan dalam sintesis enzim antioksidan endogen seperti gen SOD.

Selain itu flavonoid juga dapat membantu kerja enzim antioksidan endogen dengan cara menyumbangkan salah satu ion hidrogennya dari gugus hidroksil

flavonoid kepada radikal bebas sehingga reaksi radikal bebas dapat terhambat (Kumalaningsih, 2007).

Selain flavonoid ekstrak kulit apel juga mengandung vitamin C. Vitamin C bekerja dengan cara menyumbangkan elektronnya pada radikal bebas. Setelah memberikan elektron pada radikal bebas, vitamin C akan teroksidasi menjadi *semidehydroascorbut acid* atau radikal *ascorbyl* yang relatif stabil. Sifat tersebut yang dapat menjadikan vitamin C sebagai antioksidan dan dapat mereduksi radikal bebas yang reaktif menjadi tidak reaktif sehingga reaksi radikal bebas terhambat. Selain itu vitamin C juga dapat bertindak sebagai antiinflamasi yang dapat menghambat aktivasi NF-kB dengan cara mencegah degradasi I κ B sehingga NF-kB tidak mengalami translokasi ke nukleus dan menyebabkan tidak terekspresinya sitokin-sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6, dan TNF- α (Wiryani dan Suwitra, 2010). Radikal bebas yang terhambat akan menurunkan stress oksidatif dan dapat menurunkan kerusakan yang disebabkan oleh peroksida lipid terhadap sel normal, protein, dan lemak. Peroksidasi lipid yang menurun juga dapat menghambat kerusakan pada sel-sel dan jaringan duodenum. Selain itu aktivasi NF-kB yang terhambat juga dapat mencegah adanya infiltrasi sel radang pada lamina propria dan hiperplasia sel goblet akibat paparan plumbum asetat.

Pemberian ekstrak kulit apel *Rome Beauty* berfungsi sebagai antioksidan yang mencegah dan memperbaiki kerusakan sel akibat radikal bebas. Antioksidan dapat membantu tunika mukosa untuk menunjang kerja duodenum dalam melakukan penyerapan nutrisi makan yang masuk melalui proses enzimatik secara normal. Pada pengamatan histopatologi duodenum tikus yang diberikan terapi

preventif ekstrak kulit apel *Rome Beauty* menunjukkan perbaikan gambaran histopatologi yang paling optimal yaitu pada terapi ekstrak kulit apel *Rome Beauty* dengan dosis 112 mg/200 g BB.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan data hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemberian terapi preventif ekstrak kulit apel *Rome Beauty* dengan dosis 112 mg/ 200 g BB dapat mencegah perubahan profil pita protein duodenum tikus yang dipapar plumbum asetat dibandingkan dengan kelompok perlakuan positif (K+).
2. Pemberian terapi preventif ekstrak kulit apel *Rome Beauty* dapat mencegah kerusakan sel berdasarkan gambaran histopatologi duodenum tikus putih (*Rattus norvegicus*) dibandingkan dengan kelompok perlakuan positif (K+) dengan dosis terbaik yaitu 112 mg/ 200 g BB.

6.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh pemberian preventif ekstrak kulit apel *Rome Beauty* pada tikus yang putih yang dipapar plumbum asetat dengan variabel yang diamati secara kuantitatif, dan juga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaplikasian ekstrak kulit apel yang tepat.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, E. M., Saktiyono, dan Lutfi. 2007. *IPA Terpadu SMP dan MTs Jilid 2A*. Erlangga
- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Bahan Antifertilitas*. Penerbit Adabia Press. Jakarta. Hal 4
- Amic, D., D. A. Dusanka, D. Beslo, and Trinastjia. 2003. Structure-Radical Scavenging Activity Relationship of Flavonoid. *Croatia.Chem.Acta*. 76:55-61
- Anam, K. 2009. *SDS-PAGE dengan Silver Staining dan Zimmogram*. Bioteknologi Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Andriani, S. R. D. 2016. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) Terhadap Kadar Malondialdehid dan Gambaran Histopatologi Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Terkena Diabetes Mellitus Tipe 1 dengan Induksi Streptozotocin* [Skripsi]. Malang: Universitas Brawijaya
- Asterina, E. 2014. Pengaruh Timbal Asetat Terhadap Kadar MDA Serum Tikus Putih Jantan. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 3(3): 531-535
- Aziz, A. R., dan A. Marianti. 2014. Efek Paparan Kronik Timbal (Pb) Per Oral pada Struktur Histopatologik Lambung Tikus Putih. *Unnes Journal of Life Science*. 3(2): 87-92
- Balqis, U., R. Tiuria, B. P. Priosoeryanto, dan Darmawi. 2007. Proliferasi Sel Goblet Duodenum, Jejunum, dan Ileum Ayam Petelur yang Diimunisasi dengan Protein Ekskretori/Sekretori *Ascaridia galli*. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 1(2): 70-75
- Bintang, M. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga
- Borges, J. C., and C. H. Ramos. 2005. Protein Folding Assisted by *Chaperones*. *Protein and Peptide Letters*. 12(3): 257-61
- Bredo, R. M. Anatomy of the Liver In Wistar Rat (*Rattus norvegicus*). *International J. Morphol*. Hal 77
- Budhy, T. I., K. Istiati, dan Soehardjo. 2006. Peran Heat Shock Protein (HSP) terhadap Penyakit Rongga Mulut. *Indonesian Journal of Dentistry*.
- 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

- Chinici. 2004. Radical Scavenging Activities of Peels and Pulps From cv. Golden Delicious Apples As Related To Their Phenolic Composition. *J Agric Food Chem.* 52(15): 4684-9
- Danusantoso, H. 2003 Peran Radikal Bebas Terhadap Beberapa Penyakit Paru. *Jurnal Kedokteran Trisakti.* 22(1): 2-15
- Eroschenko, V. P. 2008. *Di Fiore's Atlas Histology with Functional Correlations- 11 th edition.* Lippincott Williams & Wilkins
- Faiz, O. and D. Moffat. 2004. *Anatomy at a Glance.* Jakarta: Erlangga. Hal 34-37
- Fauziyah, K. R. 2016. *Profil Tekanan Darah Normal Tikus Putih (Rattus norvegicus) Galur Wistar dan Sprague-Dawley* [Skripsi]. Bogor: IPB
- Feng, H., L. Wang, Y. Liu, L. He, M. Li, W. Lu, and C. Xue. 2010. Molecular Characterization and Expression of A Heat Shock Protein Gene (HSP90) from Carmine Spider Mite, *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *Journal of Insect Science.* 10(112): 1-14
- Frappier B. L. 2006. *Digestive System.* Di dalam: JA Eurell dan BL Frappier, Editor.
- Gartner L. P, J. L. Hiatt. 2001. *Color Texbook of Histology* Ed ke-2. Philadelphia: W. B Saunders Company. hlm 398-406
- Golding, J. B., W. B. McGlasson, S. G. Wyllie, and D. N. Leach. 2001. Fate of Apple Peel Phenolics During Cold Storage. *J Agric Food Chem.* 49(5): 2283-2289
- Guruswamy, S. 2000. *Engineering Properties and Application of Lead Alloys.* New York: Marcell Dekker
- Gunin, A. 2000. Histology Images. www.histol.chuvashia.com [diakses pada tanggal 4 November 2018]
- Guyton A. C., and J. E. Hall. 1997. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran.* Ed ke-9. Setiawan I, Tengadi K.A., A. Santoso, penerjemah; Setiawan I, editor. Jakarta: EGC. Terjemahan dari: Textbook of Medical Phisiology. hlm 987-1035.
- Guyton, A. and J. E. Hall. 2006. *Textbook of Medical Physicology.* 11th Edition. USA: Elsevier Saunders
- Harahap, I. L. 2017. Efek Protektif Vitamin E pada Epitel Jejunum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Timbal Asetat. *Jurnal Kedokteran Unram.* 6(3): 18-23
- Hariyatmi. 2004. Kemampuan vitamin E sebagai antioksidan terhadap radikal bebas pada usia lanjut. *Jurnal MIPA UMS.* 14: 52-60

- Hazra, B., Sarkar, R., Biswas, S., & Mandal, N. 2010. Comparative study of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties in the extracts of the fruits of Terminalia chebula, Terminalia belerica and Emblica officinalis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 10(1): 2 – 15
- Hidayat, A., W. Christijanti, A. Marianti. 2013. Pengaruh Vitamin E Terhadap Kadar SGPT dan SGOT Tikus Putih Galur Wistar yang Dipapar Timbal. *Unnes Journal of Life Science*. 2(1): 16-21
- Igarashi, H., N. Fujimori, T. Ito, T. Nakamura, T. Oono, K. Nakamura, K. Suzuki, R. T. Jensen, and R. Takayanagi. 2011. Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and VIP Receptors-Elucidation of Structure and Function for Therapeutic Applications. *International Journal of Clinical Medicine*
- Ismaya, R., Rosmaidar, Nazaruddin. 2017. Pengaruh Paparan Timbal (Pb) terhadap Histopatologi Usus Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *JIMVET*. 2(1): 12-16
- Janardani, N. M. K., I. K. Barata, dan I. M. Kardena. 2018. Studi Histopatologi dan Kadar Timbal pada Ginjal Sapi Bali di Tempat Pembuangan Akhir Suwung Denpasar. *Indonesia Medicus Veteriner*. 7(1): 42-50
- Juncqueira L.C. and J. Carneiro. 2007. Histologi Dasar: *Teks dan Atlas*. 10th Edition. Jakarta: EGC
- Junka, N., C. Rattanamechaiskul, C. Wongs-Aree, and S. Kanlaynarat. 2017. Comparative Study of Organic Solvents and Extraction Conditions On Colour and Antioxidant Capacity In Red Cabbage. *International Food Research Journal*. 24(2): 518-524
- Khaira, K. 2010. Menangkal Radikal Bebas dengan Anti-Oksidan. *Jurnal Saintek*. 11(2): 183-187
- Kim, S., P. A. Thiessen, E. E. Bolton, J. Chen, G. Fu, A. Gindulyte, L. Han, J. He, S. He, B. A. Shoemaker, J. Wang, B. Yu, J. Zhang, S. H. Bryant. PubChem Substance and Compound Database. *Nucleic Acid Res*. 44(D1): D1202-13
- Kumalaningsih S. 2007. *Antioksidan Alami*. Surabaya (ID): Trubus Agrisarana
- Kusuma, A. N. 2013. *Studi Terapi Perasan Buah Labu Siam (Sechium edule) Terhadap Aktivitas Protease dan Profil Protein Ileum Tikus (Rattus norvegicus) Inflammatory Bowel Disease (IBD) Hasil Induksi Indometasin*. [Skripsi]. Malang: Universitas Brawijaya
- 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 Agri Food Chem*. 51(22): 6516-6520

- Lestari, B. M. 2012. Peran Sel Kupffer pada Steatohepatitis Alkohol. *Jurnal Biomedik*. 4(2): 79-87
- McEwen, S. A., and M. B. McNab. 1997. Contaminants Of Nonbiological Origin in Foods From Animals. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*. 16(2): 684-693
- McGavin, M. D., and J. F. Zachary. Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4th Edition. *Can Vet Journal*. 48(7): 724
- Morikawa, K., M. Nonaka, M. Narahara, I. Torii, K. Kawaguchi, and T. Yoshikawa, Y. Kumazawa, and S. Morikawa, 2003, Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci.*, 26(6), 709-21
- Mustafa, N. G., E. S. Mustafa, and S. T. Abdullah. 2018. Histopathological Study of Chick Intestine: Effect of Probiotic and Lead Acetate. *Raf. J. Sci.* 27(1): 8-14
- Napitupulu, R. R. J. 2008. *Pengaruh Pemberian Kalsium Secara Oral Terhadap Kadar Plumbum dalam Darah Mencit (Mus musculus L.)* [Skripsi]. Medan: USU
- Naria, E. 2005. Mewaspadai Dampak Bahan Pencemar Timbal (Pb) di Lingkungan Terhadap Kesehatan. *J Komunik. Penelit.* 17(4): 66-72
- Nuraini, D. N. 2011. *Aneka Manfaat Kulit Buah dan Sayuran*. Andi Offset. Yogyakarta
- Nurfadillah, A. R. 2013. *Cemaran Logam Berat dalam Air PDAM Kota Gorontalo*. [Skripsi]. Gorontalo: Universitas Gorontalo
- Nurbaya, F., dan Y. Wijayanti. 2010. Faktor Risiko yang Berhubungan dengan Kadar Timah Hitam dalam Darah. *Jurnal Kemas* 6(1): 51-56.
- Octaviany, V. D., H. Yusmaini, 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)
- Pala F. S., and T. Kiyemet. 2007. Free Radical: Our Enemies or friends?. *Advances in Molecular Biology*. (1): 63-69
- Primadina, N. 2019. Proses Penyembuhan Luka Ditinjau dari Aspek Mekanisme Seluler dan Molekuler. *Qanun Medika*. 3(1): 31-43
- Pietta, G. Flavonoids as Antioxidant. *J Nat Prod*. 63(7):1035-1042
- Pratiwi, R. 2001. Mengenal Metode Elektroforesis. *Oseana*. 26(1): 25-31
- Price, S. A. And L. M. Wilson. Patofisiologi: *Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. 6th Edition. Jakarta: EGC. Hal 437-443

- Putri, M. G. T., L. Wijaya, dan P. K. Sasmita. Melatonin sebagai Antipenuaan Kulit Akibat Sinar Ultraviolet. *Darnianus Journal of Medicine*. 14(1): 67-79
- Rahayu, A. S. K. 2016. *Pengaruh Sari Buah Apel Rome Beauty (Malus sylvestris Mill) Terhadap Produksi Trombosit pada Mencit (Mus musculus L.) Balb-C dan Pemanfaatannya sebagai Buku Ilmiah Populer*. [Skripsi]. Jember: Universitas Jember
- Rahmawati, S. 2014. *Preferensi Konsumen Terhadap Apel Lokal dan Apel Impor Dengan Metode Multifishbein untuk Upaya Peningkatan Pemasaran Apel Lokal*. [Skripsi]. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada
- Redha A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya dalam System Biologis. *Jurnal Belian*. 9(2): 196-202
- Robbin. 2007. *Buku Ajar Patologi*. Jakarta: Penerbit buku Kedokteran EGC
- Sadikin, M. 2008. *Radikal Bebas Harus Dikendalikan*. Media Indonesia. Hal 17
- Saputra, F. R. 2014. *Aplikasi Metode SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electroforesis) untuk Mengidentifikasi Sumber Gelatin pada Kapsul Keras* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Schmalhausen, E. V., E. B. Zhlobek, I. N. Shalova, O. Firuzi, L. Saso, and V. I. Muronetz. 2007. Antioxidant and Prooxidant Effects of Quercetin on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Food and Chemical Toxicology*. 45, 1988–93
- School of Anatomy and Human Biology, The University of Western Australia. 2009. Blue Histology-gastrointestinal Tract. <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au>. [diakses pada tanggal 4 November 2018]
- Sembel, D. T. Toksikologi Lingkungan: *Dampak Pencemaran dari Berbagai Bahan Kimia dalam Kehidupan Sehari-hari*. Yogyakarta: Andi Offset
- Shackelford C. C., and M. R. Elwell. 1999. Small and Large Intestine, and Mesentary. Di dalam: RR Maronpot, GA Boorman, BW Gaul, Editor. *Pathology of the Mouse Reference and Atlas*. Vienna: Cache River Press. hlm 81-115.
- 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
- Simanjuntak, K. 2012. Mekanisme Radikal Bebas Terhadap Induksi Karsinogenesis. *Bina Widya*. 23(5): 256-263
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. United States of America: Mosby Inc.

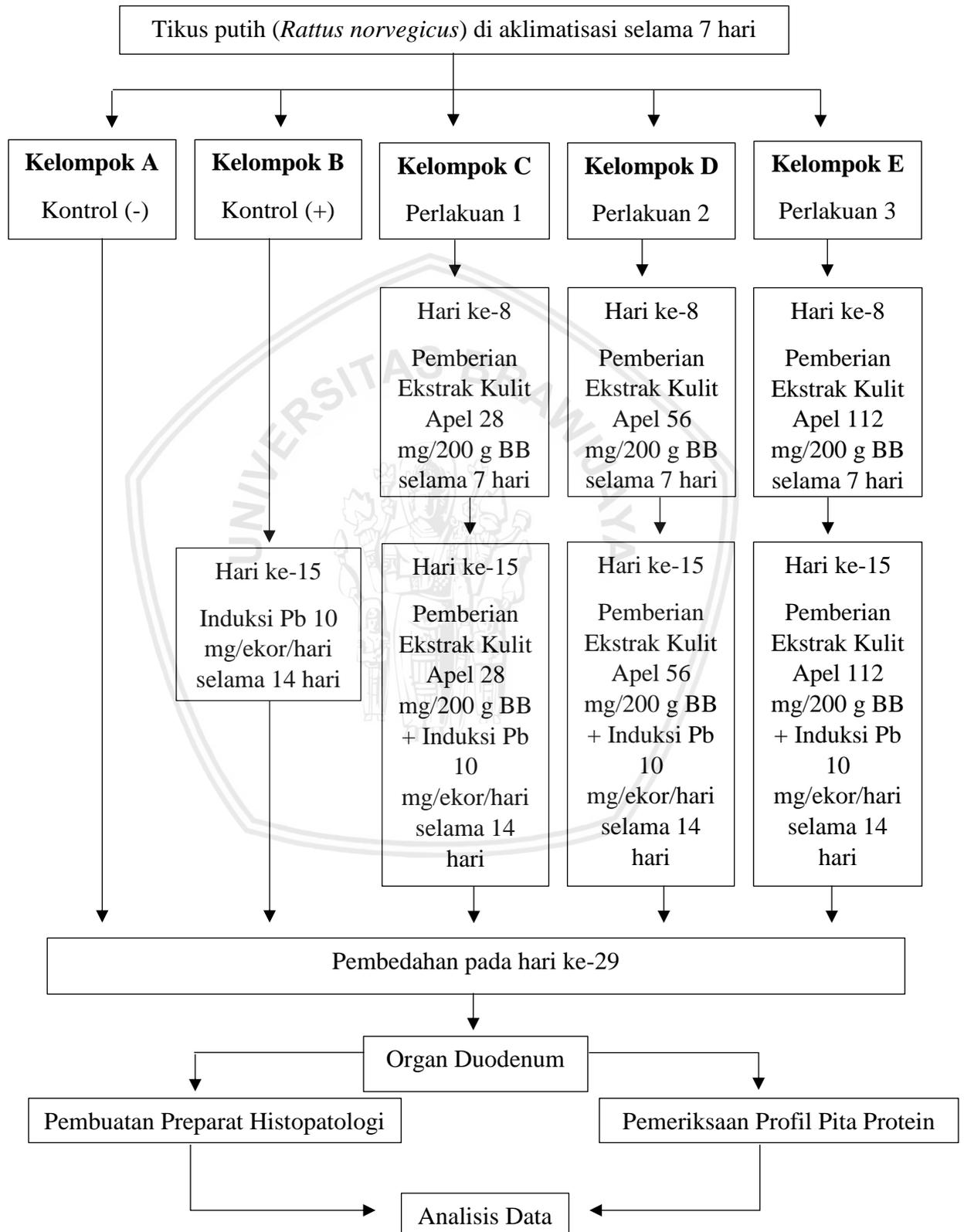
- Snell, R. 2006. *Clinical Anatomy for Medical Student*. 6th Edition. Jakarta: EGC. Hal 223-226
- Soehono, L. A. 2016. *Pengantar Perancangan Percobaan, Suatu Pendekatan Praktis Analisis Data Menggunakan Software GenStat*. Malang: UB Press
- Subagyo, P. Dan Z. Achmad. 2010. Pemungutan Pektin dari Kulit dan Ampas Apel secara Ekstraksi. *Jurnal Ilmiah Jurusan Teknik Kimia*. 10(2): 47-51
- Subroto MA, Saputro H. 2006. *Gempur Penyakit dengan Sarang Semut*. Jakarta: PS.
- Sudarwin. 2008. *Analisis Spasial Pencemaran Logam berat (Pb dan Cd) pada Sedimen Aliran Sungai dari Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Sampah Jatibarang Semarang* [Tesis]. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Sufrida Y. 2007. *Khasiat dan Manfaat apel*. Jakarta: PT Agromedia Pustaka. Hal. 23-24
- Sumardika, I. W. dan I. M. Jawi. 2012. Ekstrak Air Daun Ubijalar Ungu Memperbaiki Profil Lipid dan Meningkatkan Kadar SOD Darah Tikus yang Diberi Makanan Tinggi Kolesterol. *Jurnal Ilmiah Kedokteran*. 43(2): 67-70
- 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
- Suyanto, A., S. Kusmiyati, dan C. H. Retnaningsih. 2010. Residu Logam Berat dalam Daging Sapi yang Dipelihara Tempat Pembuangan Sampah Akhir. *Jurnal Pangan dan Gizi*. 1(1): 15-23
- Tjitrosoepomo, G. 2005. *Morfologi Tumbuhan*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press
- Treuting, P. M., S. M. Dintiz, and K. S. Montine. 2018. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas*. 2nd Edition. London: Academic Press
- Wahyuni, O. P. S. 2011. *Gambaran Histopatologi Duodenum dan Ekspresi Inducible Nitrit Oxide Synthase (iNOS) pada Tikus (Rattus norvegicus) Hiperkolesterolemia dengan Terapi Yoghurt Susu Kambing*. [Skripsi]. Malang: Universitas Brawijaya
- Watts, S. 2002. *The Elements Lead*. New York: Benchmark Books
- Winarsi, H. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius
- Wiryani, C. dan K. Suwitra. 2010. Pengaruh Vitamin C Terhadap Kadar Serum Feritin Pada Pasien Gagal Ginjal Kronik dengan Hemodialisis Reguler. *Jurnal Penyakit Dalam*. 11(2): 69-76

Wuragil, L. H. 2007. *Gambaran Histopatologi Pencernaan Tikus pada Pemberian Fraksi Asam Amino Non-Protein dan Fraksi Polifenol Lamtoro Merah (Acacia villosa)*. [Skripsi]. Bogor: IPB





Lampiran 1. Rancangan 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
norvrgicus*) 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. drh. Aulanni'am, DES.
 19600903 198802 2 001

Lampiran 3. Pembuatan 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

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
TARSISIUS HANDARU CAHYO P	155130101111052	HEWAN
DEVINA ANDINI GHASSANA	155130101111043	UNIVERSITAS BRAWIJAYA
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

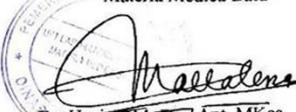
No.	Parameter	Hasil
1	Proses	
	a. Metode	Maserasi
	b. Jumlah perlakuan	1 kali
	c. Pelarut	Etanol 70%
	d. Jumlah pelarut	1700 ml
	e. Waktu evaporasi	1.5 jam
2	Hasil	
	a. Bentuk sediaan	Cair
	b. Bahan tambahan	-
	c. Kadar air	-
	d. Berat / volume	60 ml

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 RM, 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

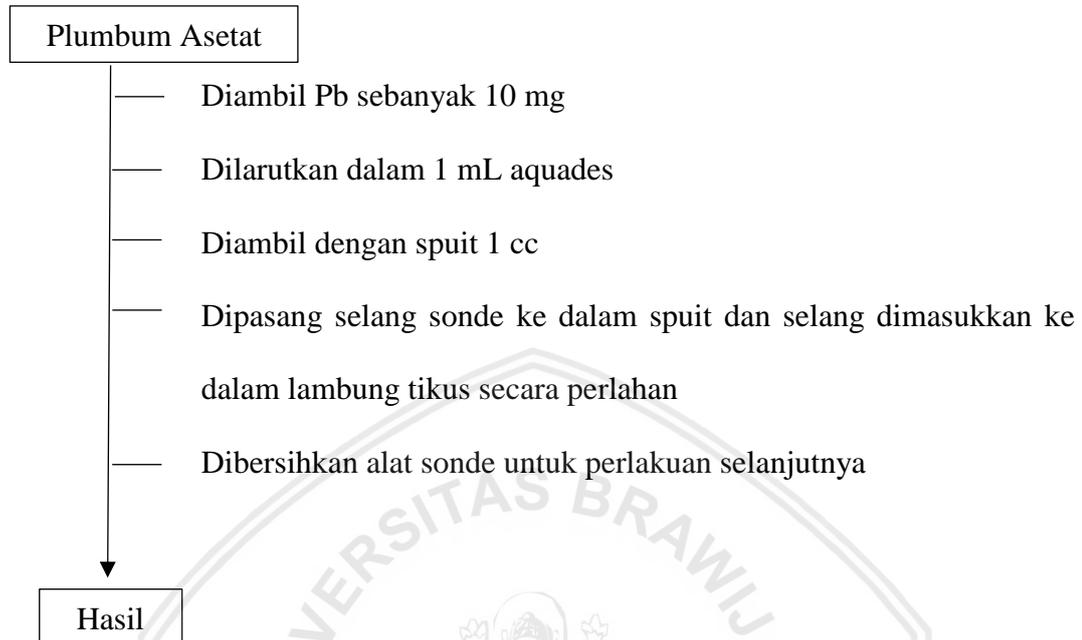
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1978. "Materia Medika Indonesia", Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.

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. Pemberian Plumbum Asetat



Perhitungan volume pemberian plumbum asetat

Dosis Plumbum = 10 mg/ekor/hari

Jumlah Pb yang dibutuhkan = Dosis Plumbum x jumlah tikus

$$= 10 \text{ mg/ekor/hari} \times 16 \text{ ekor tikus}$$

$$= 160 \text{ mg/hari}$$

$$= 0,16 \text{ g/hari}$$

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

Lampiran 6. Perhitungan Dosis Ekstrak Kulit Apel

1. Dosis 1 (28 mg/ 200 g BB)

- BB rata-rata tikus kelompok perlakuan 1 = 197 g
- Konsentrasi ekstrak kulit apel = 1000 mg/mL

$$\text{➤ Volume ekstrak yang diperlukan} = \frac{\frac{197 \text{ gram}}{200 \text{ gram}} \times 28 \text{ miligram}}{1000 \text{ mg/mL}} = 0.0276 \text{ mL}$$

$$\text{➤ Volume Aquades} = 1 \text{ mL} - 0.02758 \text{ mL} = 0.97 \text{ mL}$$

2. Dosis 2 (56 mg/ 200 g BB)

- BB rata-rata tikus kelompok perlakuan 2 = 181 g
- Konsentrasi ekstrak kulit apel = 1000 mg/mL

$$\text{➤ Volume ekstrak yang diperlukan} = \frac{\frac{181 \text{ gram}}{200 \text{ gram}} \times 56 \text{ miligram}}{1000 \text{ mg/mL}} = 0.0507 \text{ mL}$$

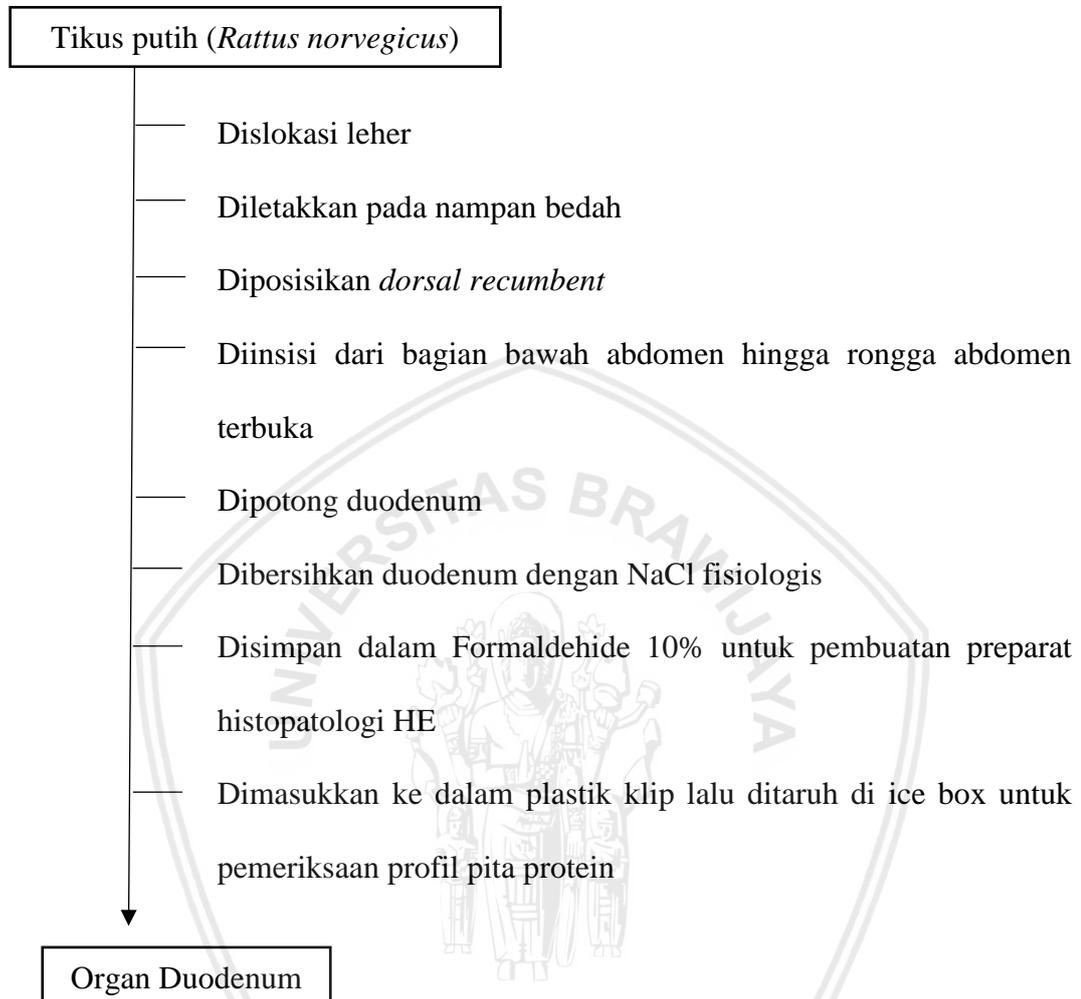
$$\text{➤ Volume Aquades} = 1 \text{ mL} - 0.05068 \text{ mL} = 0.95 \text{ mL}$$

3. Dosis 23(112 mg/ 200 g BB)

- BB rata-rata tikus kelompok perlakuan 3 = 205,6 g
- Konsentrasi ekstrak kulit apel = 1000 mg/mL

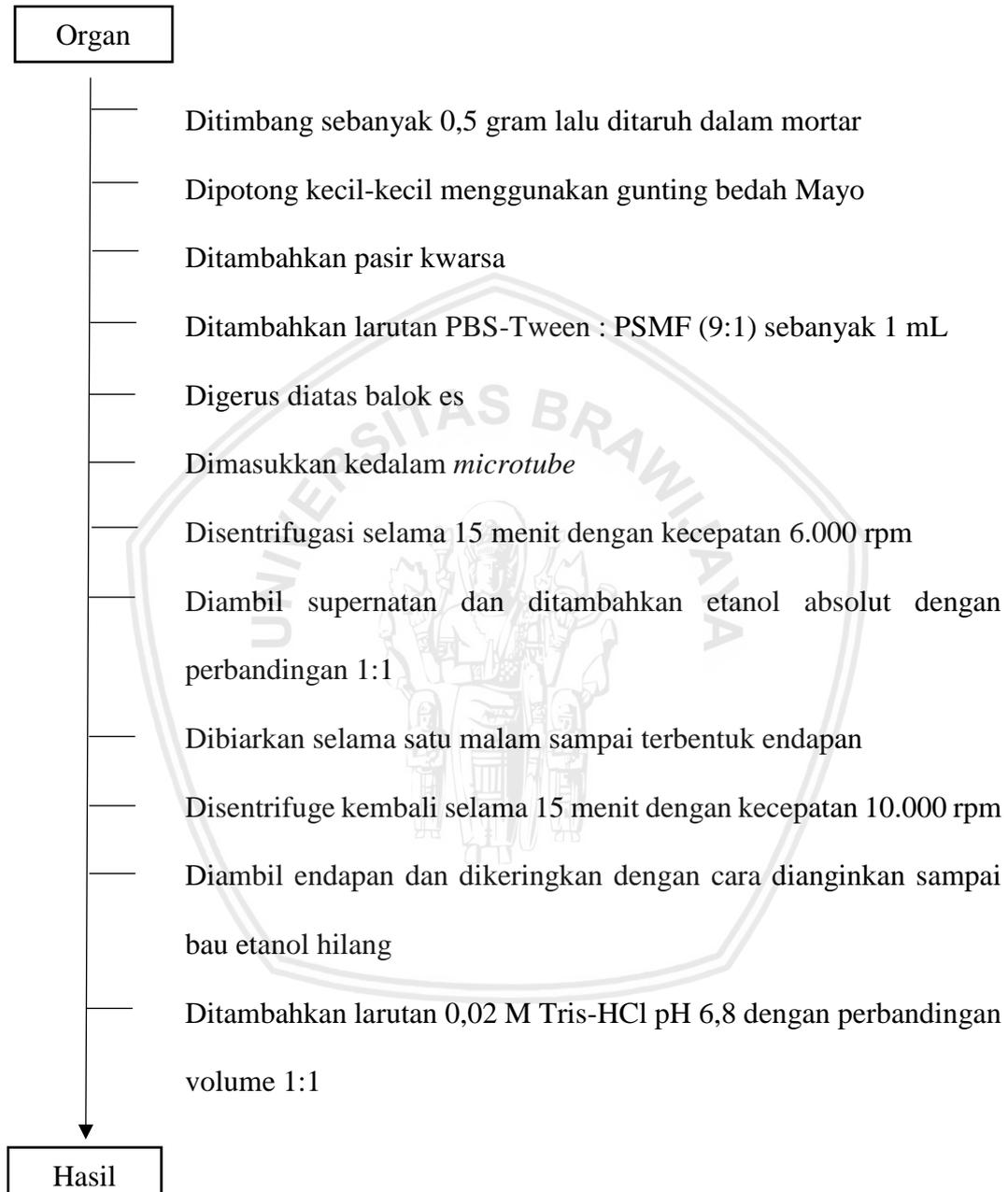
$$\text{➤ Volume ekstrak yang diperlukan} = \frac{\frac{205,6 \text{ gram}}{200 \text{ gram}} \times 112 \text{ miligram}}{1000 \text{ mg/mL}} = 0.1151 \text{ mL}$$

$$\text{➤ Volume Aquades} = 1 \text{ mL} - 0.1151 \text{ mL} = 0.88 \text{ mL}$$

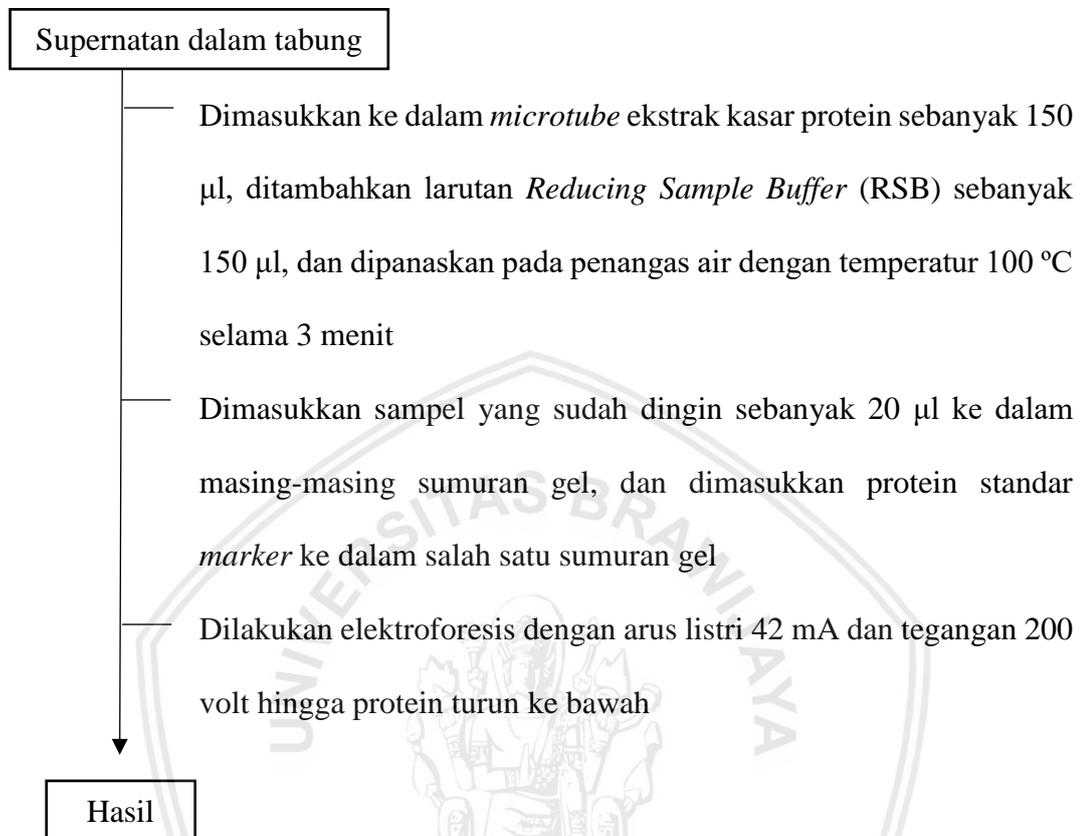
Lampiran 7. Pengambilan Organ Duodenum

Lampiran 8. Penentuan Profil Pita Protein dengan SDS-PAGE

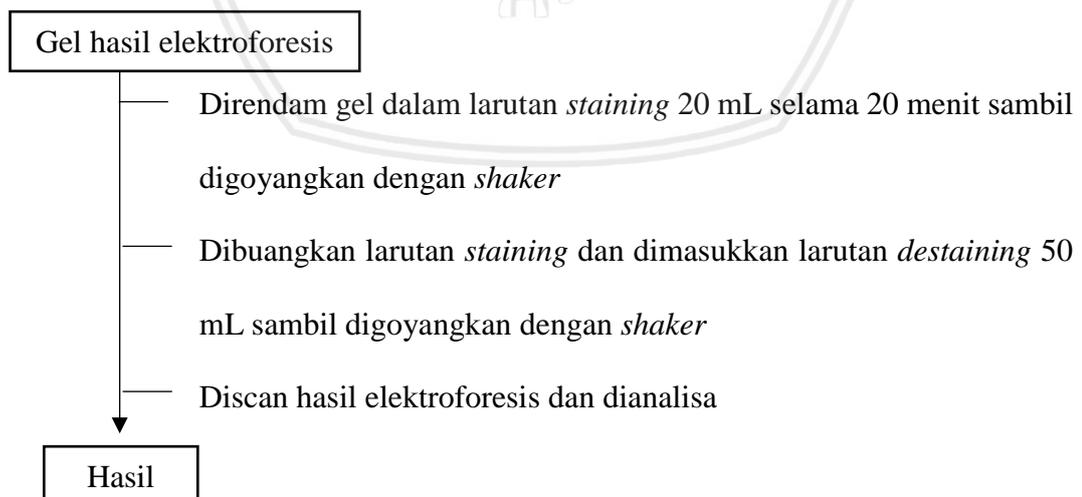
A. Isolasi Protein



B. Proses SDS-PAGE

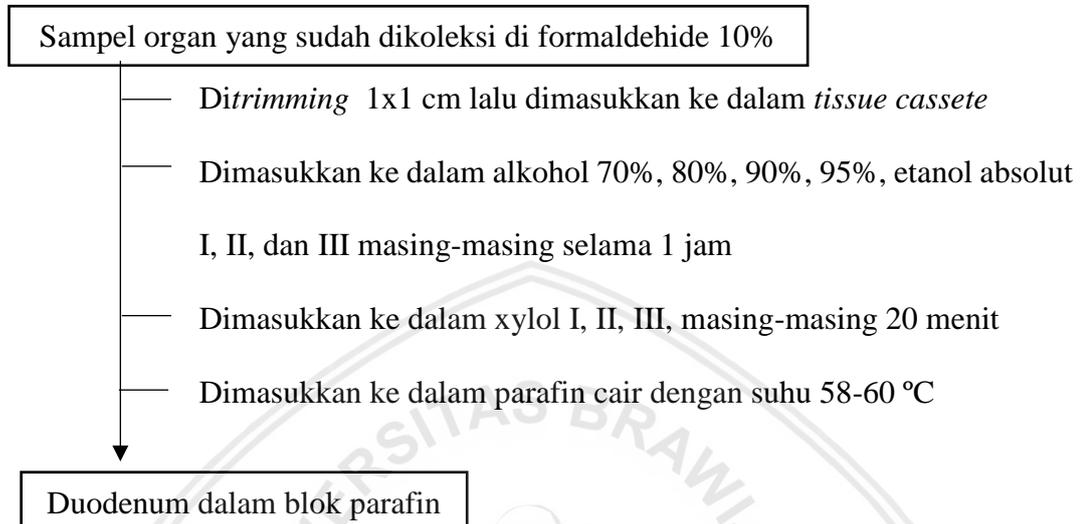


C. Pewarnaan dengan *Comassie Brilliant Blue*

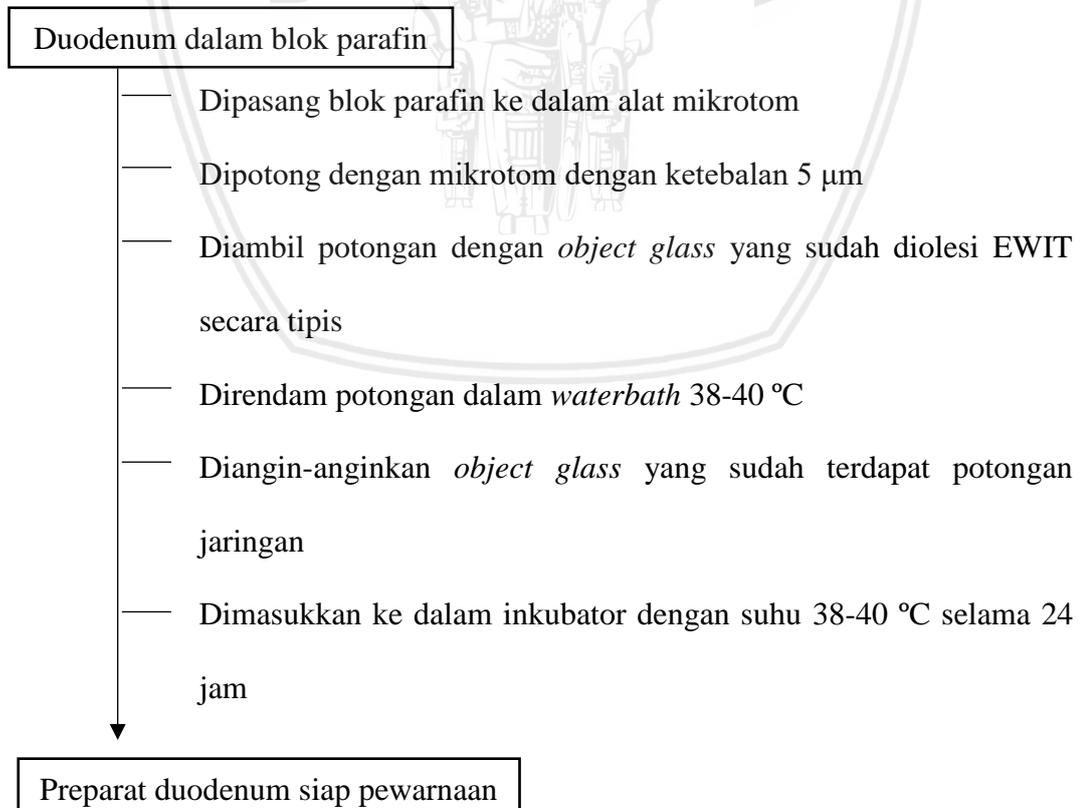


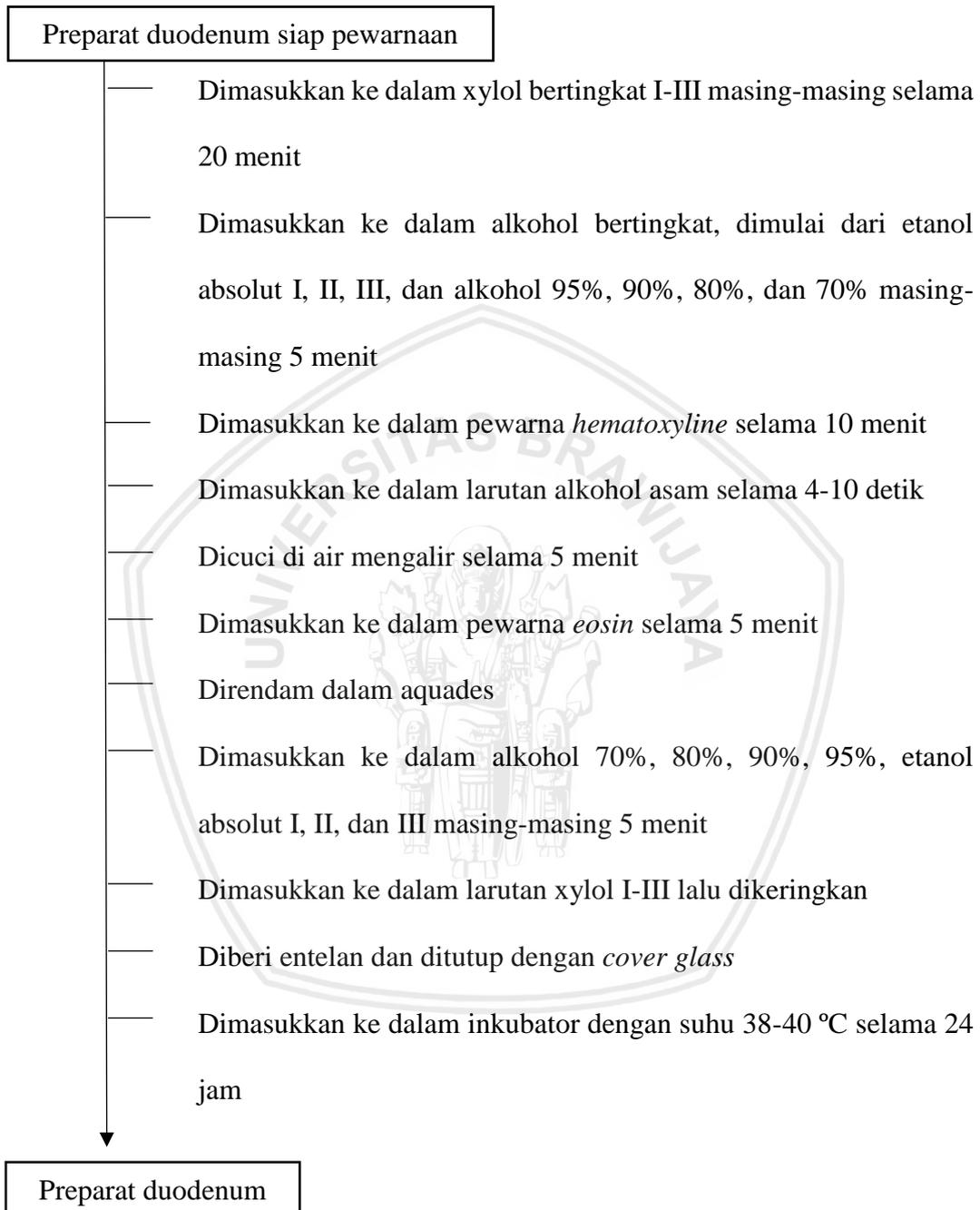
Lampiran 9. Pembuatan Preparat Histopatologi Organ Duodenum

A. Pengambilan Sampel-*Embedding* Duodenum



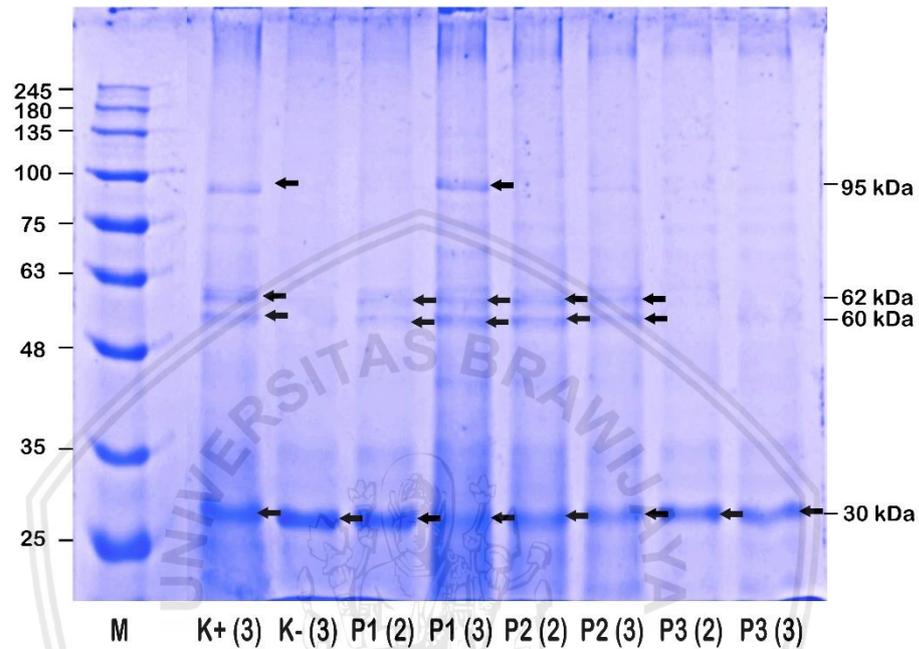
B. Proses *Sectioning* dan *Mounting*



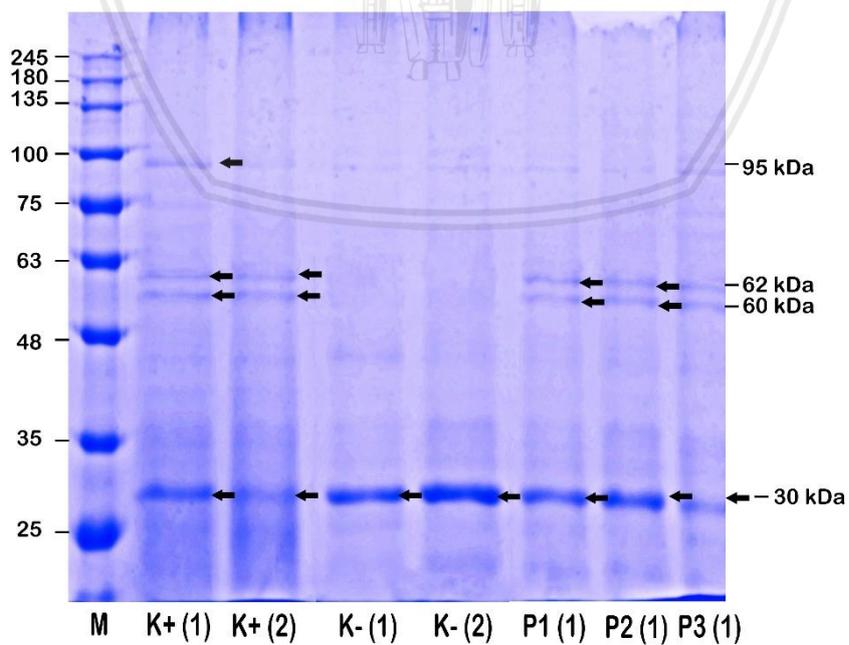
C. Pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE)

Lampiran 10. Profil Pita Protein Duodenum Tikus yang dipapar Plumbum asetat

a. Gel 1



b. Gel 2



c. Profil protein duodenum seluruh kelompok perlakuan berdasarkan berat molekul

Perlakuan	BM (kDa)			
	95	62	60	30
K+ (1)	✓	✓	✓	✓
K+ (2)	–	✓	✓	✓
K+ (3)	✓	✓	✓	✓
K- (1)	–	–	–	✓
K- (2)	–	–	–	✓
K- (3)	–	–	–	✓
P1 (1)	–	✓	✓	✓
P1 (2)	–	✓	✓	✓
P1 (3)	✓	✓	✓	✓
P2 (1)	–	✓	✓	✓
P2 (2)	–	✓	✓	✓
P2 (3)	–	✓	✓	✓
P3 (1)	–	✓	✓	✓
P3 (2)	–	–	–	✓
P3 (3)	–	–	–	✓

Lampiran 11. Dokumentasi Penelitian



Pembuatan ekstrak kulit apel



Preparasi dosis ekstrak kulit apel dengan aquades



Pemberian plumbum asetat



Pemberian ekstrak kulit apel



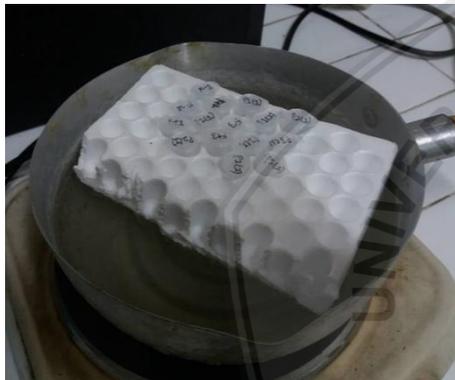
Nekropsi tikus dan pengambilan sampel darah



Nekropsi tikus dan pengambilan organ



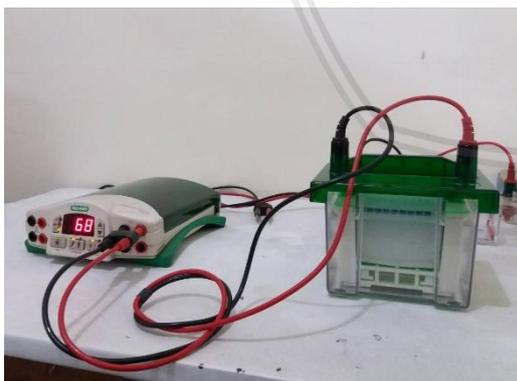
Isolasi protein untuk analisis profil pita protein



Persiapan sampel untuk *running* elektroforesis



Pembuatan gel



Running elektroforesis