

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak etanol kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) yang mengandung zat antioksidan dalam mencegah peningkatan jumlah sel radang trakea tikus Wistar pada berbagai lama waktu paparan asap kendaraan bermotor. Variabel dependen dalam penelitian ini adalah jumlah sel radang trakea tikus. Jumlah sel radang tersebut digunakan sebagai parameter untuk mengetahui efek antioksidan yang terkandung dalam ekstrak etanol kacang tunggak terhadap aktivitas radikal bebas dalam asap kendaraan bermotor yang terinhalasi pada berbagai kadar tertentu. Radikal bebas tersebut dapat menyebabkan terjadinya stress oksidatif dalam tubuh yang dapat memicu kerusakan sel sehingga terjadi serangkaian proses inflamasi.

Pada penelitian ini hewan coba tikus kelompok perlakuan diberi paparan asap kendaraan bermotor selama 4 minggu sebagai induksi proses peradangan akibat radikal bebas. Radikal bebas tersebut bersifat sebagai oksidan yang masuk ke dalam tubuh tikus melalui saluran pernapasan, sehingga peneliti mengambil salah satu bagian organ pernapasan, yaitu organ trakea untuk dihitung jumlah sel radang yang ada dilapisan mukosa dan submukosa trakea. Alasan peneliti memilih organ trakea karena trakea merupakan organ yang terpapar lebih dahulu dibandingkan bronkus, bronkiolus dan paru-paru. Apabila terjadi peradangan atau inflamasi yang disebabkan oleh asap kendaraan bermotor, maka trakea akan mengalami efek yang lebih berat dibandingkan organ lain. Selain itu, trakea tidak memiliki sistem perlindungan yang cukup

(*barrier*) karena trakea hanya memiliki mukosa yang tidak dapat menahan efek paparan asap kendaraan bermotor.

Selanjutnya beberapa kelompok dengan lama waktu pengasapan yang berbeda juga diberikan ekstrak etanol kacang tunggak dengan dosis yang sama sebelum pengasapan untuk mengetahui efek ekstrak etanol kacang tunggak dalam mencegah peningkatan jumlah sel radang pada berbagai kadar asap yang berbeda. Dosis ekstrak etanol kacang tunggak yang digunakan berdasarkan pada kandungan genistein dalam ekstrak etanol kacang tunggak sebagai antioksidan kuat. Pada penelitian sebelumnya oleh Christina (2010) dan Kintono (2010) yang juga meneliti efek ekstrak etanol kacang tunggak dalam meningkatkan kadar SOD dan menurunkan MDA serum tikus yang diovarektomi, dosis efektif yang diteliti adalah 0,5 mg/kgBB. Oleh karena itu, pemberian ekstrak etanol kacang tunggak pada penelitian ini dihitung berdasarkan dosis efektif penelitian sebelumnya dan kandungan genistein dalam ekstrak yang sekarang digunakan, yaitu 140,7 ppm (140,7 mg/1000ml).

6.1 Pengaruh Paparan Asap Kendaraan Bermotor Terhadap Jumlah Sel Radang Trakea Tikus Wistar

Pada preparat histologi trakea tikus dengan pengecatan HE dan perbesaran 400x didapatkan perhitungan rata-rata jumlah sel radang trakea tikus kelompok normal (-) yang tidak diberi perlakuan apapun (kontrol negatif) sebesar $113,48 \pm 41,78$. Jumlah tersebut lebih sedikit dibandingkan jumlah sel radang pada kelompok yang lain, terutama kelompok pengasapan. Pada penelitian ini terdapat 3 kelompok tikus yang diberikan pengasapan saja, yaitu kelompok $A_2O_4(-)G$, $A_3O_4(-)G$ dan $A_4O_4(-)G$. kelompok tikus tersebut hanya diberikan

paparan asap kendaraan bermotor dengan kadar asap yang berbeda-beda. kelompok tikus $A_2O_4(-)G$ diberikan paparan asap dengan kadar pengasapan yang dikeluarkan dari mesin selama waktu 2 menit, tanpa diberikan ekstrak etanol kacang tunggak. Kelompok tikus $A_3O_4(-)G$ diberikan paparan asap dengan kadar pengasapan yang dikeluarkan dari mesin selama waktu 3 menit, dan kelompok tikus $A_4O_4(-)G$ diberikan paparan asap dengan kadar pengasapan yang dikeluarkan dari mesin selama waktu 4 menit, semuanya tanpa diberikan ekstrak etanol kacang tunggak. Pada hasil penelitian yang telah dipaparkan dalam bab 5, diperoleh hasil penghitungan rata-rata jumlah sel radang trakea tikus kelompok $A_2O_4(-)G$ sebesar $239,93 \pm 82,14$; kelompok $A_3O_4(-)G$ sebesar $308,90 \pm 131,41$; dan kelompok $A_4O_4(-)G$ sebesar $395,57 \pm 175,70$. Pada uji *Mann Whitney* juga disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok normal (-) dengan ketiga kelompok yang hanya dipapar asap kendaraan bermotor.

Sebelumnya pada kelompok tanpa perlakuan pun sudah didapatkan sel radang meski dalam jumlah sedikit. Adanya sel radang pada trakea dalam kondisi normal tersebut merupakan proses fisiologis yang dilakukan tubuh sebagai mekanisme proteksi dan menjaga homeostatis. Proses peradangan yang terjadi merupakan mekanisme perlindungan tubuh dimana tubuh berusaha untuk menetralkan atau menghilangkan agen berbahaya, termasuk radikal bebas (Bashori, 2008). Sebenarnya radikal bebas sudah ada yang terbentuk dalam tubuh yang disebut *endogenous free radical*. Radikal bebas endogen ini dihasilkan oleh setiap proses sel normal yang menggunakan oksigen, seperti autooksidasi, oksidasi enzimatis, maupun *respiratory burst* (Arif, 2007). Namun

tubuh memiliki antioksidan alami sebagai inhibitor yang dapat bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas yang relatif stabil (Sofia, 2006).

Pada ketiga kelompok yang diberikan pengasapan saja terlihat rata-rata jumlah sel radang lebih banyak dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan. Adanya peningkatan jumlah sel radang yang signifikan tersebut menunjukkan paparan asap kendaraan bermotor dapat menimbulkan reaksi radikal bebas yang signifikan sehingga memicu proses peradangan. Meskipun kandungan asap dalam penelitian ini masih belum diverifikasi, tetapi hasil pembakaran dari mesin tersebut mengandung bahan pencemar sesuai dengan pernyataan Yulaekah (2007) bahwa jenis pencemar udara primer umumnya berupa gas, meliputi CO, NO_x, HC, SO_x dan bahkan partikulat yang mana sumber utamanya dihasilkan dari pembakaran pada kendaraan bermotor. Paparan akut maupun kronis dari polusi udara ini berpengaruh pada sistem respirasi yang dikaitkan dengan perubahan struktur dan fungsi saluran pernafasan (WHO, 2004).

Pada intinya bahan-bahan polutan tersebut bersifat oksidan sehingga bila sering terinhalasi menyebabkan kondisi stress oksidatif didalam tubuh. Hal ini berarti bahwa antioksidan alami tubuh tidak mampu mengatasi akumulasi radikal bebas yang berlebihan tersebut (Sofia, 2006). Stress oksidatif akan memodulasi ekspresi gen mediator inflamasi melalui aktivasi jalur transkripsi *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) yang menginduksi produksi dan sekresi molekul adhesi serta kemokin dari sel endotel. Hal tersebut mengaktifasi makrofag untuk mensekresi sitokin-sitokin proinflamasi seperti interleukin-1 (IL-1), IL-6 dan *tumor necrosis factor- α* (TNF- α). Selain didalam jaringan, terjadi peningkatan jumlah dan aktivasi sel-sel proinflamasi seperti neutrofil, limfosit serta peningkatan *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan *soluble TNF-receptor* dalam darah. (Masna *et al.*, 2011 ;

Pardede, 2008). Jumlah radikal bebas yang melebihi antioksidan endogen akan membuat radikal bebas mudah bereaksi dengan lemak, protein, dan asam nukleat seluler. Membran sel mengandung sumber *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) yang mudah dirusak oleh bahan-bahan pengoksidasi sehingga mengalami proses pengoksidasian lemak. Komponen lemak yang mengalami peroksidasi akan menarik atom H dari rantai samping PUFA. Proses ini menghasilkan radikal peroksil yang akan menyerang ulang rantai samping PUFA dan menghasilkan radikal karbon baru (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Radikal bebas yang terakumulasi dan ikatan protein dengan ion logam transisi pada fokus daerah tertentu dapat menyebabkan serangan radikal bebas terhadap protein. Begitu pula terhadap asam nukleat, radikal oksigen dapat menyerang DNA jika radikal tersebut terbentur disekitar DNA (Arief, 2007). Dengan demikian banyaknya radikal bebas dari asap kendaraan bermotor yang terinhalasi dalam tubuh dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan lokal dan disfungsi organ, khususnya di saluran trakea. Hal tersebut membuat tubuh mengeluarkan sel-sel radang sebagai mekanisme pertahanan pada daerah yang mengalami kerusakan. Keadaan inilah yang mengakibatkan terjadinya peradangan pada trakea yang terpapar asap.

Oksigen merupakan faktor penting sebagai sumber energi tubuh, namun oksigen juga dapat memiliki sifat radikal bebas yang merusak tubuh. Dwipayana *et al.*, (2010) dalam penelitiannya mengatakan bahwa pemberian oksigen murni dapat meningkatkan kadar oksigen terlarut dalam plasma dan tekanan parsial oksigen pada jaringan sehingga dapat mengatasi efek hipoksia pada daerah luka dan memperbaiki kualitas jaringan baru. Namun pemberian oksigen secara terus menerus dapat meningkatkan kadar senyawa radikal bebas yang justru akan

merusak jaringan dan menyebabkan nekrosis jaringan. Dalam penelitian ini, oksigen yang diberikan ditujukan untuk mengatasi keadaan hipoksia pada tikus yang diberikan pengasapan. Untuk melihat adakah pengaruh langsung terhadap peningkatan jumlah sel radang trakea tikus, maka dilakukan pemaparan dengan oksigen murni saja pada kelompok yang hanya diberi paparan oksigen selama 4 menit. Pada kelompok ini terlihat bahwa, jumlah sel radang trakea lebih tinggi dibandingkan kelompok normal (-). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian oksigen murni 10mmHg belum mencapai batas minimum untuk menjadi bersifat radikal bebas. Pada penelitian lain disebutkan bahwa oksigen dapat meracuni tubuh apabila tekanan oksigen mencapai 1 bar atau setara dengan 750 mmHg (Kusno, 2011).

6.2 Pengaruh Lama Paparan Asap Kendaraan Bermotor Terhadap Jumlah Sel Radang Trakea Tikus Wistar

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah sel radang trakea tikus wistar, diketahui terdapat peningkatan jumlah sel radang trakea dimana semakin lama waktu paparan asap kendaraan bermotor maka semakin tinggi rata-rata jumlah sel radang trakea. Kelompok paparan asap kendaraan bermotor selama 2 menit memiliki jumlah rata-rata sel radang trakea sebesar $239,93 \pm 82,14$. Kelompok paparan asap kendaraan bermotor selama 3 menit memiliki jumlah rata-rata sel radang trakea $308,90 \pm 131,41$. Kelompok paparan asap kendaraan bermotor selama 4 menit memiliki jumlah rata-rata sel radang trakea $395,57 \pm 175,70$. Sedangkan untuk kelompok perlakuan yang diberi ekstrak etanol kacang tunggak, paparan 2 menit memiliki rata-rata sel radang trakea $148,68 \pm 34,39$, paparan 3 menit memiliki rata-rata sel radang trakea $156,46 \pm 28,04$ dan paparan 4 menit memiliki rata-rata sel radang trakea $160,38 \pm 41,75$.

Uji korelasi non-parametrik Spearman dilakukan untuk melihat korelasi antara lama paparan asap kendaraan bermotor dengan jumlah sel radang trakea tikus wistar. Hasil uji menunjukkan nilai signifikansi (*p-value*) 0,000, sehingga terdapat korelasi yang signifikan antara lama paparan asap kendaraan bermotor dengan jumlah sel radang trakea tikus ($p < 0,05$). Selain menghasilkan nilai signifikansi korelasi antara kedua variabel, uji korelasi non-parametrik Spearman juga menunjukkan *Spearman correlation coefficient* (*r*) yang menunjukkan kekuatan korelasi antara dua variabel. Pada penelitian ini didapatkan hasil uji $r = 0,409$, hal tersebut menunjukkan terdapat korelasi yang sedang antara lama paparan asap kendaraan bermotor dengan jumlah sel radang trakea tikus ($r = > 0,25-0,5$). Arah korelasi positif menunjukkan korelasi antara kedua variabel adalah berbanding lurus, dimana semakin lama paparan asap kendaraan bermotor, maka terjadi peningkatan jumlah sel radang trakea tikus. Pada hasil penelitian ini didapatkan perbedaan yg signifikan antara lama paparan asap kendaraan bermotor dengan jumlah sel radang trakea tikus, namun setelah di lakukan uji korelasi didapatkan hasil uji $r = 0,409$ yang berarti terdapat korelasi yang lemah antara lama paparan asap kendaraan bermotor dengan jumlah sel radang trakea tikus. Hal tersebut dapat dikarenakan beberapa faktor, seperti perbedaan waktu paparan yang terlalu singkat antar kelompok yaitu 1 menit, perbedaan lama mesin dalam mengeluarkan asap tidak terlalu jauh antarkelompok.

Zaini (2008) menyebutkan bahwa efek yang ditimbulkan oleh polutan udara terhadap jaringan tubuh tergantung pada lama waktu pemaparan, konsentrasinya di udara, ukuran polutan terkait lokasi depositnya, serta kondisi sistem imun individu yang bersangkutan. Bila kadar asap yang terinhalasi semakin banyak, makin banyak pula radikal bebas yang terkumpul dan dapat

menyebabkan kerusakan jaringan yang lebih parah, sehingga nantinya pengeluaran sel radang ke tempat cedera juga lebih banyak. Hal ini membuktikan bahwa tikus yang terpapar asap kendaraan bermotor lebih lama dapat mengalami peningkatan jumlah sel radang trakea secara signifikan.

6.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak etanol kacang tunggak Terhadap Jumlah sel radang Trakea Tikus Wistar

Pada penelitian ini terdapat 3 kelompok perlakuan yang diberi pengasapan dan ekstrak etanol kacang tunggak, yaitu kelompok $A_2O_4(+)$ G, $A_3O_4(+)$ G, dan $A_4O_4(+)$ G dimana ketiga kelompok tersebut diberikan kadar asap yang berbeda-beda. Semua kelompok tersebut dipapar asap disertai oksigen selama 4 menit serta diberikan ekstrak etanol kacang tunggak 30 menit sebelum pengasapan. Kelompok $A_2O_4(+)$ G diberikan kadar asap yang dikeluarkan oleh mesin selama waktu 2 menit dan dipaparkan selama 4 menit, kelompok $A_3O_4(+)$ G diberikan kadar asap dari mesin selama waktu 3 menit dan dipaparkan selama 4 menit, sedangkan kelompok $A_4O_4(+)$ G kadar asap yang dikeluarkan dari mesin selama waktu 4 menit dan dipaparkan dalam 4 menit juga.

Pada gambar 5.5 tampak sel radang trakea tikus kelompok $A_2O_4(+)$ G yang lebih jarang dibandingkan kelompok $A_2O_4(-)$ G yang hanya diasapi dengan kadar asap yang sama tanpa diberikan ekstrak etanol kacang tunggak. Dari hasil penghitungan diperoleh rata-rata jumlah sel radang kelompok $A_2O_4(+)$ G sebesar $148,68 \pm 34,39$. Jumlah tersebut bila dibandingkan dengan kelompok $A_2O_4(-)$ G yaitu $239,93 \pm 82,14$ lebih sedikit dan memiliki perbedaan yang signifikan karena nilai signifikansi dari uji *Mann Whitney* sebesar 0,000 ($p < 0,05$). Akan tetapi bila dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan jumlah sel radang kelompok

$A_2O_4(+)$ G masih lebih tinggi dan perbedaannya pun signifikan karena nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$). Sedangkan gambar 5.7 merupakan gambaran histologi kelompok $A_3O_4(+)$ G diperoleh rata-rata jumlah sel radang sebesar 156.46 ± 28.04 dan terlihat sel radang yang lebih berkurang dibandingkan kelompok kontrolnya $A_3O_4(-)$ G yaitu 308.90 ± 131.41 . Kelompok $A_3O_4(+)$ G mempunyai nilai signifikansinya terhadap kelompok $A_3O_4(-)$ G sebesar $0,000$ ($p < 0,05$) yang berarti berbeda secara signifikan. Pada gambar 5.9 tampak sel radang kelompok $A_4O_4(+)$ G yang sangat banyak dibandingkan kelompok yang lainnya. Dari hasil penghitungan diperoleh rata-rata jumlah sel radang kelompok $A_4O_4(+)$ G sebesar $160,38 \pm 41,75$. Jumlah tersebut berbeda signifikan dengan kelompok kontrolnya $A_4O_4(-)$ G dengan nilai signifikansi $0,000$ ($p < 0,05$).

Dari hasil tersebut dapat dikatakan bahwa kelompok perlakuan yang diberi ekstrak etanol kacang tunggak dan diasapi menunjukkan jumlah sel radang yang lebih rendah secara signifikan dengan kelompok kontrolnya masing-masing yang hanya dipapar asap kendaraan bermotor. Disamping itu, ketiga kelompok perlakuan tersebut lebih tinggi secara signifikan dengan kelompok normal(-) karena nilai signifikansinya $p < 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan ekstrak etanol kacang tunggak dengan dosis $0,5$ mg/kgBB secara signifikan dapat mencegah peningkatan jumlah sel radang trakea tikus yang dipapar asap kendaraan bermotor hingga kondisinya mendekati dengan yang normal.

Ekstrak etanol kacang tunggak mengandung berbagai zat antioksidan dan antiinflamasi, diantaranya adalah genistein sebagai antioksidan yang kuat dan juga mempunyai efek antiinflamasi. Genistein merupakan salah satu dari berbagai macam flavonoid alam. Menurut Winarsi (2007) genistein dapat meningkatkan enzim *superoxide dismutase* (SOD) yang merupakan enzim

antioksidan alami dalam tubuh. Genistein bekerja melalui dua jalur, yaitu jalur estrogenik dan jalur non-estrogenik, dimana efek antioksidan genistein ditimbulkan melalui mekanisme kerja jalur estrogenik (Challem, 2005). Pada jalur ekstrogenik genistein mempunyai kemampuan mengikat reseptor estrogen ER β dengan afinitas lebih tinggi dibanding reseptor estrogen ER α (Gilman *et al.*, 2007). Dengan pengikatan reseptor estrogen tersebut terjadi aktivasi *extracellular-signal regulated kinase* (ERK1/2) yang diikuti translokasi NF- κ B ke nukleus. Translokasi tersebut mengakibatkan peningkatan ekspresi MnSOD yang bersifat sebagai antioksidan (Borras *et al.*, 2006). Dengan demikian antioksidan alami tubuh menjadi lebih tinggi dan mampu mengimbangi peningkatan kadar radikal bebas sehingga stres oksidatif dalam tubuh juga berkurang.

Selain itu, genistein pada ekstrak etanol kacang tunggak juga bisa menghambat reaksi radikal bebas secara langsung dengan menghambat peroksidasi lemak akibat reaksi radikal bebas dan menghambat produksi hidrogen peroksida (H₂O₂) (Wei *et al.*, 2002). Hal ini mungkin dikarenakan adanya gugus hidroksil pada genistein yang dapat menangkap dan mengubah ion superoksida. Dengan demikian senyawa radikal bisa menjadi inaktif dan efek reaktivitas radikal bebas dapat dihambat (Winarsi, 2007). Dengan adanya efek antioksidan tersebut, pada akhirnya kerusakan sel akibat serangan radikal bebas, seperti peroksidasi lemak, kerusakan protein dan DNA bisa berkurang. Reaksi inflamasi yang mungkin timbul juga dapat dihambat sehingga jumlah sel radang pun akan menurun.

Disamping sebagai antioksidan, genistein juga diteliti mengandung efek antiinflamasi. Genistein dari ekstrak etanol kacang tunggak dapat menghambat

nitrat oksida (NO) sebagai marker inflamasi melalui penghambatan salah satu enzim yang memproduksinya yaitu iNOS (*inducible nitric oxide synthase*). iNOS dapat diinduksi oleh sitokin-sitokin inflamasi dari makrofag dan memproduksi banyak NO yang bersifat proinflamasi (Hamalainen *et al.*, 2007). Oleh karena itu, dengan penghambatan iNOS maka inflamasi yang akan timbul dapat dihambat. .

Pada penelitian lain, di jelaskan bahwa genistein memiliki efek menghambat proses peradangan melalui mekanisme *downregulation* dari sinyal transduksi sitokin pada sistem imun jaringan. Selain itu, genistein juga menghambat pelepasan sel-sel proinflamasi seperti *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan interleukin-6 (IL-6) (Jeong Sung *et al.*, 2008). Dengan demikian pada penelitian ini, pemberian ekstrak etanol kacang tunggak dapat menurunkan jumlah sel radang trakea tikus Galur Wistar yang mendapat paparan asap kendaraan bermotor.

