

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Aktivitas Protease Plasma Darah Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Traumatic Brain Injury

Unit aktivitas protease merupakan banyaknya mikro mol (μmol) tirosin yang dihasilkan ikatan peptoda pada protein oleh protease pada kondisi optimum yaitu pH 6,5 dengan suhu 37°C dan waktu inkubasi 60 menit. Aktivitas protease diukur berdasarkan atas produk tirosin yang dibentuk dari substrat ksein menggunakan isolate *crude* protease plasma darah tikus putih (*Rattus norvegicus*). Hasil dari pengukuran aktivitas protease pada plasma darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada tikus perlakuan ditunjukkan pada Tabel 4.1

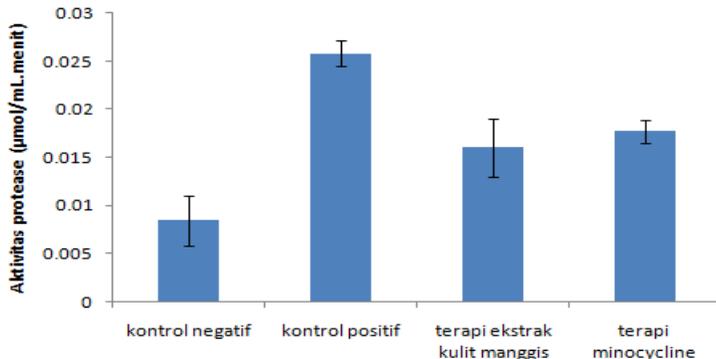
Tabel 4.1 Aktivitas Protease pada Plasma Darah Tikus (*Rattus norvegicus*)

Perlakuan	Rata-rata Aktivitas Protease (Unit) $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{menit}$	Peningkatan Aktivitas Protease (%) Terhadap Kontrol Negatif	Penurunan Aktivitas Protease (%) Terhadap Kontrol Positif
Tikus normal (Kontrol Negatif)	$0,0084 \pm 0,0026^{\text{a}}$	-	-
Tikus model TBI (Kontrol Positif)	$0,0258 \pm 0,0013^{\text{b}}$	206,77	-
Terapi Ekstrak Kulit Manggis	$0,0160 \pm 0,003^{\text{b}}$	-	37,86
Terapi Minocycline	$0,0177 \pm 0,0012^{\text{c}}$	-	31,51

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan ($P < 0,01$)

Aktivitas protease plasma darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) model TBI lebih tinggi dibandingkan sebelumnya. Hal

ini menunjukkan bahwa cedera otak dapat menyebabkan kerusakan pada plasma darah yang ditandai dengan peningkatan aktivitas protease. Aktivitas enzim protease plasma darah tikus pada kelompok model TBI yaitu $0,0258 \pm 0,0013 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$ atau mengalami kenaikan 206,77 % dari aktivitas protease tikus normal yaitu sebesar $(0,0084 \pm 0,0026 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit})$. Hal tersebut menunjukkan bahwa cedera otak dapat meningkatkan aktivitas enzim protease. Terapi ekstrak kulit manggis lebih baik dibandingkan dengan terapi yang sudah ada yaitu minocycline karena dapat menurunkan aktivitas protease sebesar 37,86 % dengan aktivitas protease $0,0160 \pm 0,003 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$. Sedangkan aktivitas protease terapi minocycline yaitu $0,0177 \pm 0,0012 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$ atau mengalami penurunan jika dibandingkan dengan tikus TBI sebesar 31,51 %.



Gambar 4.1 Kurva aktivitas protease plasma darah tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Hasil analisis statistika menggunakan One-Way ANOVA menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak kulit manggis dan minocycline secara signifikan ($P < 0,01$) dapat menurunkan aktivitas protease yang dilanjutkan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) dihasilkan notasi yang berbeda yang menunjukkan adanya perbedaan antar perlakuan (Tabel 4.1 dan Lampiran N).

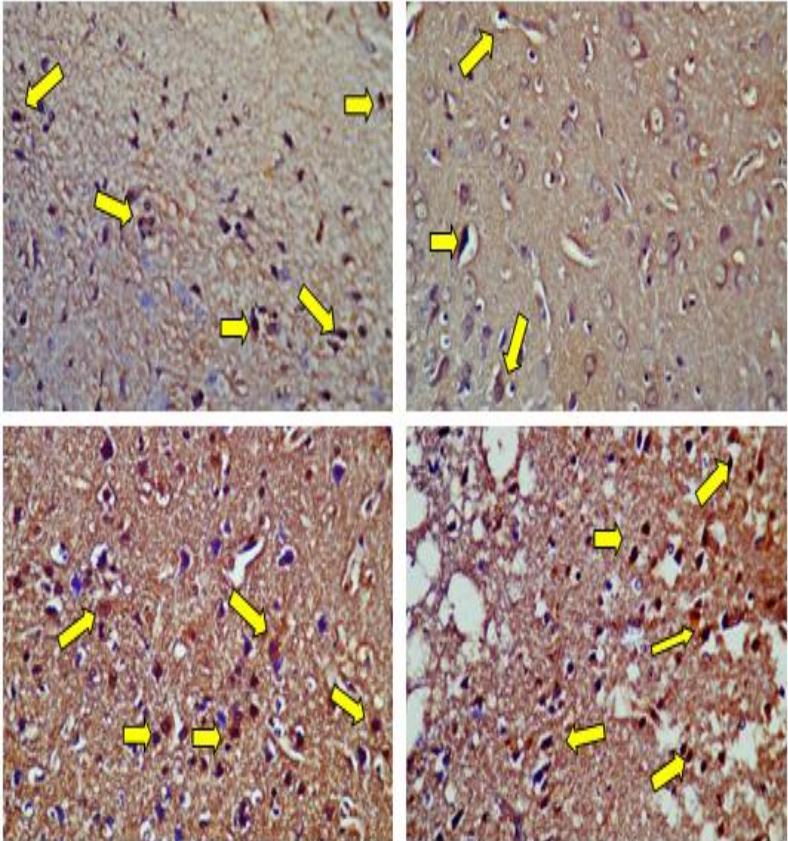
Enzim protease merupakan enzim yang dilepaskan sebagai indikasi bahwa terjadi kerusakan pada jaringan. Enzim protease ini

dilepaskan dari sel endotel yang teraktivasi sebagai inisiasi angiogenesis[16]. Mekanisme pelepasan protease pada jaringan dimulai dengan adanya rangsangan berupa produk bakteri, cedera fisik, maupun toksin yang dapat memicu aktivasi makrofag (proses fagositosis) yang dilakukan sebagian besar oleh ROS. Adanya ROS yang berlebih dapat mengaktivasi NF- κ B pada sel sehingga menyebabkan inflamasi serta meningkatkan aktivasi neutrofil. Sitokin proinflamasi seperti IL-1 dan TNF- α dihasilkan akibat aktivasi makrofag tersebut. TNF- α menimbulkan pelepasan enzim proteolitik sehingga berdampak pada kerusakan jaringan. Adanya aktivasi makrofag memicu sekresinya protease yang berperan dalam degradasi extracellular matrix (ECM) [18].

Penurunan aktivitas protease pada penelitian ini diduga karena kandungan xanthone yang terdapat dalam ekstrak kulit manggis. Efek antioksidan yang terdapat pada kulit manggis berupa xanthone dapat menetralkan radikal bebas yang ada dengan cara mendonorkan elektronnya untuk ion O^{2-} , dan OH^- sehingga terbentuk H_2O_2 dan O_2 yang akan berubah menjadi H_2O , kemudian meningkatkan kadar antioksidan endogen GPx dan CAT yang dapat menetralkan H_2O_2 menjadi H_2O . Jika radikal bebas berkurang, maka tidak akan terjadi stress oksidatif dan aktivitas protease akan menurun karena tidak terjadi kerusakan protein[21].

4.2 Ekspresi IL-10 pada Otak Tikus (*Rattus norvegicus*) model Traumatic Brain Injury

Analisis ekspresi IL-10 pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) hasil pewarnaan imunohistokimia dilakukan dengan menghitung sel berwarna coklat menggunakan immunoratio. Sel yang diamati yaitu inti sel yang terdapat pada bagian korteks otak menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Ekspresi IL-10 pada korteks otak dapat dilihat pada gambar 4.2



Gambar 4.2 Ekspresi IL-10 otak tikus dengan perbesaran 400 x. Tanda panah kuning menunjukkan ekspresi IL-10 didalam sitoplasma dan membrane sel yang ditunjukkan dengan warna coklat. (a) Kontrol negatif (tikus sehat), (b) Kontrol positif (TBI), (c) Kontrol TBI terapi ekstrak kulit manggis, (d) Kontrol TBI terapi minocycline

Ekspresi IL-10 ditandai dengan warna kecoklatan pada inti sel yang muncul sebagai akibat adanya reaksi antigen dan antibodi. Antigen yang terdapat pada jaringan otak akan mengikat antibody primer yang selanjutnya akan berikatan dengan antibody sekunder yang telah dilabel dengan enzim SA-HRP. Enzim tersebut kemudian

akan memecah substrat berupa kromogen DAB menghasilkan produk berupa warna coklat. Hasil gambar yang didapatkan dari mikroskop cahaya kemudian dapat dianalisis secara kuantitatif dengan menggunakan immunnorasio. Data ekspresi IL-10 dengan immunnorasio dapat dilihat pada tabel 4.2.

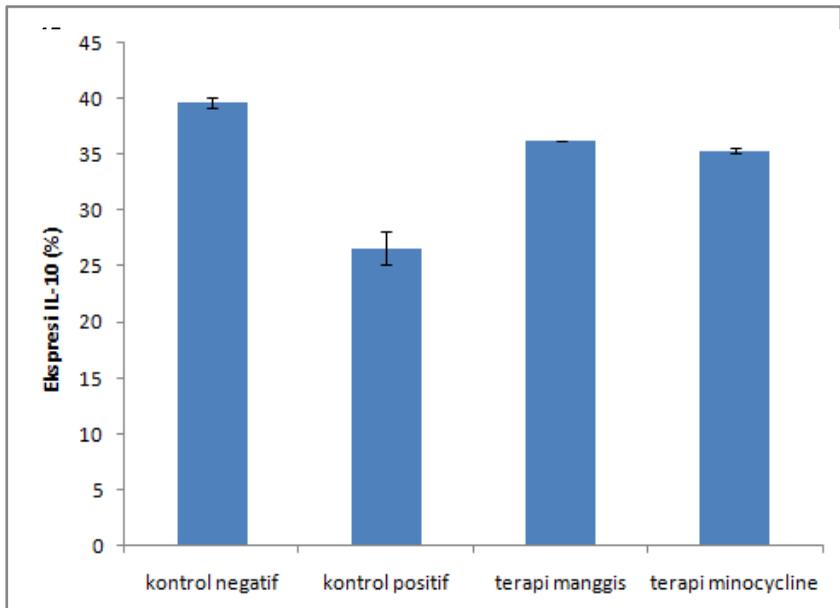
Tabel 4.2 Ekspresi IL-10 pada otak tikus (*Rattus norvegicus*)

Kelompok penelitian	Rata-rata ekspresi IL-10(%)	Peningkatan ekspresi IL-10(%) terhadap kontrol positif	Penurunan ekspresi IL-10(%) terhadap kontrol negative
Kontrol negatif	39,680 ± 0,523 ^a	-	
Kontrol positif	26,668 ± 1,426 ^b	-	35,42
Terapi Ekstrak kulit manggis	36,254 ± 0,009 ^b	35,94	-
Terapi minocycline	35,384 ± 0,284 ^c	32,68	-

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan (P<0,01)

Ekspresi IL-10 otak tikus pada kelompok model TBI yaitu 26,668 ± 1,426 % atau mengalami penurunan 35,42 % dari ekspresi tikus normal yaitu sebesar 39,668 ± 0,523 %. IL-10 ditemukan pada jaringan normal, karena IL-10 tetap diekspresikan untuk menjaga agar kadar sitokin proinflamasi tidak berlebihan, sehingga keberadaan sitokin IL-10 dalam kondisi normal berguna untuk mengimbangi kondisi dari sitokin proinflamasi, oleh karenanya dapat bersifat protektif. Terapi ekstrak kulit manggis memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan terapi monocycline sebagai terapi anti-inflamasi. Ekspresi IL-10 pada terapi ekstrak kulit manggis yaitu 36,254 ± 0,009% atau mengalami peningkatan sebesar 35,94 %. Sedangkan ekspresi IL-10 pada terapi minocycline yaitu 35,384 ± 0,284% atau mengalami peningkatan sebesar 32,68 % dari kontrol tikus TBI. Ekstrak kulit manggia sebagai sumber antioksidan bekerja sebagai gugus perduksi ROS yang disebabkan karena adanya inflamasi, sedangkan minocycline merupakan antibiotic yang bekerja

karena adanya infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Oleh karena itu ekstrak kulit manggis akan bekerja lebih efektif dibandingkan dengan minocycline.



Gambar 4.3 Kurva Ekspresi IL-10 pada Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hasil analisis secara statistika menggunakan One-way ANOVA menunjukkan bahwa terapi ekstrak kulit manggis dan terapi minocycline secara signifikan ($p < 0,01$) mampu menaikkan ekspresi IL-10 tikus putih (*Rattus norvegicus*) model Traumatic Brain Injury sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 4.2, adapun perhitungan statistika secara lengkap dapat dilihat pada lampiran P. Hasil uji menggunakan Turkey atau Beda Nyata Jujur (BNJ) menunjukkan bahwa tikus normal tikus TBI berbeda signifikan sehingga notasinya berbeda. Sedangkan tikus dengan terapi ekstrak kulit manggis dan terapi dengan minocycline juga menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan sehingga notasinya berbeda.

IL-10 merupakan sitokin antiinflamasi yang berperan dalam menekan proses inflamasi dengan cara menurunkan fungsi sel, menurunkan sintesis sitokin proinflamasi dan sebagai penghambat reaksi imunitas tubuh. IL-10 juga menghambat infiltrasi neutrofil dan makrofag ke jaringan yang rusak. IL-10 menghambat ekspresi chemokine dan sitokin proinflamasi (IL-1, IL-1 β , TNF- α). Aktivasi IL-10 adalah hambatan reaksi inflamasi non spesifik maupun spesifik yang diperantarai oleh sel T, karena itu IL-10 juga disebut sitokin antiinflamasi. Adanya rangsangan cedera fisik akan memicu aktivasi makrofag (proses fagositosis). Aktivasi makrofag akan memproduksi sitokin IL-10 dan memiliki fungsi menghalangi aktivasi limfosit T melalui penghambatan ekspresi molekul MHC II [14]. Terapi menggunakan ekstrak kulit manggis dan minocycline akan meningkatkan produksi sitokin antiinflamasi dan menghambat proses produksi sitokin proinflamasi. Senyawa γ -mangosten dari ekstrak kulit manggis telah diketahui memiliki efek antiinflamasi, dengan menghambat enzim siklooksigenase, dan menghambat sitokin proinflamasi dengan membatasi aktivasi NF- κ B yang meningkatkan aktivasi apoptosis sel, sehingga regulasi sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1 dan IL-6 mengalami penurunan. Sitokin IL-10 sebagai sitokin sel makrofag memiliki efek antagonis pada respon sitokin proinflamasi dengan downregulating produksi IL-10 sehingga menurunkan produksi sitokin antiinflamasi [13]. Peningkatan jumlah ekspresi IL-10 setelah diterapi dengan ekstrak manggis mengalami peningkatan sebesar 35,94 %. Sehingga bisa dikatakan bahwa ekstrak kulit manggis dapat digunakan sebagai obat anti-inlamasi.