

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak kulit manggis dalam menghambat penurunan fungsi migrasi dari HUVECs akibat paparan LPS. Pada penelitian ini, digunakan kultur HUVECs sebagai representasi dari keadaan endotel pembuluh darah pada manusia.

6.1 Pengaruh paparan LPS terhadap fungsi migrasi HUVECs

Pada kondisi fisiologis (pada penelitian ini direpresentasikan dengan kontrol negatif) didapatkan adanya migrasi HUVECs pada jam ke-6 dan ke-24. Hasil analisis statistik dengan uji Paired Sample T Test diperoleh perbedaan antara migrasi HUVECs 6 jam dengan 24 jam setelah perlakuan dengan nilai signifikansi sebesar 0,001 ($<0,05$). Sehingga dapat disimpulkan terdapat peningkatan migrasi HUVECs seiring berjalannya waktu dari 6 jam ke 24 jam. Hal ini dapat terjadi karena terdapat ekspresi NO yang dihasilkan dari sel-sel endotel vaskuler melalui enzim eNOS. NO diketahui dapat mempengaruhi fungsi migrasi sel endotel yang penting dalam angiogenesis, yaitu melalui jalur signaling VEGF/ VEGFR2 (Nugrahenny et al., 2012; Lamalice et al., 2007). Pada sel endotel normal, regenerasi sel endotel yang mengalami perlukaan diantaranya terjadi dengan migrasi dan proliferasi pada sel-sel endotel (Lamalice et al., 2007; Aalst et al., 2004). VEGF ini melalui VEGFR2 mengatur migrasi sel endotel melalui induksi aktivasi SAPK2/p38, fosforilasi FAK, dan meningkatkan aktivitas migrasi. Aktivasi SAPK2/p38 memicu polimerisasi aktin, sedangkan FAK memulai perakitan Focal Adhesion. Kedua proses ini berperan dalam pembentukan stress fiber yang penting untuk proses migrasi sel endotel. Polimerisasi aktin dan perakitan Focal Adhesion ini akan mengakibatkan

reorganisasi sitoskeleton yang juga dibutuhkan untuk migrasi sel (Rousseau et al., 2000).

Untuk melihat perbedaan proses peningkatan migrasi HUVEC antara migrasi dari 0 jam ke 6 jam dengan dari 6 jam ke 24 jam maka dilakukan uji Paired Sample T Test dengan hasil tidak terdapat perbedaan antara proses peningkatan besar zona bebas sel pada jam 0-6 jam dengan jam 6-24 jam, dimana rata-rata proses peningkatan besar zona bebas sel pada jam 0-6 lebih tinggi daripada pada jam 6-24. Besar migrasi HUVEC pada jam 0-6 lebih besar dibanding 6-24 menimbulkan asumsi bahwa sel-sel yang terdapat di kultur HUVEC sudah *overconfluence* sehingga pertumbuhan dan aktivitas sel menjadi terhambat. Menurut Ozturk dan Hu (2014), pada kultur sel yang sudah berkembang aktif, sel akan terus tumbuh dan membelah sehingga pada akhirnya nutrisi akan habis dan menumpuknya sisa metabolisme yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan.

Dengan adanya pemaparan terhadap LPS (pada penelitian ini dipresentasikan dengan kontrol positif), dari hasil analisis statistik didapatkan bahwa migrasi HUVECs setelah 6 jam dan 24 jam perlakuan terdapat perbedaan yang bermakna ($p \leq 0,05$) antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif. Dapat dikatakan bahwa pemaparan LPS dosis 20 ng/ml selama 6 jam dan 24 jam mampu menurunkan migrasi HUVECs secara bermakna ($p < 0,05$) dibandingkan kontrol negatif. Hal ini sejalan dengan penelitian Faure *et al.* (2000) dan Nugrahenny *et al.* (2012) di mana terjadi penurunan migrasi HUVECs akibat adanya stres oksidatif. Hal ini dapat terjadi karena paparan LPS merupakan salah satu pemacu stres oksidatif yang bersifat destruktif terhadap berbagai macam mekanisme fisiologis tubuh. Adanya LPS dalam sirkulasi akan mengaktifkan jalur *signaling* sel endotel yang akhirnya akan mengaktifkan NF- κ B. Aktivasi NF- κ B yang diinduksi LPS akan memediasi sel endotel meningkatkan produksi IL-6, IL-8, IL-1 β , ekspresi E-selektin, ICAM-1, dan VCAM-1. Aktifnya

sitokin-sitokin proinflamasi tersebut akan menciptakan keadaan stres oksidatif melalui peningkatan produksi ROS (Bannerman dan Goldblum, 2003; Corda *et al.*, 2001). *Reactive Oxygen Species* ini dapat berikatan dengan eNOS dan NO dalam sistem vaskuler tubuh. Reaksi ROS dengan eNOS akan mengakibatkan terjadinya eNOS *uncoupled*, yang berakibat eNOS akan lebih memproduksi ROS lebih banyak ketimbang NO, sehingga secara tidak langsung produksi NO akan menurun (Montezano dan Touyz, 2011). *Reactive Oxygen Species* yang bereaksi dengan NO, mengakibatkan juga turunnya NO dalam tubuh. Penurunan kadar NO akan mengakibatkan terganggunya regulasi sel endotel untuk melakukan migrasi. ROS juga dapat menghambat migrasi sel endotel secara langsung melalui kerusakan sitoskeleton dan gangguan polimerisasi aktin dari sel endotel. Penghambatan pada migrasi sel endotel mengakibatkan disfungsi endotel sehingga terjadi penyakit degeneratif vaskuler (Nugrahenny *et al.*, 2012; Aalst *et al.*, 2004).

6.2 Pengaruh ekstrak kulit manggis terhadap fungsi migrasi HUVECs yang dipapar LPS

Dari hasil analisis statistik didapatkan bahwa migrasi HUVECs setelah 6 jam perlakuan dengan uji Kruskal-Wallis diperoleh nilai $p=0,037$ ($p<0,05$) dengan hasil uji Mann-Whitney terdapat perbedaan signifikan ($p\leq 0,05$) antara kelompok kontrol positif dengan kelompok pemberian ekstrak kulit manggis 1 $\mu\text{g/ml}$. Namun tidak demikian dengan kelompok pemberian ekstrak kulit manggis 2 $\mu\text{g/ml}$ dan 4 $\mu\text{g/ml}$ dimana didapatkan hasil yang kurang signifikan. Sedangkan hasil analisis statistik migrasi HUVECs setelah 24 jam perlakuan menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan ($p>0,05$) antara kelompok kontrol positif dengan kelompok pemberian ekstrak kulit manggis 1, 2 maupun 4 $\mu\text{g/ml}$. dengan demikian, dapat disimpulkan pemberian ekstrak kulit manggis dapat

menghambat penurunan fungsi migrasi dari HUVECs yang dipapar LPS, dengan efek paling baik pada konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$.

Kemampuan menghambat penurunan fungsi migrasi HUVECs ini diduga disebabkan oleh kemampuan antioksidan ekstrak kulit manggis yang mampu melindungi sel endotel dari serangan stres oksidatif karena terpapar LPS. Hal ini sesuai dengan penelitian dari Nakatani *et al.* (2004) dan Sargowo *et al.* (2010) dimana ekstrak kulit manggis memiliki kemampuan menurunkan sitokin-sitokin proinflamasi di mana sitokin proinflamasi ini yang pada akhirnya akan meningkatkan produksi ROS. Seiring dengan hasil tersebut, penelitian dari Weecharangsan *et al.* (2006) dan Jung *et al.* (2006) mengatakan bahwa ekstrak kulit manggis memiliki efek antioksidan yang kuat. Kulit manggis memiliki kandungan senyawa yang bernama xanton yang telah diteliti memiliki kemampuan antioksidan kuat. Adanya aktivitas *scavenging* dari xanton dalam ekstrak kulit manggis terhadap radikal hidroksil dapat mengurangi ROS yang beredar. Kemampuan ekstrak kulit manggis dalam menekan ROS diduga mampu mencegah penurunan fungsi migrasi sel endotel akibat paparan LPS.

Dari hasil analisis statistik didapatkan hubungan antara dosis ekstrak kulit manggis dan besar migrasi HUVECs sebesar -0,356 setelah 6 jam perlakuan dan -0,325 setelah 24 jam perlakuan. Tanda negatif menunjukkan semakin tinggi dosis ekstrak kulit manggis yang diberikan maka besar migrasi HUVECs akan semakin menurun. Pada kelompok dengan paparan 1 $\mu\text{g/ml}$ ekstrak kulit manggis didapatkan besar migrasi HUVECs yang paling mendekati normal fisiologis seperti pada kontrol negatif. Namun pada konsentrasi 2 $\mu\text{g/ml}$ didapatkan kecenderungan fungsi migrasi HUVECs yang sedikit menurun, bahkan pada konsentrasi 4 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan penurunan jauh bahkan lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol positif. Kecenderungan penurunan fungsi migrasi HUVECs pada kelompok yang dipapar LPS dan diberi ekstrak kulit manggis dosis 2 dan 4 $\mu\text{g/ml}$ dibandingkan dengan dosis optimal (1 $\mu\text{g/ml}$)

menimbulkan dugaan bahwa peningkatan dosis ekstrak kulit manggis lebih lanjut mengakibatkan penurunan aktivitas antioksidan dikarenakan ekstrak kulit manggis mulai menimbulkan efek prooksidan terhadap HUVECs bahkan efek prooksidan yang melebihi efek antioksidan. Efek ini mengakibatkan dampak negatif terhadap fungsi migrasi HUVECs. Bila rentang dosis diperlebar lebih dari 4 µg/ml, ada kemungkinan yang terjadi adalah semakin turunnya fungsi migrasi pada HUVECs yang dipapar LPS.

Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Cillard *et al.* (1980, 1979). Berdasarkan penelitian tersebut, seharusnya antioksidan pada dosis yang sesuai memiliki peran sebagai *free radical scavenger*. Aktivitas antioksidan ini dapat berubah menjadi prooksidan dan bekerja sebagai *free radical chain breaker* apabila konsentrasi antioksidan ini ditingkatkan. Peningkatan konsentrasi antioksidan ini akan mengakibatkan terjadinya autooksidasi senyawa ROOH di sekitarnya yang bereaksi dengan antioksidan yang bersifat tidak stabil, sehingga akan terbentuk radikal lipida (ROO•). Dugaan-dugaan ini masih perlu dibuktikan pada penelitian selanjutnya.

Penelitian ini sendiri hanya menggunakan tiga varian dosis, sehingga belum diketahui secara pasti dosis toksik dari ekstrak kulit manggis terhadap HUVECs. Selain itu, pengamatan migrasi HUVECs yang dilakukan hanya sampai 24 jam, masih belum diketahui bagaimana keadaan fungsi migrasi HUVECs yang dipapar LPS dengan ekstrak kulit manggis bila rentang waktu dipanjangkan lebih lanjut.