

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Efek Pemberian Ekstrak Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Sepsis Induksi *Escherichia coli* Berdasarkan Kadar SOD Plasma

Hasil pengukuran aktivitas SOD plasma tikus putih (*Rattus norvegicus*) dianalisa menggunakan SPSS 16.0 berdasarkan uji statistik *OneWay* ANOVA dan uji BNT pada tingkat signifikansi $p < 0,05$, didapat data seperti pada **Tabel 5.1**. Data pengujian statistik dijelaskan pada **Lampiran 8**

Tabel 5.1. Rata-rata Kadar SOD plasma tikus putih (*Rattus norvegicus*)

| Perlakuan | Rata-rata Kadar SOD $\mu\text{g/mL}$ |
|------------------------------|--------------------------------------|
| Kontrol negatif (A) | $6,997 \pm 0,67^b$ |
| Kontrol positif (B) | $5,483 \pm 0,64^a$ |
| Dosis terapi 10 mg/kg BB (C) | $5,650 \pm 0,60^{ab}$ |
| Dosis terapi 20 mg/kg BB (D) | $6,192 \pm 0,80^{ab}$ |
| Dosis terapi 30 mg/kg BB (E) | $6,539 \pm 0,24^b$ |

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

Hasil penelitian (**Tabel 5.1**) menunjukkan kadar SOD plasma tikus model sepsis yang diterapi dengan ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) kelompok terapi dosis 10 mg/kg BB ($5,650 \pm 0,60$) (C) dan 20 mg/kg BB ($6,192 \pm 0,80$) (D) tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif. Nilai rata-rata kadar SOD plasma kelompok terapi dosis 30 mg/kg BB berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol positif.

Rata-rata kadar SOD plasma pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok kontrol negatif (A) adalah $6,997 \pm 0,67 \mu\text{g/mL}$. Nilai tersebut menunjukkan standar nilai rata-rata kadar SOD plasma pada tikus dalam kondisi normal. *Superoksida dismutase* (SOD) termasuk kedalam antioksidan enzimatis

bersama dengan CAT dan GPx. Enzim-enzim antioksidan tersebut dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal dan merubah senyawa radikal menjadi lebih stabil melalui ikatan radikal-antioksidan. Antioksidan enzimatis bekerja dengan cara mencegah pembentukan senyawa radikal bebas baru, atau mengubah senyawa radikal yang telah terbentuk menjadi senyawa yang kurang reaktif (Chevion *et al.*, 2003). *Superoksida dismutase* (SOD) merupakan enzim yang berperan mengkatalis dismutase radikal O_2^- menjadi H_2O_2 dan O_2 . Cara kerja SOD merubah O_2^- menjadi O_2 dan H_2O_2 adalah melalui mekanisme reduksi dan oksidasi pada ion logam terhadap superoksida dan asam konjugasi (peroksidhidril) secara bersamaan. Enzim tersebut memerlukan mineral, seperti Mn, Zn, dan Cu untuk menunjang aktivitas. Mineral-mineral tersebut harus tersedia dalam jumlah yang cukup agar enzim SOD dapat bekerja secara optimal (Abreu dan Diane, 2010). Rata-rata kadar SOD plasma tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok kontrol positif (B) menunjukkan nilai paling rendah yaitu $5,483 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$.

Nilai rata-rata aktivitas SOD plasma pada kelompok kontrol positif (B) ($5,483 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$) berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol negatif (A) ($6,997 \pm 0,67 \mu\text{g/mL}$) dan juga terjadi penurunan kadar SOD plasma sebesar 22%. Hal tersebut membuktikan bahwa induksi *Escherichia coli* yang diberikan pada perlakuan tersebut mampu menyebabkan penurunan aktivitas SOD pada kondisi sepsis berdasarkan pemeriksaan kadar SOD plasma.

Kondisi sepsis menyebabkan fungsi SOD terganggu, terjadi peningkatan produksi SOR yang menyebabkan stres oksidatif (Sumardika dan I Made, 2012).

Pada kondisi fisiologis, selalu terdapat keseimbangan jumlah antara radikal bebas dengan antioksidan. Keseimbangan tersebut akan terganggu apabila produksi SOR berlebihan. Pada keadaan sepsis, terdapat berbagai sumber potensial dari SOR, antara lain transport elektron pada mitokondria, aktivasi XO sebagai hasil dari iskemia dan reperfusi, pembakaran yang berhubungan dengan aktivasi sel imun, dan juga dari metabolisme asam arachidonat (Radin, 2015). Aktivasi dari sel imun akan menghasilkan radikal O_2^- yang merupakan agen sitotoksik. Radikal O_2^- yang sangat reaktif akan diubah oleh enzim SOD menjadi H_2O_2 dan O_2 . Hidrogen peroksida (H_2O_2) kemudian diubah oleh enzim CAT dan GPx menjadi molekul air. Aktivasi sel imun yang masif pada saat sepsis menyebabkan produksi radikal O_2^- menjadi berlebihan. Produksi SOR yang tidak diikuti dengan peningkatan jumlah antioksidan menyebabkan stres oksidatif. Kondisi stres oksidatif ini ditandai dengan inaktivasi enzim antioksidan seperti SOD (Comhair *et al.*, 2005).

Hasil rata-rata kadar SOD plasma pada kelompok terapi dosis 10 mg/kg BB(C) dan 20 (D) mg/kg BB, tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif (B). Hal ini menunjukkan bahwa terapi ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) perlakuan dosis 10 dan 20 mg/kg BB belum cukup untuk meningkatkan kadar SOD plasma tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada kondisi sepsis. Nilai rata-rata kadar SOD plasma kelompok terapi dosis 30 mg/kg BB (E) berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif (B), hal tersebut membuktikan bahwa terapi ekstrak ragi dosis 30 mg/kg BB cukup untuk meningkatkan kadar SOD plasma tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada kondisi sepsis. Nilai rata-rata

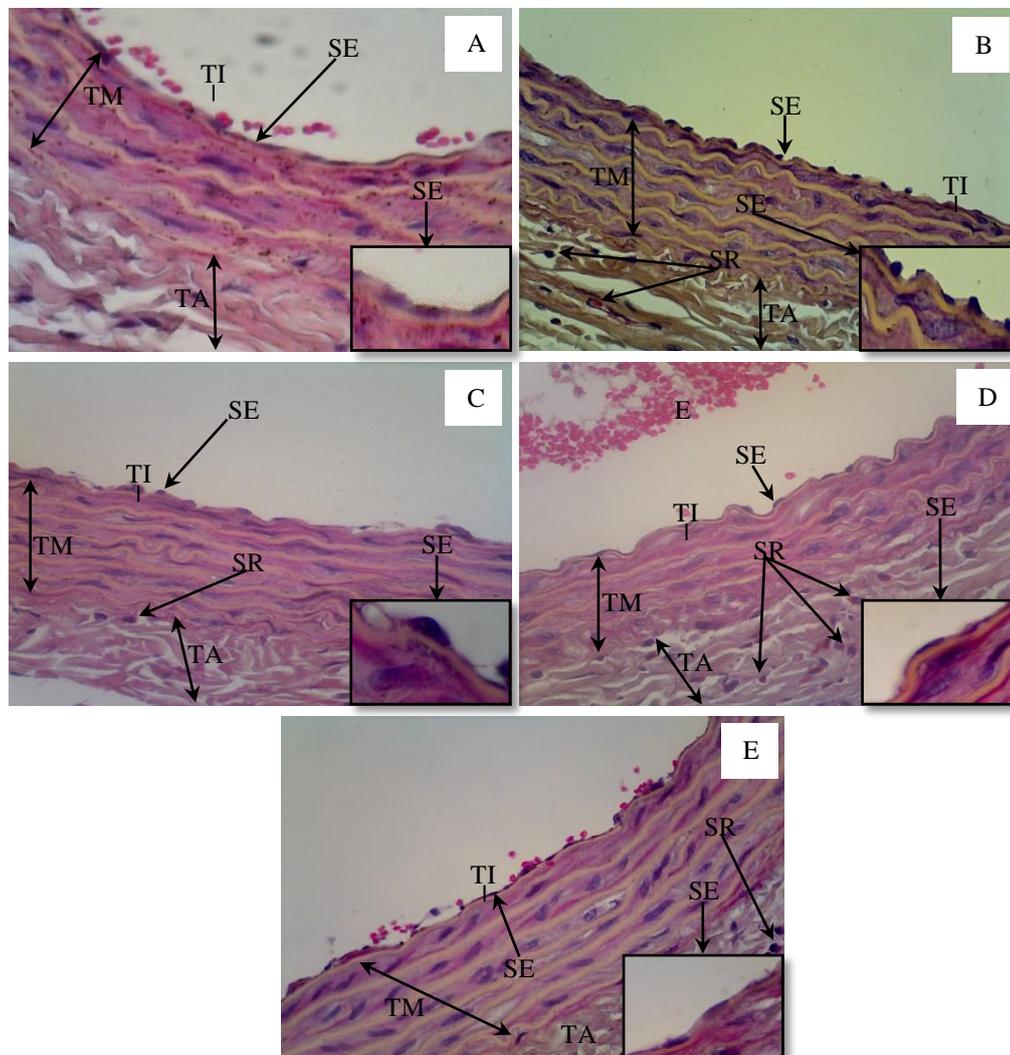
kadar SOD plasma pada kelompok terapi C dan kelompok terapi D tidak berbeda nyata dengan kelompok E. Dari ketiga kelompok terapi yang berbeda, hanya kelompok terapi E yang berbeda nyata terhadap kelompok kontrol positif. Hasil terbaik ditunjukkan pada perlakuan dosis terapi 30 mg/kg BB yaitu aktivitas SOD yang paling mendekati kontrol negatif dibandingkan dengan kelompok terapi dosis 10 (C) dan kelompok terapi dosis 20 mg/kg BB (B). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak ragi dengan dosis 10, 20, dan 30 mg/kg BB selama lima hari, menyebabkan peningkatan enzim SOD plasma. Hal ini dapat terjadi dikarenakan senyawa atau bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) berperan sebagai antioksidan. Kandungan bioaktif berupa betaglukan yang terdapat di dalam ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*), mampu meningkatkan aktivitas SOD plasma karena betaglukan memiliki aktivitas antioksidan dengan cara mendonorkan elektron kepada radikal bebas dan menekan produksi radikal bebas hasil aktivasi sel-sel imun. Pemberian terapi ekstrak ragi pada kondisi sepsis dapat dilakukan mulai pada dosis 10 mg/kg BB. Dengan dosis terapi 10 mg/kg BB sudah terdapat peningkatan aktivitas SOD plasma walaupun tergolong kecil. Berdasarkan hasil penelitian ini, ekstrak ragi yang diberikan untuk terapi sepsis disarankan menggunakan dosis 30 mg/kg BB.

Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Andriani (2007), betaglukan mampu meningkatkan aktivitas antioksidan endogen seperti SOD, GPx, dan CAT. Aktivitas betaglukan sebagai antioksidan disebabkan karena betaglukan memiliki gugus hidroksil. Atom hidrogen yang terdapat didalam gugus

hidroksil tersebut berperan sebagai elektron donor dan mengubah molekul radikal menjadi molekul yang lebih stabil.

Sandvik *et al.*, (2006) menyatakan bahwa betaglukan berpotensi menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi yang menyebabkan aktivasi sel imun secara sistemik. Aktivasi sel imun merupakan salah satu sumber potensial dari SOR pada kondisi sepsis. Betaglukan memiliki reseptor spesifik *dectin-1* yang terdapat di makrofag. Seperti diketahui bahwa makrofag memiliki peran sentral dalam aktivasi sel-sel imun. Ikatan antara betaglukan dengan reseptor spesifik *dectin-1* akan memodulasi makrofag meningkatkan sitokin antiinflamasi dan menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF α , IL-1, IL-6, dan IL-12 (Du *et al.*, 2014). Aktivasi sel imun yang berlebihan perlahan akan mengalami penurunan dengan produksi sitokin proinflamasi yang berkurang, sehingga radikal bebas yang dihasilkan dari proses aktivasi sel imun akan mengalami penurunan. Jumlah radikal bebas dengan antioksidan akan kembali seimbang, sehingga aktivitas enzim SOD akan kembali normal. Penurunan jumlah radikal bebas dapat diketahui dari peningkatan kadar SOD plasma.

5.2 Efek Pemberian Ekstrak Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Sepsis Induksi *Escherichia coli* Berdasarkan Gambaran Histopatologi Aorta Abdominal



Gambar 5.1 Histopatologi Aorta Abdominal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (HE, 400x)

- Kontrol negatif, sel endotel normal
- Kontrol positif
- Kelompok terapi dosis 10 mg/kg BB, masih ditemukan sel endotel yang mengalami nekrosis
- Kelompok terapi dosis 20 mg/kg BB, terjadi penurunan sel endotel yang mengalami nekrosis, struktur sel endotel mengalami perbaikan
- Kelompok terapi dosis 30 mg/kg BB, terjadi penurunan sel endotel yang mengalami nekrosis dan perbaikan struktur sel endotel mendekati kontrol negatif

Keterangan: (E): Eritrosit; (SE): Sel Endotel; (SR): Sel Radang; (TA): Tunika Adventisia; (TI): Tunika intima (TM): Tunika Media

Gambaran histopatologi kelompok kontrol negatif (A) menunjukkan sel endotel yang terletak pada tunika intima terlihat normal. Struktur sel endotel normal berbentuk pipih poligonal dan nukleus normal tidak mengalami perubahan bentuk. Tidak ditemukan sel endotel yang mengalami nekrosis dan struktur lapisan tunika intima tampak teratur, pada lapisan tunika adventisia tidak dijumpai sel-sel radang.

Kelompok kontrol positif (B), secara histopatologi terlihat sel endotel yang mengalami nekrosis, nukelus sel tampak piknotik, dan struktur dari tunika intima menjadi tidak teratur. Pada lapisan tunika adventisia terdapat infiltrasi sel-sel radang berupa makrofag. Matsuda *et. al.*, (2009) menunjukkan bahwa induksi sepsis dengan *Escherichia coli* menyebabkan nekrosis sel endotel. Gambaran histopatologi endotel yang mengalami nekrosis, yaitu nukleus mengalami piknotik (terlihat lebih bundar, ukuran lebih kecil, dan gelap) dan struktur tidak jelas. Radin (2015) menjelaskan bahwa pada kondisi sepsis terjadi peningkatan sitokin-sitokin proinflamasi seperti, TNF- α , IL-1 β , dan IL-6 yang dapat menyebabkan kematian sel-sel endotel. Sitokin-sitokin tersebut akan menyebabkan penarikan neutrofil dan monosit ke lokasi infeksi dengan cara menginduksi sel-sel endotel untuk mensekresikan ICAM-1. Produksi ICAM-1 menyebabkan neutrofil melakukan adhesi dan mengeluarkan enzim lisozim yang menyebabkan nekrosis sel endotel. Guntur (2008) juga menyebutkan bahwa makrofag dan neutrofil juga mensekresikan molekul radikal O_2^- , molekul radikal berikatan dengan lipid yang terdapat pada membran sel menyebabkan gangguan permeabilitas sel. Ketika membran sel mengalami kerusakan yang diakibatkan oleh lisozim dan molekul

radikal, endotel tidak dapat mempertahankan struktur sel. Pada kondisi tersebut, lisosom mengeluarkan enzim lisozim ke dalam sitoplasma menyebabkan kerusakan organel sel. Isi sel keluar ketika sel lisis dikarenakan kerusakan membran sel. Infiltrasi sel radang pada lapisan tunika adventisia disebabkan oleh kerusakan pembuluh darah (venule dan arteriol) akibat proses inflamasi. Pada kondisi sepsis, sitokin proinflamasi dengan jumlah besar dalam sistem sirkulasi menyebabkan inflamasi pada pembuluh darah kecil seperti venule dan arteriol. Inflamasi yang terjadi menyebabkan defek vaskuler sehingga sel-sel radang menginfiltrasi lapisan tunika adventisia (Guntur, 2008).

Pada kelompok terapi dosis 10 mg/kg BB (C), secara histopatologi masih terdapat nekrosis pada sel endotel. Sel endotel dengan struktur yang normal lebih sukar ditemukan dibandingkan dengan sel endotel yang mengalami nekrosis. Struktur lapisan tunika intima tidak teratur, terdapat sel radang yang menginfiltrasi lapisan tunika adventisia. Struktur tunika intima yang tidak teratur disebabkan oleh nekrosis endotel akibat inflamasi, yang diperantarai oleh jumlah sitokin proinflamasi yang tinggi dalam sistem sirkulasi (Matsuda *et al.*, 2009). Kerusakan jaringan yang masih ditemukan pada kelompok terapi dosis 10 mg/kg BB (C), mengindikasikan bahwa terapi ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dengan dosis 10 mg/kg BB selama 5 hari, belum memberikan hasil terhadap perbaikan jaringan pada aorta abdominal.

Pada kelompok terapi dosis 20 mg/kg BB (D), mulai terlihat ada perbaikan pada gambaran histopatologi aorta abdominal. Hasil pengamatan menunjukkan terjadi penurunan nekrosis sel endotel, sel endotel tampak normal berbentuk pipih

poligonal. Struktur dari lapisan tunika intima mulai teratur, hal ini berhubungan dengan penurunan sel endotel yang mengalami nekrosis. Pada lapisan tunika adventisia terdapat infiltrasi sel-sel radang. Hal tersebut didukung oleh penelitian Sandvik *et al.*, (2006) tentang efek preventif ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) pada kondisi sepsis dengan dosis 20 mg/kg BB mampu menurunkan level sitokin proinflamasi dan mencegah kerusakan jaringan. Hal tersebut mengindikasikan bahwa terapi ekstrak ragi dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari, mulai memberikan hasil terhadap perbaikan jaringan pada aorta abdominal.

Pada kelompok terapi dosis 30 mg/kg BB (E), menunjukkan gambaran histopatologi aorta abdominal yang mendekati gambaran aorta abdominal normal (**Gambar A**). Hasil pengamatan menunjukkan penurunan nekrosis sel endotel, sel endotel terlihat normal (berbentuk pipih poligonal dan nukleus normal), jarang ditemukan sel endotel yang tampak piknotik. Struktur lapisan tunika intima juga tampak mendekati normal. Jarang ditemukan sel-sel radang pada lapisan tunika adventisia, penurunan infiltrasi sel-sel radang pada lapisan tunika adventisia disebabkan oleh penurunan jumlah sitokin proinflamasi dalam sirkulasi (**Gambar E**). Dengan penurunan jumlah sitokin proinflamasi dalam sistem sirkulasi, akan meminimalisir kerusakan pembuluh darah kecil (venule dan arteriol) yang disebabkan oleh inflamasi, sehingga infiltrasi sel radang mengalami penurunan (Guntur, 2008).

Kerusakan jaringan pada kondisi sepsis dapat ditekan dengan pemberian bahan aktif yang memiliki aktivitas antiinflamasi dan antioksidan. Betaglukan yang terdapat dalam ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) memiliki aktivitas biologi,

dapat bertindak sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Menurut Du *et al.*, (2014), betaglukan berpotensi menekan derajat inflamasi pada kondisi sepsis. Betaglukan yang terdapat pada ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dapat berikatan dengan reseptor spesifik *dectin-1* pada makrofag dan memodulasi makrofag untuk meningkatkan sekresi sitokin antiinflamasi, sehingga terjadi penurunan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1, IL-6, dan IL-12. Dengan penurunan level sitokin proinflamasi, maka kerusakan jaringan dapat dicegah.

Andriani (2007) menyebutkan, aktivitas antioksidan betaglukan berasal dari gugus hidroksil yang terdapat di rantai samping betaglukan. Atom hidrogen dari gugus hidroksil tersebut bertindak sebagai elektron donor. Pada kondisi sepsis, makrofag dan neutrofil menghasilkan molekul radikal O_2^- dengan jumlah berlebih dan berpotensi merusak jaringan. Molekul radikal O_2^- yang dihasilkan oleh makrofag dan neutrofil, akan diubah menjadi molekul yang lebih stabil, sehingga kerusakan jaringan akibat radikal O_2^- dapat ditekan.

Gambaran histopatologi paling baik ditunjukkan oleh kelompok terapi dosis 30 mg/kg BB (E), terjadi perbaikan struktur endotel yang diketahui dari penurunan nekrosis sel endotel dan struktur tunika intima yang teratur dan utuh apabila dibandingkan dengan kelompok terapi dosis 10 mg/kg BB (C) dan 20 mg/kg BB (D). Maka dapat dikatakan bahwa betaglukan yang berasal dari ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dapat menurunkan nekrosis sel endotel dan memperbaiki jaringan aorta abdominal pada kondisi sepsis.

Beta 1,3-glukan murni memiliki toksistas yang rendah (Sandvik, 2007). Namun, beberapa penelitian menyebutkan efek samping dari pemberian

betaglukan terutama berhubungan dengan pemberian betaglukan yang tidak murni secara parenteral. Yoshioka *et al.*, (1998) menyebutkan bahwa obat antiinflamasi non steroid (NSAID) yang dikombinasikan dengan betaglukan dengan pemberian parenteral meningkatkan mortalitas pada beberapa strain tikus. Obat antinflamasi non steroid yang dikombinasikan dengan betaglukan dengan dosis 250 ug/hewan coba meningkatkan mortalitas hingga 100%. Hal tersebut didukung oleh penelitian Takahashi *et al.*, (2001) yang menyebutkan bahwa kombinasi NSAID/betaglukan meningkatkan produksi sitokin proinflamasi menyebabkan inflamasi akut, SIRS, dan berakhir dengan kematian. Kerusakan mukosa pencernaan yang disebabkan oleh pemberian NSAID, akan semakin parah jika ditambah dengan administrasi betaglukan, kombinasi keduanya menyebabkan peritonitis dan dapat berakhir dengan kematian.