

TERAPI EKSTRAK DAUN PUTRI MALU (*Mimosa pudica*) PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI EPITEL BRONKIOLUS

SKRIPSI

Oleh :

RIZY AHMADA

105130101111075



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

**TERAPI EKSTRAK DAUN PUTRI MALU (*Mimosa pudica*) PADA TIKUS
(*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA TERHADAP KADAR
MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN GAMBARAN
HISTOPATOLOGI EPITEL BRONKIOLUS**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

RIZY AHMADA

105130101111075



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2014

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**TERAPI EKSTRAK DAUN PUTRI MALU (*Mimosa pudica*) PADA TIKUS
(*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA TERHADAP KADAR
MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN GAMBARAN
HISTOPATOLOGI EPITEL BRONKIOLUS**

Oleh:

**RIZY AHMADA
105130101111075**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji

pada tanggal 05 Juni 2014

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DES

NIP. 19600903 198802 2 001

drh. Analis Wisnu Wardhana, M.Biomed

NIP. 19800904 200812 1 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran Hewan
Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DES

NIP. 19600903 198802 2 001



LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rizy Ahmada

NIM : 105130101111075

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Terapi Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa Pudica*) pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model Asma Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) Dan Gambaran Histopatologi Epitel Bronkiolus

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 akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 05 Juni 2014
Yang menyatakan

(Rizy Ahmada)

NIM.105130101111075

**TERAPI EKSTRAK DAUN PUTRI MALU (*Mimosa pudica*) PADA TIKUS
(*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA TERHADAP KADAR
MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN GAMBARAN
HISTOPATOLOGI EPITEL BRONKIOLUS**

ABSTRAK

Asma merupakan penyakit kronik pada saluran pernafasan yang banyak dijumpai pada hewan dan manusia. Gejala asma yang mucul dapat diperparah oleh infeksi rongga mulut akibat paparan Lipopolisakarida (LPS) dari bakteri Gram negatif. Ekstrak daun Putri malu (*Mimosa pudica*) digunakan sebagai terapi pada hewan model tikus asma. Tujuan penelitian ini untuk mempelajari potensi terapi ekstrak daun Putri malu (*Mimosa pudica*) terhadap kadar Malondialdehida (MDA) dan perubahan gambaran sel epitel bronkiolus organ paru pada hewan tikus model asma. Tikus model asma disiapkan dengan pemberian sensitasi alergi dengan Ovalbumin (OVA) secara intraperitoneal dan inhalasi serta pemberian LPS dari bakteri *Phorphyromonas gingivalis* secara intrasulkuler. Penelitian ini menggunakan empat kelompok tikus, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok asma, kelompok terapi daun putri malu dosis 500 mg/Kg BB dan dosis 1000 mg/Kg BB. Kadar MDA diukur menggunakan metode *Thiobarbaturic Acid* (TBA) dan pengamatan histopatologi epitel bronkiolus menggunakan mikroskop Olympus BX51. Hasil penelitian menunjukkan pemberian terapi daun Putri malu dengan dosis 500 mg/Kg BB dan 1000 mg/Kg BB secara signifikan ($p<0,05$) mampu menurunkan kadar MDA dan memperbaiki epitel bronkiolus pada tikus model asma. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak daun Putri malu dapat digunakan sebagai terapi herbal pada tikus model asma.

Kata Kunci: Putri malu, Asma, MDA dan Epitel Bronkiolus



**THE LEVEL OF MDA AND BRONCHIOLES EPITHELIAL
HISTOPATHOLOGY ON ASTHMA RATS (*Rattus norvegicus*)
AFTER THERAPY USING *Mimosa pudica*
LEAF EXTRACT**

ABSTRACT

Asthma is a chronic respiratory disease that often found in animals and humans. Asthma symptoms become more severe by oral infections due to exposure of Gram-negative bacterial lipopolysaccharide (LPS). The *Mimosa pudica* leaf extract were used as an therapy agent on asthma rats. The purpose of this research was to study the potential of *Mimosa pudica* leaf extract that could affect to Malondialdehyde (MDA) levels and bronchial epithelial histopathology appearance on asthma rats. Asthma rats were prepare by sensitization of allergent conducted by intraperitoneal injection and nebulized of Ovalbumin (Ova) also intrasulcular injection of Lipopolysaccharide from *Phorphyromonas gingivalis* bacteria. Four groups of rats (*Rattus norvegicus*) were used in this research were control group, asthma group, and two groups with therapy of *Mimosa pudica* extract dose of 500 mg/Kg BW and 1000 mg/Kg BW. Malondialdehyde levels were determined using Thiobarbaturic Acid (TBA) assay and histophatological observations of the bronchial epithelial using Olympus BX51 microscope. The result showed that *Mimosa pudica* leaf extract therapy with both dose of 500 mg/Kg BW and 1000 mg/Kg BW significantly ($P<0.05$) could decrease MDA level and repaired bronchioles epithelial damage in asthma rats. It can be concluded that *Mimosa pudica* leaf extract have possibility as herbal therapy on asthma rats models.

Key Word : *Mimosa pudica*, Asthma, MDA and Bronchioles epithel



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT Yang mengatur segala urusan manusia dan atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini yang berjudul Terapi Ekstrak Daun Putri malu (*Mimosa pudica*) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Gambaran Histopatologi Epitel Bronkiolus. Sholawat dan salam semoga tetap tercurah kepada Nabi Agung Muhammad SAW.

Selama penelitian dan penyusunan skripsi ini, halangan dan rintangan terus menerus terjadi pada diri penulis, sehingga dalam penulisannya melibatkan banyak pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku pembimbing I dan drh. Analis Wisnu Wardhana, M.Biomed selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, nasehat dan arahan kepada penulis.
2. Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si selaku Ketua Program Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan PKH UB tercinta.
3. Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., M.P., M.Sc., dan drh. Herlina Pratiwi selaku dosen penguji atas tanggapan dan saran yang diberikan.
4. Ayahanda Bapak Saiku, Ibunda tercinta Ibu Sofiyah dan Adik Salman Hudanazila, serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan do'a, kasih sayang dan dukungan yang tak terhingga kepada penulis.
5. Secara khusus penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada sahabat penulis PANDOWO LIMA *and Friends*, Bisma Putra Mahardika, S.H, Mohammad Amanu, Rizaldi Eki Santoso, S.H, Haryadi Saptono, dan Devi (Monol) atas motivasi, belajar bersama tentang makna kehidupan, dan khususnya dalam semangat berjuang bersama di Kota Perantauan.
6. Sahabat dalam penelitian Mak (Vian), Mbak Noer (Anita), Nisa, Aji, Tari dan Mohan, teman seperjuangan melaksanakan penelitian.

7. Seluruh staf dan asisten laboratorium Biokimia dan Laboratorium fisiologi Hewan Fakultas MIPA Universitas Brawijaya atas bantuan yang telah diberikan selama penulis melakukan penelitian.
8. Seluruh staf dan karyawan PKH, yang telah membantu proses administrasi dalam membuat tugas akhir.
9. Keluarga besar COMPAC yang telah menjadi keluarga baru selama proses pendidikan di Kedokteran Hewan dan menjadi pendorong untuk meraih kesuksesan.
10. Keluarga Besar Laboratorium Anatomi Veteriner PKH UB, yang telah memberikan semangat kepada penulis
11. Ucapan terima kasih penulis kepada semua sahabat angkatan 2008, 2009, 2010, 2011 dan 2012 PKH UB yang telah banyak memberikan bantuan, dorongan serta motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

Akhirnya hanya kepada Allah SWT kita kembalikan semua urusan dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi penulis dan para pembaca pada umumnya, semoga Allah SWT meridhoi dan dicatat sebagai ibadah disisi-Nya, Amin.

Malang, 24 Februari 2014

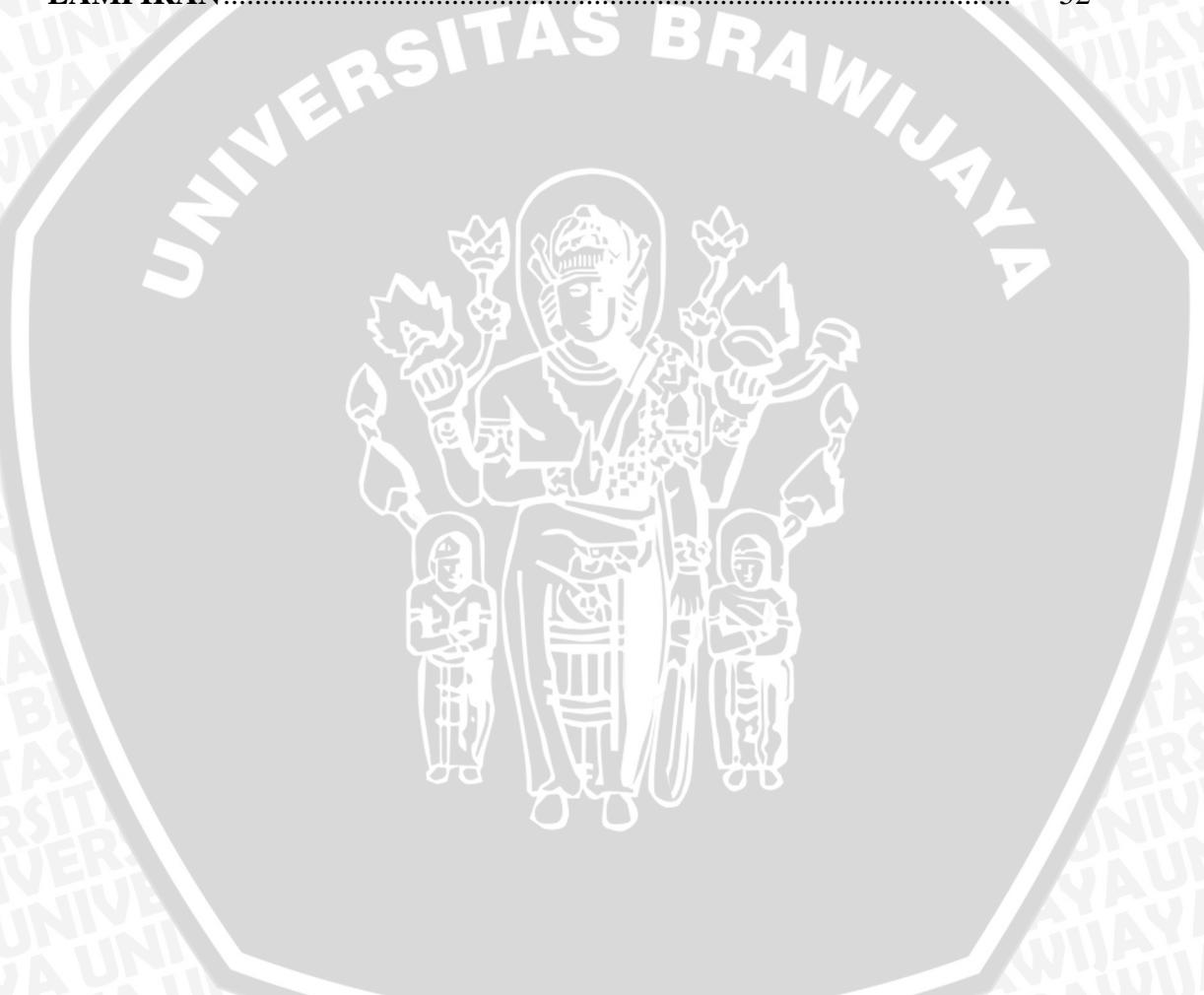
Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|---------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PENGESAHAN | ii |
| HALAMAN PERNYATAAN | iii |
| ABSTRAK | iv |
| ABSTRACT | v |
| KATA PENGANTAR..... | vi |
| DAFTAR ISI | viii |
| DAFTAR GAMBAR | x |
| DAFTAR TABEL | xi |
| DAFTAR LAMPIRAN | xii |
| DAFTAR SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG | xiii |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. Latar Belakang | 1 |
| 1.2. Rumusan Masalah | 4 |
| 1.3. Batasan Masalah..... | 4 |
| 1.4. Tujuan | 5 |
| 1.5. Manfaat | 6 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 7 |
| 2.1. Hewan Coba Tikus | 7 |
| 2.2. Patomekanisme Asma | 8 |
| 2.3. Alergen | 9 |
| 2.4. Lipopolisakarida (LPS) | 10 |
| 2.5. Malondialdehida (MDA) | 12 |
| 2.6. Histopatologi Paru Asma | 12 |
| 2.7. Putri malu (<i>Mimosa pudica</i>)..... | 14 |
| BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN..... | 17 |
| 3.1 Kerangka Konsep | 17 |
| 3.2 Hipotesis Penelitian..... | 19 |
| BAB IV METODE PENELITIAN | 20 |
| 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian | 20 |
| 4.2 Sampel Penelitian | 20 |
| 4.3 Rancangan Penelitian | 21 |
| 4.4 Variabel Penelitian | 22 |
| 4.5 Materi Penelitian | 22 |
| 4.6 Tahapan Penelitian | 22 |
| 4.6.1 Persiapan Hewan Coba | 22 |
| 4.6.2 Tatalaksana Sensitasi dengan Ovalbumin..... | 23 |
| 4.6.3 Tatalasana Injeksi Lipopolisakarida (LPS) | 23 |
| 4.6.4 Dosis Ekstrak daun Putri malu (<i>Mimosa pudica</i>) | 24 |
| 4.6.5 Terapi Menggunakan Ekstrak Daun Putri malu..... | 24 |
| 4.6.6 Pembuatan Kurva Baku Malondialdehida | 25 |
| 4.6.7 Isolasi Protein dan Pengukuran Kadar Malondialdehida..... | 26 |
| 4.6.8 Pembuatan Preaparat Histologi..... | 26 |



| | |
|---|-----------|
| 4.7 Analisa Data | 29 |
| BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN | 30 |
| 5.1 Pengaruh Ekstrak Daun Putri malu (<i>Mimosa pudica</i>) terhadap kadar Malondialdehida (MDA) | 30 |
| 5.2 Pengaruh Ekstrak Daun Putri malu (<i>Mimosa pudica</i>) terhadap Gambaran Histopatologi Epitel Bronkiolus | 37 |
| BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN..... | 43 |
| 6.1 Kesimpulan..... | 43 |
| 6.2 Saran..... | 43 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | 44 |
| LAMPIRAN..... | 52 |



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR GAMBAR

Gambar

Halaman

| | |
|---|----|
| 2.1 Struktur LPS dari Bakteri Gram Negatif | 11 |
| 2.2 Perbandingan gambar saluran pernafasan sehat dan Asma | 13 |
| 2.3 Morfologi tanaman Putri malu (<i>Mimosa pudica</i>)..... | 14 |
| 3.1 Kerangka Konsep Penelitian | 17 |
| 5.1 Mekansime Pembentukan MDA | 34 |
| 5.2 Reaksi <i>Scavenging</i> radikal Bebas oleh flavonoid | 36 |
| 5.3 Histopatologi Organ Paru dengan Pewarnaan HE | 38 |
| L8.1 Kurva Baku MDA..... | 63 |



DAFTAR TABEL**Tabel**

| | Halaman |
|--|----------------|
| 4.1 Rancangan Penelitian | 21 |
| 5.1 Rata-rata Kadar Malondialdehida hasil Penelitian | 31 |
| L6.1 Komposisi Larutan..... | 60 |
| L8.1 Hasil Pengukuran Absorbansi Kurva Baku MDA..... | 63 |
| L8.2 Data Absorbansi MDA | 64 |
| L8.3 Perhitungan Kadar MDA | 64 |
| L11.1 Uji Normalitas Data..... | 67 |
| L11.2 Uji Homogenitas | 67 |
| L11.3 Uji Statistik ANOVA..... | 67 |
| L11.4 Uji Lanjutan BNJ | 68 |
| L11.5 Pemberian Notasi pada Uji BNJ | 69 |



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

Halaman

| | |
|--|----|
| 1. Sertifikat Laik Etik | 52 |
| 2. Keterangan Identifikasi Taksonomi Tanaman | 53 |
| 3. Hasil Uji LCMS | 54 |
| 4. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian | 55 |
| 5. Perhitungan Dosis | 57 |
| 6. Komposisi Larutan | 60 |
| 7. Prosedur Pengukuran Kadar MDA | 61 |
| 8. Kurva Baku MDA, Data Absorbansi, dan Perhitungan Kadar MDA | 63 |
| 9. Pembuatan Preaparat Histologi Paru menggunakan Metode Parafin | 65 |
| 10. Pewarnaan Hematoxylin Eosin | 66 |
| 11. Hasil Uji Statistika | 67 |



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANGSimbol/Singkatan

ANOVA

BB

ECF

FcεR1

g

H₂O₂

HE

IgE

IL

Kg

LPS

MDA

NCF

NO

OH

OVA

PBS

PUFA

RAL

ROS

rpm

TBA

TCA

Th-2

WHO

Keterangan*Analysis of Variance*

Berat Badan

*Eosinophil Chemotactic Factor**Fc epsilon Receptor I*

Gram

Hydrogen Peroksida

Hematoksilin-Eosin

*Imunoglobulin E**Interleukin*

Kilogram

Lipopopolisakarida

Malondialdehida

*Neutrophil Chemotactic Factor**Nitrit Oxyda**Hydroxyl radical*

Ovalbumin

*Phosphat Buffer Saline**Polyunsaturated Fatty Acid*

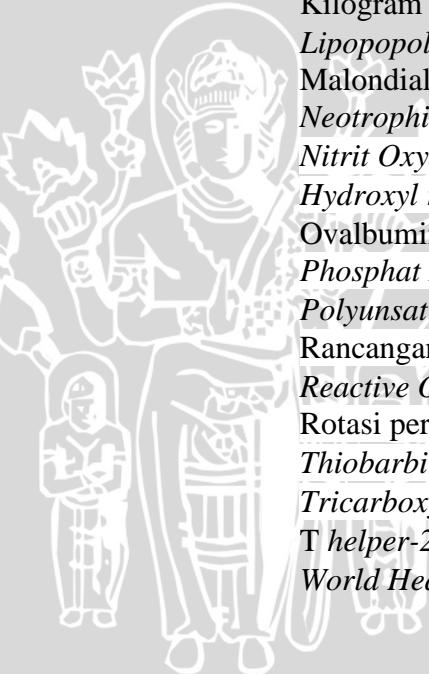
Rancangan Acak Lengkap

Reactive Oxygen Species

Rotasi per menit

*Thiobarbituric Acid**Tricarboxylic Acid*

T helper-2

World Healt Organitation

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asma merupakan penyakit kronik pada saluran pernafasan yang mengakibatkan terjadinya penyempitan saluran pernafasan. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) memaparkan bahwa 100-150 juta orang di dunia adalah penderita asma. Sedangkan di Indonesia 2-5% penduduk Indonesia menderita asma. Pada ilmu kedokteran hewan asma banyak dijumpai pada kucing dan anjing. Pada negara maju seperti Australia, kejadian asma banyak menyerang kucing daripada anjing (Miklosi, 2007). *Feline Asthma Organization* menyatakan telah terjadi peningkatan kejadian asma pada kucing setiap bulannya, hal ini diperkuat dengan hasil rekapitulasi data pada salah satu klinik kucing di Amerika yang dilakukan oleh Elaine Wexler-Mitchell yang menunjukkan peningkatan jumlah penderita asma. Pada bulan Januari 2012 tercatat sejumlah 1004 kasus asma pada kucing, dan pada bulan berikutnya tercatat sebanyak 1353 kasus. Asma pada anjing dan kucing dapat dijumpai pada semua usia. Jumlah penderita asma ini diperkirakan akan terus mengalami peningkatan setiap tahunnya. Kejadian asma pada hewan di Indonesia belum dipublikasikan secara resmi oleh dinas terkait. Hewan yang menderita asma memiliki gejala klinis batuk dan sesak nafas (Foster *et al.*, 2004)

Asma pada hewan dipengaruhi oleh banyak faktor, salah satunya adalah infeksi rongga mulut yang telah diketahui mampu menyebabkan keadaan asma pada anjing dan polusi udara yang mampu menyebabkan gangguan pernafasan pada kucing. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Utomo

(2012) paparan lipopolisakrida (LPS) dari bakteri Gram negatif *Phorphyromonas gingivalis* mampu meningkatkan tingkat keparahan asma. Bakteri ini banyak dijumpai pada plak gigi kucing dan anjing. Dari hasil pemeriksaan plak pada gigi anjing ditemukan bakteri *Phorphyromonas gingivalis* (68%), *Prevotella intermedia* (44%) dan *Actinomyces* (12%) (Allaker *et al.*, 1997; David *et al.*, 2005)

Lipopolisakrida (LPS) akan menyebabkan kerusakan organ paru dan menginduksi produksi dan pelepasan sel inflamatori seperti eusinofil, neutrofil, monosit, makrofag dan sitokin. Sel-sel inflamasi yang teraktivasi akibat inflamasi menghasilkan oksidan reaktif, seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang mampu menghasilkan senyawa radikal bebas dan enzim proteolitik. Radikal bebas mampu menyebabkan peroksidasi lipid pada membran biologis sehingga menyebabkan kerusakan membran biologis. Peroksidasi lipid merupakan proses oksidasi asam lipid tidak jenuh berantai panjang (*Polyunsaturated fatty acids* atau PUFA) pada membran sel yang menghasilkan produk aldehida seperti malondialdehida (Sharma *et al.*, 2003). Peroksidasi lipid yang terjadi akan menyebabkan kerusakan sel epitel pada bronkiolus. Enzim proteolitik yang dihasilkan memiliki sifat toksik terhadap sel epitel sehingga akan mempengaruhi gambaran histologi sel epitel bronkiolus (Beumer, 2003).

Saat ini pengobatan asma dapat dilakukan dengan menggunakan obat-obat *bronkodilator* seperti, salbutamol (albuterol), proterenol (orsiprenalin), terbutalin, fenoterol (Gunawan dkk., 2007). Namun penggunaan obat-obatan

kimia tersebut memiliki beberapa efek samping diantaranya, hipertensi dan osteoporosis dini. Oleh karena itu perlu dicari alternatif pengobatan asma di antaranya menggunakan bahan alam.

Indonesia adalah negara tropis, yang kaya akan biodeversitas tanaman. Tanaman gulma seperti Putri malu merupakan tanaman yang tidak termanfaatkan secara baik di Indonesia (Bulan, 2012). Tanaman ini memiliki kemampuan invasif yang sangat tinggi dan mampu berkembang biak secara cepat melebihi tanaman lain. Oleh karena itu tanaman ini sering disebut sebagai hama persawahan oleh sebagian masyarakat.

Menurut Zhang *et al.*, 2011 daun putri malu memiliki total flavonoid dan phenolik yang tinggi dibandingkan dengan tanaman lain seperti daun katuk dan daun sirih. Daun sirih (*Piper betle*) memiliki konsentrasi efektif (IC₅₀) sebesar 79,3 µg/ml (Abrahim *et al.*, 2012), daun katuk (*Calotropis procera*) memiliki (IC₅₀) sebesar 80,81µg/ml (Zuhra dkk., 2008) dan daun putri malu (*Mimosa pudica*) memiliki (IC₅₀) sebesar 54,13 µg/ml (Zafar *et al.*, 2011). IC₅₀ merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak µg/ml yang mampu menghambat proses oksidasi 50%. Semakin kecil IC₅₀ semakin tinggi aktivitas antioksidan (Zuhra dkk., 2008). Azmi *et al.*, (2011) menemukan bahwa putri malu mampu digunakan sebagai *anti-diabetic*, *antitoxin*, *antihepatotoxin* dan antioksidan. Menurut Elango *et al.*, (2012), Winarsih dan Azmi (2011), *Mimosa pudica* mengandung banyak senyawa kimia flavonoid, tannin, mimosin, saponin, terpenoid. Antioksidan memiliki peran penting untuk menghambat dan *scavenger* radikal bebas. Oleh karena itu, penelitian ini

dilakukan untuk mengetahui bahwa ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) dapat digunakan sebagai kandidat terapi asma yang mampu menurunkan peroksidasi lipid sehingga kadar MDA akan turun dan menurunkan enzim proteolitik sebagai enzim perusak sel epitel sehingga akan memengaruhi gambaran histopatologi epitel bronkiolus.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut :

- 1) Apakah pemberian ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) menurunkan kadar malondialdehida (MDA) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang terpapar LPS?
- 2) Apakah terjadi perbaikan gambaran histopatologi sel epitel bronkiolus tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang terpapar LPS setelah diterapi dengan ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) ?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

- 1) Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta dengan umur 8-12 minggu dan berat badan 150-250 gram. Penggunaan hewan coba dalam penelitian telah mendapatkan

sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No: 208-KEP-UB (Lampiran 1)

- 2) Pembuatan keadaan asma pada hewan model tikus dilakukan dengan cara injeksi intraperitoneal dan inhalasi ovalbumin (OVA) serta diperparah dengan lipopolisakarida (LPS) bakteri *Porphyromonas gingivalis* diberikan dengan cara injeksi intrasulkular dengan dosis 1 μ g/ml (Utomo, 2012).
- 3) Tanaman putri malu didapatkan dari lingkungan Universitas Brawijaya yang telah dideterminasi dan sudah mendapatkan surat keterangan taksonomi dari Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas MIPA Universitas Brawijaya No. 0102/Takso.Identifikasi/03/2013 (Lampiran 2)
- 4) Dosis terapi ekstrak daun Putri malu (*Mimosa pudica*) didapatkan dari ekstrak air dan dosis yang diberikan pada tikus model asma yaitu sebesar 500 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB selama 2 minggu dimulai pada hari ke- 22 (Rajendran, 2010).
- 5) Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar malondialdehida (MDA) yang diukur dengan menggunakan uji TBA dan gambaran histopatologi paru secara kualitatif menggunakan mikroskop Olympus BX51 setelah diberi ekstraksi daun putri malu (*Mimosa pudica*).

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:



- 1) Mengetahui kadar malondialdehida (MDA) pada hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model asma setelah diberikan terapi ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*).
- 2) Mengetahui gambaran sel epitel bronkiolus pada histopatologi paru tikus (*Rattus norvegicus*) model asma setelah diberikan terapi ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*).

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) terhadap gambaran sel epitel bronkiolus paru dan penurunan kadar malondialdehida (MDA) pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) asma yang terpapar LPS dan membuktikan bahwa ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) dapat digunakan sebagai antioksidan alami sebagai kandidat terapi asma yang terpapar LPS.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma

Hewan laboratorium atau hewan percobaan dapat digunakan sebagai media dalam penelitian atau pengamatan laboratorik untuk mempelajari dan mengembangkan ilmu pengetahuan. Hewan coba yang banyak digunakan dalam penelitian adalah tikus, mencit, marmut, kelinci, hamster, unggas, kambing, domba, sapi, kerbau, kuda, dan simpanse (Malole dan Pramono, 1989). Pengembangan hewan model untuk penyakit alergi seperti asma, rinitis, alergi makanan telah banyak dilakukan pada tikus (Nials *et al.*, 2008). Penggunaan tikus sebagai hewan model asma dikarenakan tikus memiliki beberapa keunggulan yaitu produksi IgE yang merupakan antibodi anafilaksis (hipersensitivitas terhadap antigen) terbesar. Selain itu tikus memiliki kemampuan untuk mengalami *airway hipereactivitas* yang lebih lama (Zosky & Sly, 2007). Penelitian Kumar *et al.*, (2008) telah menggunakan Ovalbumin (OVA) dan *Alumunium Hydroxide* (AlOH_3) pada hewan coba sebagai sensitiasi alergi akut penginduksi asma, yang diketahui dapat membantu pembentukan T *helper* 2 (Th-2) oleh sistem imun ketika terpapar antigen.

Tikus *Rattus norvegicus* merupakan hewan yang umum digunakan dalam penelitian, karena mudah dipelihara, secara garis besar fungsi dan bentuk organ serta proses biokimianya antara tikus dan manusia memiliki banyak kesamaan (Suckow, 2006). *Rattus norvegicus* telah digunakan sebagai hewan model asma oleh Epstein (2004), hewan ini memiliki waktu hidup 2,5 tahun sampai 3,5 tahun, berat badan jantan 300-500 g dan betina 250-300 g, denyut jantung 330-

480 kali permenit, frekuensi respirasi 85 kali permenit dan memasuki masa dewasa pada usia 40-60 hari. Klasifikasi tikus yang digunakan dalam penelitian menurut Myers dan Armitage (2004), adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia
Kelas : Mamalia
Ordo : Rodentia
Famili : Muridae
Genus : *Rattus*
Spesies : *Rattus norvegicus*

2.2 Patomekanisme Asma

Menurut Nelson (2007), asma merupakan penyakit inflamasi kronis pada saluran pernapasan yang menyebabkan penyempitan saluran nafas. Inflamasi didefinisikan sebagai reaksi lokal jaringan terhadap infeksi atau cedera (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Patomekanisme asma pada dasarnya terbagi kedalam dua tahapan yaitu tahapan sensitisasi dan tahapan pemaparan ulang terhadap alergen. Tahapan sensitisasi dimulai ketika ada paparan alergen seperti Ovalbumin (Ova) pertama kali, kemudian alergen ditangkap oleh makrofag atau dendrit sel sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC). Alergen yang telah tertangkap kemudian dibawa masuk melalui sistem limfatik untuk dipresentasikan kepada sel T yang akan memicu produksi sitokin pro inflamasi seperti IL 12. Sekresi sitokin pro inflamasi akan menyetimulasi sel B untuk memproduksi IgG (Antibodi *protective* yang normal dan tidak dihasilkan pada

reaksi alergi). Tahapan pemaparan ulang alergen dilakukan dengan alergen yang sama. Alergen yang telah tertangkap oleh makrofag kemudian dibawa masuk melalui sistem limfatik untuk dipresentasikan kepada sel T. Paparan antigen mengaktifkan sel Th-2 dan memproduksi sitokin pro inflamasi seperti IL-4, IL-5 dan IL-13 yang merangsang sel B berkembang menjadi sel plasma yang membentuk IgE (imunoglobulin yang bekerja spesifik terhadap reaksi alergi) yang dilepas dan diikat oleh Fc ϵ R1 pada sel mast dan basofil sehingga akan menimbulkan pelepasan mediator amina (histamin, leukotrien dan sitokin) yang mengawali reaksi awal asma yang dikarakterisasi dengan hipersekresi mukus, perubahan struktur saluran dan merangsang kontraksi otot polos sehingga menimbulkan penyempitan saluran nafas (Barnes *et al.*, 1998).

Obstruksi saluran pernapasan dapat menyebabkan batuk, rasa berat di dada dan sesak. Hiperesponsif saluran nafas akan menyebabkan terjadinya bronkokonstriksi. Pada penderita asma terjadi penebalan lapisan otot polos yang merupakan hasil peningkatan ukuran sel otot polos (hipertropi) sehingga menyebabkan penyempitan saluran pernapasan (Barnes *et al.*, 1998; Busse and Lemanske, 2001).

2.3 Alergen

Alergen yang umum digunakan dalam pembuatan hewan model asma untuk menimbulkan peradangan pada paru adalah ovalbumin (Ova) (Kumar *et al.*, 2008). Ovalbumin merupakan 60-65% komponen dalam putih telur, dan terdiri atas 385 asam amino dengan massa molekul 45 kDa (Huntingeston dan

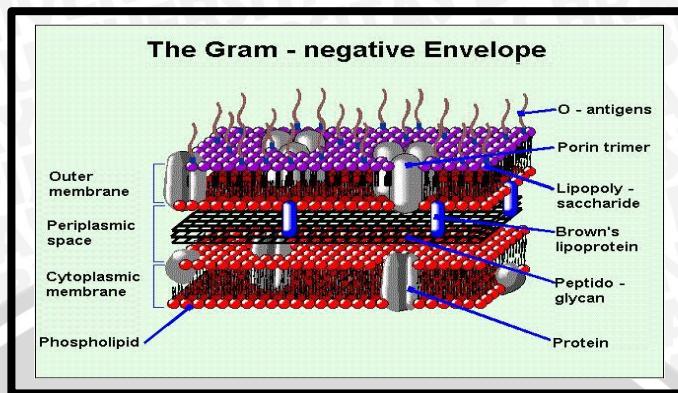


Stein, 2001). Alergen lain yang sering digunakan untuk menginduksi asma adalah *house dust mite* (HDM) dan ekstrak kecoa (Johnson *et al.*, 2004; Sarpong *et al.*, 2003). Paparan kronik ovalbumin sebagai alergen akan menimbulkan perubahan struktur saluran nafas dan inflamasi (Barlianto *dkk.*, 2009). Pemberian ovalbumin juga memberikan gambaran peningkatan IgE dan terjadi inflamasi yang ditandai dengan infiltrasi sel radang dan eosinofil pada histopatologi jaringan paru. Sensitisasi menggunakan ovalbumin secara inhalasi pada hewan coba menunjukkan *airway remodeling* seperti gambaran asma pada manusia (Tang *et al.*, 2006).

2.4 Lipopolisakarida (LPS)

Lipopolisakarida (LPS) merupakan dinding sel bakteri Gram negatif yang mampu memperparah keadaan asma. Lipopolisakarida yang biasa digunakan untuk memperparah kejadian asma berasal dari LPS bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Bakteri ini merupakan bakteri anaerob *Gram negative* yang tidak berspora (*non-spore forming*) dan tidak mempunyai alat gerak (*non motile*) (Iman *dkk.*, 2011). Lipopolisakarida bersifat sebagai imunostimulan yang potensial berasal dari dinding sel bakteri Gram negatif (Friskawati, 2001).





Gambar 2.1. Gambar Struktur LPS dari Bakteri Gram Negatif (Iman, dkk 2011)

Dinding bakteri Gram negatif tersusun dari Lipopolisakarida (LPS) (Gambar 2.1). Lipopolisakarida sendiri terdiri dari tiga bagian yaitu lipid A, polisakarida inti, dan polisakarida O. Sifat antigenik bakteri Gram negatif ditentukan oleh lipopolisakarida terutama polisakarida A. Lipid A menyebakan bakteri lebih tahan terhadap fagositosis (Iman, dkk 2011). Penggunaan LPS dari bakteri *Porphyromonas gingivalis*, dikarenakan bakteri ini banyak terdapat pada karang gigi yang mampu menimbulkan radang kronis pada gusi dan jaringan sekitar akar gusi (Allaker *et al.*, 1997 ; David *et al.*, 2005). Menurut Beumer *et al* (2003), Lipopolisakarida dapat terikat dengan dinding sel saluran pernapasan melalui bantuan senyawa *Lipopolysaccharide-binding protein* (LBP) dan mengantarkan LPS untuk dikenali CD14. Ikatan LPS dan CD14 akan melawati *Toll Like Receptor-4* (TLR-4) sehingga akan meningkatkan aktivasi sel dendrit dan Th-2 akan membuat sel B memproduksi IgE dan menyebabkan inflamasi serta *remodeling* jaringan saluran pernafasan.

Lipopolisakarida mampu menginduksi produksi dan pelepasan sel-sel radang dan senyawa radikal bebas dalam jumlah besar yang sangat toksik

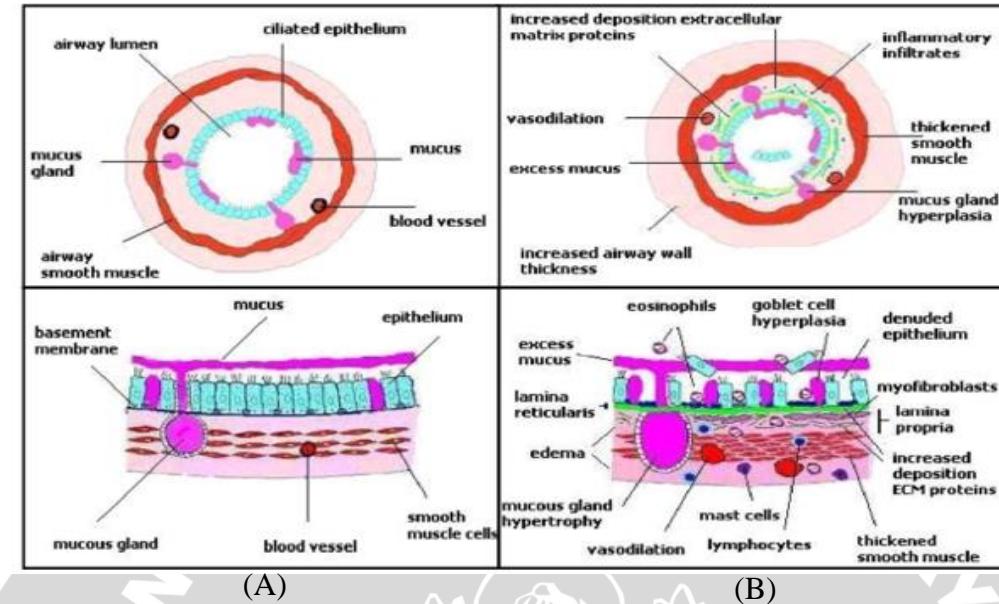
sehingga akan menimbulkan kerusakan oksidatif dari tingkat sel sampai organ tubuh (Beume *et al.*, 2003). Berdasarkan penelitian Utomo (2006), paparan LPS pada tikus asma mampu memperparah kejadian asma yang mampu menimbulkan terjadinya inflamasi pada saluran pernafasan.

2.5 Molondialdehida (MDA)

Malondialdehida (MDA) merupakan hasil pemecahan lipid peroksida dan merupakan salah satu penanda adanya stres oksidatif. Lipid peroksida adalah hasil reaksi oksidasi radikal bebas dengan lipid membran sel jaringan tubuh atau dengan asam lemak tak jenuh (Suwandi, 2012). Hasil akhir dari reaksi ini akan membentuk hidrogen peroksida, yang berefek pada kerusakan membran sel antara lain dengan mengubah struktur dan fungsi membran, dalam kondisi yang lebih ekstrim menimbulkan kematian sel (Halliwell and Gutteridge, 2007). Stres oksidatif dalam tubuh disebabkan oleh adanya radikal bebas yang dihasilkan oleh (ROS) (Widodo, 1995).

2.6 Histopatologi Paru Asma

Secara normal permukaan saluran pernafasan intrapulmonari dilapisi oleh epitel pseudostratified yang membentuk barier aktif antara lingkungan luar dan dalam akan tetapi pada kondisi asma akan menyebabkan perubahan sel dan abnormalitas struktur karena terjadi inflamasi akut.



Gambar 2.2. Perbandingan Gambaran saluran pernafasan normal (A) dan keadaan asma (B) (Palmas, 2002)

Perubahan struktur epitel pada organ paru sangat terlihat pada penderita asma, dari Gambar 2.2 diatas menunjukkan bahwa telah terjadi kerusakan struktur epitel bronkiolus, pelepasan epitel dari membran basalis, *hypertrophy* kelenjar mukus, *hyperplasia* sel goblet dan edema jaringan. Perubahan ini disebut sebagai *airway remodeling* yang memiliki komponen hiperplasia dan metaplasia epitel, hiperplasia dan hipertropi otot polos serta vasodilatasi pembuluh darah (Barlianto, 2009). Paparan kronik ovalbumin menyebabkan perubahan struktur saluran pernafasan berupa penebalan epitel, peningkatan sel goblet dan penebalan otot polos (Temelkovski, 1998; Locke, 2007). Paparan LPS pada tikus asma akan menyebabkan kerusakan struktur epitel silindris bersilia menjadi tidak beraturan dan terjadi pelepasan epitel dari membran basalis. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Utomo (2006) bahwa LPS dari

bakteri Gram negatif diketahui dapat menginduksi inflamasi pada saluran pernafasan sehingga mampu memperparah kondisi asma.

2.7 Putri Malu (*Mimosa pudica*)

Putri malu (*Mimosa pudica*) merupakan tanaman yang tersebar didaerah tropis dan sub tropis, biasanya terdapat pada daerah yang iklimnya lembab dan hangat (Karthikeyan, 2009). Putri malu banyak dimanfaatkan sebagai sumber obat pada pengobatan *ayurverdic* di India. Pengobatan *ayurverdic* adalah sistem pengobatan tradisional orang India, yang merupakan sistem pengobatan holistik tertua didunia (Santosa, 2007). Secara morfologi, daun putri malu berupa daun majemuk menyirip ganda yang sempurna. Jumlah anak daun setiap siripnya 5-26 pasang, panjang 6-16 mm dan lebar 1-3 mm, berwarna hijau dan tepinya berwarna ungu. Batangnya bulat dan berambut sikat kebawah (Jenova, 2009). Morfologi tanaman putri malu dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Morfologi Tanaman Herbal Putri malu (*Mimosa pudica*) (Kasmira, 2011)

Klasifikasi tanaman putri malu dari laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan Universitas Brawijaya:

Kingdom : Plantae (tumbuhan)

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Fabales

Family : Fabaceae

Genus : *Mimosa*

Species : *Mimosa pudica L.*

Hasil Fitokimia simplisia dan ekstrak putri malu (*Mimosa pudica*) menunjukkan adanya senyawa flavonoid, tanin, polifenol, monoterpenoid, seskuiterpenoid, steroid, saponin dan kuion. Penelitian zang *et al.*, (2011) menunjukkan bahwa total flavonoid dan total phenolik banyak terdapat pada daunnya dibandingkan dengan bagian yang lain dari tanaman ini. Daun dan batang putri malu (*Mimosa pudica*) dilaporkan memiliki kandungan alkaloid mimosine dan akarnya banyak mengandung tanin (Ghani, 2003). Daun putri malu banyak digunakan sebagai antihiperglikemia, antiulser, antidiare, antialergi, hepatoprotective, dan antiinflamasi (Vaidyaratannm, 2001; Vinothapooshan, 2010).

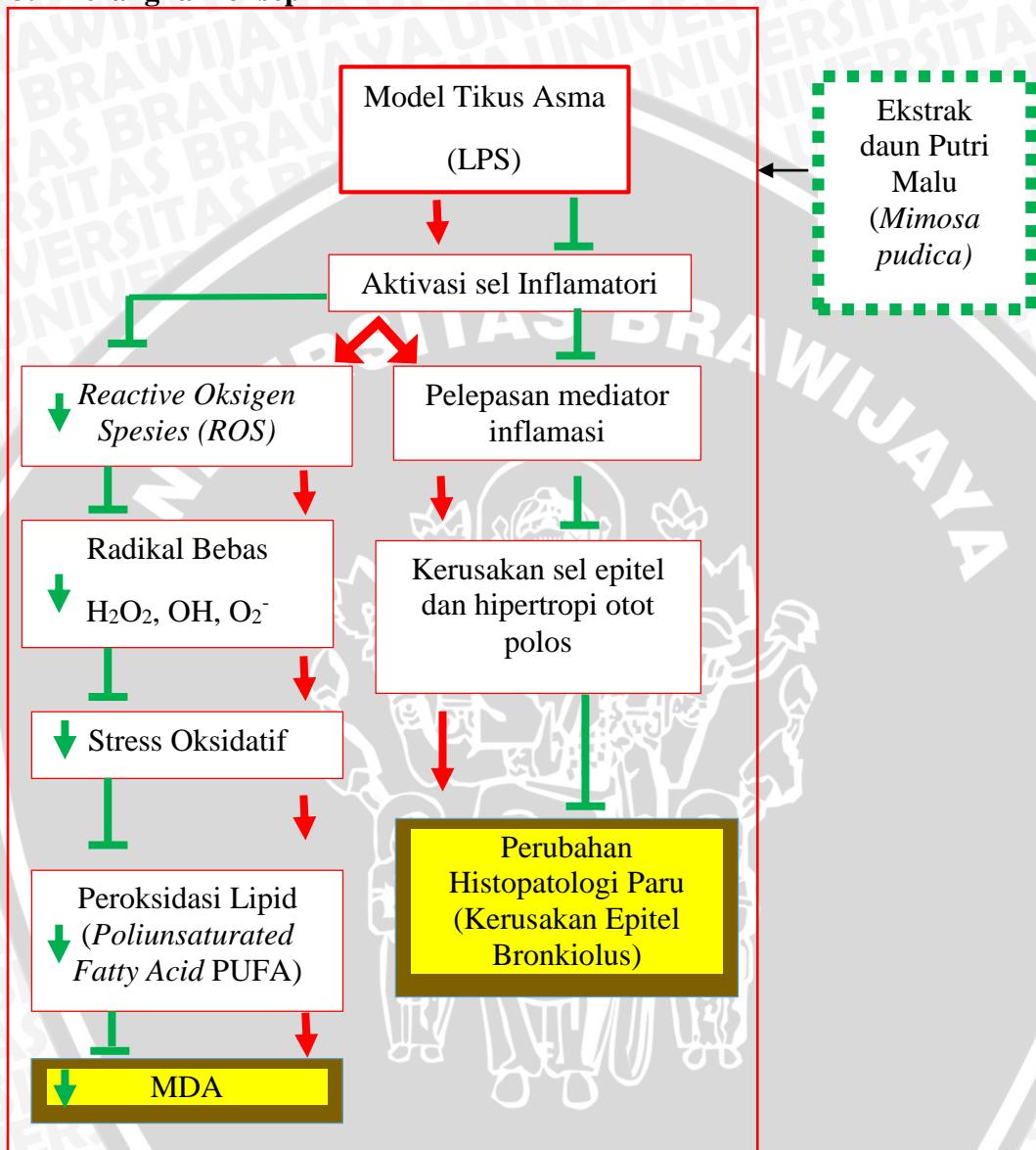
Penelitian Zhang *et al.*, (2011) menunjukkan bahwa antioksidan yang dimiliki *Mimosa pudica* lebih kuat dari pada antioksidan sintetik. Dalam daun putri malu (*Mimosa pudica*) memiliki konsentrasi efektif (IC_{50}) sebesar 54, 13 $\mu\text{g/ml}$ (Zafar *et al.*, 2011). Antioksidan dalam daun putri malu dapat digunakan untuk menangkal radikal bebas dan bersifat hepatoprotektif (Bulan, 2012).

Kerusakan oksidatif pada asma sebagai akibat keseimbangan antara oksidan dan antioksidan rendah (Winarsi, 2007). Antioksidan adalah suatu senyawa yang mampu meredam efek oksidan dengan cara memberikan elektron pada radikal bebas (ROS), sehingga akan membentuk senyawa yang lebih stabil (Danuantoso, 2003).



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan Gambar :

- : Hewan Model Asma
- : Variabel bebas
- : Variabel tergantung
- : Patomekanisme
- : Pengaruh pemberian terapi ekstrak daun putri malu
- : Perlakuan

Inflamasi kronik pada hewan model asma ditambah dengan paparan LPS menyebabkan aktivasi sel-sel inflamatori seperti eosinofil, makrofag dan sel mast yang mampu melepaskan mediator inflamasi seperti histamin, leukotrien dan sitokin serta menghasilkan oksigen reaktif (ROS) (Busse and Lemnaski, 2001). Oksigen reaktif yang terlepas menyebabkan ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan sehingga menimbulkan stres oksidatif. Radikal bebas akan bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh (PUFA) penyusun membran sel untuk mencapai keseimbangan atau disebut sebagai proses peroksidasi lipid yang menghasilkan produk aldehyda berupa MDA. Sel inflamatori yang teraktivasi pada kondisi asma menyebabkan peningkatan enzim proteolitik, sehingga mampu menyebabkan kerusakan sel epitel bronkiolus yang mempengaruhi perubahan histologi jaringan.

Pemberian ekstrak daun Putri malu untuk meningkatkan jumlah antioksidan di dalam tubuh. Antioksidan yang paling banyak ditemukan pada daun putri malu adalah flavonoid. Flavonoid menstabilkan radikal sehingga menghambat proses peroksidasi lipid dan menurunkan kadar MDA (Sofia, 2013). Kemampuan flavonoid menghambat sitokin pro inflamasi, menyebabkan aktivitas enzim proteolitik berkurang sehingga kerusakan epitel bronkiolus dapat berkurang (Takahasi *and* Tanaka, 2013). Kondisi ini dapat dilihat dari perbaikan gambaran histopatologi organ paru.

3.2 Hipotesa Penelitian

Dari rumusan permasalahan, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut: Ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) mampu menurunkan kadar malondialdehia (MDA) pada hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang telah di papar dengan Lipopolisakarida serta memperbaiki gambaran histologi berdasarkan perbaikan sel epitel bronkiolus.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2013 – Februari 2014

Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, UB – Malang.

4.2 Sampel Penelitian

Hewan model menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) betina strain wistar berumur 8-12 minggu (Epstein, 2004). Bobot badan tikus antara 150 - 250 gram. Hewan coba diadaptasikan selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

$$\begin{aligned} t(n-1) &\geq 15 \\ t(n-1) &\geq 15 \\ 4(n-1) &\geq 15 \\ 4n-4 &\geq 15 \\ 4n &\geq 19 \\ n &\geq 19/4 \\ n &\geq 4,75 \\ n &\approx 5 \end{aligned}$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 4 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 5 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba. Penggunaan hewan coba

dalam penelitian telah mendapatkan persetujuan dari komisi etik UB No.208-KEP-UB.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana dimana subyek dibagi menjadi 4 kelompok secara random. Tiap kelompok terdiri dari 5 tikus. Kelompok 1 adalah tikus sehat (kontrol negatif), kelompok 2 adalah tikus diberi OVA + LPS (kontrol positif), sedangkan kelompok 3 dan 4 diberi OVA+LPS+ Ekstrak daun *Mimosa pudica* dengan dosis masing-masing sebesar 500 mg/hari dan 1000 mg/hari (Lampiran 4).

Tabel 4.1. Rancangan penelitian

| Variabel yang diamati | Ulangan | | | | |
|---|---------|---|---|---|---|
| Kadar MDA dan Histopatologi sel epitel bronkiolus | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Kelompok A (kontrol negatif) | | | | | |
| Kelompok B (kontrol positif) | | | | | |
| Kelompok C (terapi dosis 500 mg/kg BB) | | | | | |
| Kelompok D (terapi dosis 1000 mg/kg BB) | | | | | |



4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

- | | |
|---------------------|--|
| Variabel bebas | : Dosis ekstrak daun Putri malu (<i>Mimosa pudica</i>) |
| Variabel tergantung | : Kadar MDA dan histopatologi paru epitel bronkiolus |
| Variabel kendali | : Tikus, jenis kelamin, berat badan, umur |

4.5 Materi Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), Ovalbumin (Sigma-Aldrich, 950512), AlOH₃, Phosphat Buffer Saline (PBS), Paraformaldehiyde Acid (PFA), Aquades, Na Phys , LPS 1435/1449 dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Astarte Biologics), standar MDA, TCA 100%, HCl, Na-Thio 1%, NaCl fisiologis 0,9%, alkohol 70%, alkohol 90%, alkohol 95%, alkohol absolut, xilol, parafin, aquades, Chlorofom dan pewarna histologi hematoksilin eosin.

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain sputit 1 ml, sputit 5 ml, kandang tikus, *scalpel* , gunting, gelas objek, mortar, *microtube*, vortex, water bath 100°C, *Omron CompAir Compressor Nebulizer*, spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601*, kertas saring, tabung 250 ml, tabung 10 ml, tabung ependorf (mikrotube), *micropipet*, *Freezer* dan mikroskop Olympus BX51.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Tikus yang digunakan untuk penelitian diaklimatisasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian makanan berupa ransum

basal berisikan serat (5%), protein (20%), dan lemak (5-10%). Pakan tikus bisa berbentuk serbuk atau pelet dan harus diberikan secara teratur. Rata-rata konsumsi pakan tikus perhari (5 g/100 g BB/Hari) dan diberikan air minum *adlibitum* (Hamilton, 1998).

Tikus dikandangkan dalam kandang yang berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm, dengan jumlah sesuai dengan jumlah tikus yang digunakan. Kandang terbuat dari *stainless steel*. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

4.6.2 Tatalaksana Sensitasi Alergi dengan Ovalbumin

Perlakuan pertama yang dilakukan pada tikus adalah menginjeksian ovalbumin (Sigma-Aldrich) 10 µg yang diemulsi 1,5 mg AlOH3 dalam 200µl PBS (*phosphate buffer saline*) pada hari ke-0 dan 14 secara intra peritoneal (Cornad *et al.*,2009). Selanjutnya dilakukan sensitasi OVA secara inhalasi. Pemaparan OVA aerosol dilakukan dalam tabung transparan yang dihubungkan dengan *Omron CompAir Compressor Nebulizer* pada hari ke 21, dilakukan dengan melarutkan OVA dalam NaCl steril sebanyak 1 mg/ml selama 20 menit (Lampiran 4).

4.6.3 Tatalaksana injeksi Lipopolisakarida (LPS)

Penginduksian lipopolisakarida (LPS) dilakukan secara intrasulkuler menggunakan dosis 1 µg/ml pada sulkus gingiva molar rahang atas kiri tikus

sesuai yang dilakukan oleh Stephanie *et al.*, (2002) dan Utomo (2012). LPS yang digunakan adalah LPS1435/1450 dari *Porphyromonas gingivalis* (Astarte Biologics) yang berfungsi sebagai agen infeksi rongga mulut dan memodulasi respon imun. Injeksi LPS intrasulkuler dilakukan berturut-turut pada hari ke 10 dan 11 (Sthepanie *et al*, 2002) (Lampiran 4).

4.6.4 Dosis ekstrak daun putri malu

Penentuan dosis ekstrak Puti malu (*Mimosa pudica*) berdasarkan penelitian Rajendran (2010), yaitu 200 mg/Kg BB – 2000 mg/Kg BB sebagai terapi anti inflamasi dan memiliki kemampuan hepatoprotektif. Pemberian dosis diatas 2000 mg/Kg BB diduga memiliki efek toksik. Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan dosis 500 mg/Kg BB dan dosis 1000 mg/Kg BB sebagai dosis eksperimental untuk terapi asma (Lampiran 5).

4.6.5 Terapi Menggunakan Ekstrak daun Putri malu

Daun putri malu (*Mimosa pudica*) berupa daun menyirip yang sempurna, jumlah anak daun setiap siripnya adalah 5-26 pasang. Daun yang digunakan untuk terapi memiliki ciri-ciri lebar 1-3 mm, berwarna hijau dan tepinya berwarna ungu. Daun yang digunakan bukan berasal dari daun muda. Metode pembuatan ekstrak air putri malu (*Mimosa pudica*) berdasarkan metode Handa (2008), *Mimosa pudica* yang sudah kering ditimbang sebanyak 500 mg (kelompok C) dan 1000 mg (kelompok D) dan dimasukkan kedalam gelas kimia dengan menambahkan 100 ml akuades pada kelompok C dan Kelompok D. Kemudian masing-masing kelompok tersebut direbus di atas *hotplate* pada temperatur 70 °C dengan dilakukan pengadukan hingga air

rebusan menjadi 10 ml. Setelah itu, disaring menggunakan kertas saring sehingga di dapatkan ekstrak air *Mimosa pudica* dan didinginkan. Sediaan ekstrak air daun *Mimosa pudica* untuk kelompok C (terapi dosis 500 mg/kg BB) dan D (terapi dosis 1000 mg/kg BB) dipersiapkan setiap hari.

Metode pemberian volume terapi per oral tiap ekor tikus berdasarkan Bekow and Baumans (2003) sebanyak 2 ml pada kelompok tikus (C) terapi ekstrak air *Mimosa pudica* dosis 500 mg/kg BB dan (D) ekstrak air *Mimosa pudica* dengan dosis 1000 mg/kg BB diterapi pada hari ke-22 dengan ekstrak air *Mimosa pudica* selama 2 minggu berturut-turut (Rajendran, 2010).

4.6.6 Pembuatan Kurva Baku Malondialdehida (MDA)

Standar MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 mg/ml masing-masing diambil 100 µl, kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda, setelah itu ditambahkan 550 µl aquades. Setiap tabung tersebut ditambahkan 100 µl TCA 100%, 250 µl HCl 1N dan 100 µl Na-Thio 1%, dan campuran yang terbentuk dihomogenkan dengan vortex. Tabung ditutup dengan plastik dan diberi lubang. Tabung diinkubasi dalam penangas air dengan suhu 100°C selama 30 menit. Setelah itu, didinginkan pada suhu ruangan. Larutan standar kemudian dibaca pada panjang gelombang maksimum (533 nm) menggunakan spektrofotometer (*Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601*). Kurva standar MDA dihasilkan dari persamaan regresi antara absorbansi (y) dan konsentrasi MDA (x) (Amin, 2009) (Lampiran 7).

4.6.7 Isolasi Protein dan Pengukuran Kadar Malondialdehida

Isolasi protein diawali dengan melakukan penggerusan organ paru sebanyak 0,225 g pada mortar dingin, kemudian ditambahkan 500 μ l NaCl fisiologis 0,9%, selanjutnya homogenat dipindah kedalam ependorf dan disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil 100 μ l dimasukkan kedalam ependorf, ditambah 550 μ l akuades, 100 μ l TCA kemudian dihomogenkan dengan vortex, ditambahkan 250 μ l HCL 1N lalu lalu dihomogenkan dengan vortek. Kemudian ditambahkan dengan 100 μ l Na-Thio 1% dan dihomogenkan kembali dengan vortex. Setelah itu, mulut tabung ditutup menggunakan plastix *wrap* dan dipanaskan dalam *water bath* 100°C selama 30 menit. Setelah dipanaskan, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipindah kedalam tabung reaksi baru. Sampel kemudian diukur absorbansinya dengan spektofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601* pada panjang gelombang maksimum (533 nm) Amin (2009) (Lampiran 7).

4.6.8 Pembuatan Preparat Histologi

Pembuatan preparat histologi didasarkan atas perlakuan terhadap tikus yang telah dilakukan. Pembuatan preparat Tikus B (Asma) dimulai dengan mematikan tikus 30 menit setelah diberi OVA secara inhalasi pada hari ke-21 dengan cara dislokasi leher, kemudian tikus debedah dan diambil organ parunya. Pada tikus yang mendapatkan perlakuan terapi didislokasi setelah 2 minggu terapi diberikan. Sampel paru yang diperoleh, dicuci dengan NaCl

fisiologis 0,9% bertujuan untuk menghilangkan darah. Proses pembuatan preparat histologi menurut Junquiera and Carneiro (2007) terdiri dari fiksasi, dehidrasi, penjernihan, infiltrasi parafin, *embedding*, *sectioning*, penempelan digelas objek serta pewarnaan.

Fiksasi untuk mencegah kerusakan jaringan Tahapan fiksasi yaitu dengan memasukkan jaringan kedalam larutan PFA 10%, kemudian direndam dalam etanol 70% selama 24 jam. Kemudian dilanjutkan dengan proses dehidrasi. Proses dehidrasi diawali dengan merendam jaringan dalam larutan etanol dengan konsentrasi beringkat mulai dari 70 % selama 24 jam, kemudian didalam etanol 80% selama 2 jam, dilanjutkan etanol 90%, sampai absolut masing-masing membutuhkan waktu 20 menit.

Tahapan selanjutnya yaitu penjernihan, dengan cara jaringan dipindahkan dari alkohol absolut kedalam larutan penjernihan yaitu xylol I (20 menit), xylol II (30 menit). Kemudian dilanjutkan dengan proses infiltrasi dilakukan dalam parafin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60°C.

Proses *embedding* dilakukan dengan mencelupkan jaringan dalam paraffin cair yang telah dituang ke dalam cetakan. Setelah beberapa saat paraffin akan memadat. Pembuatan preparat dilakukan dengan memasukkan hasil embedding pada penjepit (*block holder*). *Sectioning* diawali dengan mengatur ketebalan irisan dengan ukuran $\pm 4-5 \mu\text{m}$ dengan menggunakan mikrotom. Hasil irisan dipindahkan dengan kuas ke dalam air hangat 38-40°C untuk membuka lipatan dan meluruskan kerutan halus yang ada. Irisan yang

terentang sempurna diambil dengan gelas objek. Potongan terpilih dikeringkan dan diletakkan di atas *hot plate* 38-40 °C sampai kering. Selanjutnya preparat disimpan dalam inkubator pada suhu 38-40 °C lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE.

Pewarnaan HE dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hemaktosilin eosin. Proses pewarnaan diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol kemudian dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan memasukkan preparat kedalam alkohol bertingkat konsentrasi alkohol yang digunakan 95%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan masing-masing selama tiga menit. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dilanjutkan dengan merendam kedalam air akuades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna Hemaktosilin selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan kemudian dicuci dengan akuades selama 5 menit. Kemudian dilakukan pewarnaan dengan menggunakan Eosin selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit dan akuades selama 5 menit. Setelah sediaan diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan alkohol 70 %, 80%, 90%, dan 95% masing-masing selama beberapa detik, dan dilanjutkan dengan alkohol absolut I, II, dan III masing-masing 2 menit. Setelah itu dilanjutkan dengan proses *clearing* dengan xylol I, II, dan III selama 3 menit. Terakhir, dilakukan *mounting* (perekatan) menggunakan entellan serta ditutup menggunakan *coverglass*.

4.7 Analisa Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah perubahan kadar malondialdehida (MDA) dan perubahan struktur epitel bronkiolus pada organ paru. Perubahan kadar MDA diamati secara kuantitatif menggunakan Uji TBA sedangkan perubahan struktur epitel bronkiolus diamati secara diskriptif. Data yang diperoleh dari hasil perlakuan dianalisa dengan menggunakan Microsoft Office Exel dan SPSS untuk Windows dengan analisis ragam ANOVA dan uji lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha = 5\%$.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) pada Hewan Model Asma

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) digunakan sebagai terapi pada tikus model asma yang diperparah dengan pemaparan lipopolisakarida (LPS). Hewan model asma dibuat dengan memberikan alergen ovalbumin (OVA) 10 µg diemulsikan dengan 1,5 mg ALOH₃ dalam 200 µl PBS dan kemudian diperparah dengan pemberian lipopolisakarida (LPS) yang berasal dari bakteri *Phorphyromonas gingivalis* (*PgLPS*_{1435/1450}) dengan dosis 1 µg/ml (Utomo, 2012). Pemberian LPS secara intrasulkuler akan memperparah keadaan asma yang ditandai dengan peningkatan kadar Malondialdehida (MDA) (Dong, 2009).

Perbaikan organ paru pada penelitian ini diamati dengan pengukuran kadar Malondialdehida (MDA). Menurunnya kadar MDA merupakan salah satu penanda perbaikan organ (Redon *et al.*, 2014). Malondialdehida merupakan hasil dari peroksidasi lipid akibat rusaknya membran sel oleh radikal bebas. Malondialdehida (MDA) merupakan biomarker kerusakan sel (Kaefer *et al.*, 2012). Pengukuran kadar MDA pada organ paru tikus model asma yang telah diterapi dengan ekstrak daun Putri malu (*Mimosa pudica*) ditampilkan pada Tabel 5.1.



Tabel 5.1. Rata-rata kadar malondialdehida pada paru tikus kontrol, tikus yang diinduksi LPS dan tikus yang diterapi dengan daun putri malu

| Perlakuan | Rata-rata kadar Malondialdehida (MDA) mg/ mL | Kadar MDA(%) | |
|----------------------|--|--------------|-----------|
| | | Peningkatan | Penurunan |
| Sehat(Kontrol) | 0,478 ± 0,029 ^a | - | - |
| Sakit (Asma+ LPS) | 0,628 ± 0,010 ^c | 31,3% | - |
| Terapi 500 mg/kg BB | 0,538 ± 0,010 ^b | - | 14,3% |
| Terapi 1000 mg/Kg BB | 0,502 ± 0,023 ^{ab} | - | 20% |

Keterangan : Perbedaan notasi a, b, c menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p<0,05$) antara kelompok perlakuan. Notasi ab menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

Hasil analisa statistik menggunakan SPSS. 21 menunjukkan bahwa pemberian terapi daun putri malu pada hewan model asma, memberikan pengaruh yang nyata ($P<0,05$) terhadap kadar MDA organ paru. Data pada Tabel 5.1 menunjukkan bahwa kadar MDA pada kelompok tikus yang diterapi dengan dosis 500 mg/Kg BB ($0,538 \pm 0,010$) dan tikus yang diterapi dengan dosis 1000 mg/Kg BB ($0,502 \pm 0,023$) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok tikus sakit ($0,628 \pm 0,010$). Rata-rata kadar MDA pada kelompok tikus terapi dosis 1000 mg/Kg BB tidak memiliki perbedaan yang nyata dengan kelompok tikus sehat, hal ini dapat diartikan bahwa kelompok tikus yang diterapi dengan dosis 1000 mg/Kg BB mempunyai respon terhadap radikal bebas yang hampir sama dengan kelompok tikus sehat.

Kadar Malondialdehida pada kelompok tikus sakit (Asma+LPS) meningkat sebesar 31,3% terhadap tikus sehat (Tabel 5.1). Peningkatan kadar MDA pada tikus asma dikarenakan terdapat stres oksidatif pada hewan model,

yang diakibatkan oleh pemaparan ovalbumin sebagai alergen secara intraperitoneal dan inhalasi serta LPS secara intrasulkuler yang menyebabkan tingginya radikal bebas. Pemberian alergen secara intraperitoneal dan inhalasi dengan tujuan agar Ovalbumin segera dikenali oleh *Antigen Presenting cell* (APC) yang banyak ditemukan pada cairan intra peritoneal dan pada paru (Bratawidjaja, 2010). Lipopolisakarida yang diinjeksikan secara intrasulkuler untuk menciptakan kondisi gingivitis sehingga mampu memperparah keadaan asma (Utomo, 2012)

Pemberian LPS pada penelitian ini berasal dari bakteri *Phorphyromonas gingivalis* (*PgLPS_{1435/1450}*) yang diinjeksikan secara intrasulkuler telah terbukti mampu meningkatkan kadar MDA pada hewan model asma. Kadar MDA meningkat sebagai respon dari injeksi Lipopolisakarida pada hari ke-10 dan ke-11 dengan pemberian sebanyak 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diyakini mampu menginduksi respon imun Th2 (Esenbarth *et al*, 2002). Hal ini dapat dijelaskan bahwa lipopolisakarida yang diinjeksikan berikatan dengan *Lipopolisacharida Binding Protein* (LBP). Kompleks LBP-LPS akan menuju makrofag dan dikenali oleh reseptor CD-14 pada makrofag. Respon imun Th2 diawali dengan terikatnya LPS dengan *Toll Like-Receptor-4* (TLR-4) (Derveau *et al*, 2004). Ikatan LPS dan TLR-4 mengaktifkan sel dendrit dan sel Th2. Sel dendrit yang aktif merangsang sel Th2 untuk memproduksi sitokin berupa IL-13, IL-5 dan IL-4. Sitokin IL-4 dan IL-13 yang terlepas akan berikatan pada sel Th2 untuk menginisiasi aktivasi sel B untuk memproduksi

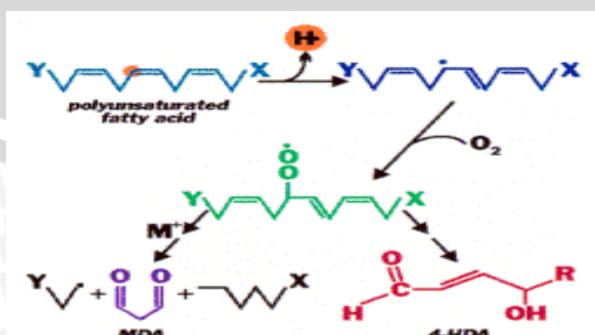
Ig-E , sedangkan sitokin IL-5 akan berikatan dengan Th2 untuk meningkatkan produksi eosinofil (Gustman, 2001; Bratawidjaja, 2010; Beumer *et al.*, 2003).

Menurut Rifa'i (2011), IgE yang berada di sirkulasi darah akan mengaktifkan sel mast. Imunoglobulin E (Ig-E) kemudian akan berikatan pada sel mast melalui receptor Fc ϵ R 1 yang terletak pada sel mast. Kompleks sel mast IgE akan memicu produksi sitokin proinflamasi yang nantinya menyebabkan terjadinya inflamasi jaringan paru dan menghasilkan radikal bebas sehingga memicu terjadinya stres oksidatif (Heater *et al.*, 2012). Stres oksidatif akan menyebabkan proses peroksidasi lipid pada membran sel sehingga terjadi kerusakan pada membran sel. Peroksidasi lipid merupakan reaksi berantai radikal bebas radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$) yang sangat reaktif dengan lipid membran, yaitu *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) sehingga terbentuk Malondialdehida (MDA), yang digunakan sebagai penanda adanya stress oksidatif (Nielsen, 1997)

Radikal bebas *Reactive oxygen species* (ROS) dihasilkan dari proses fagositosis Ovalbumin dan LPS oleh makrofag serta dihasilkan oleh sel inflamatori (Bratawidjaja, 2010). Produk dari ROS berupa Hidrogen peroksid (H_2O_2), Radikal Hidroksil ($\cdot\text{OH}$), Radikal superoksida ($\cdot\text{O}_2^-$) dan Nitrit Oksida ($\cdot\text{NO}$). Senyawa oksigen reaktif ini memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan, bersifat sangat reaktif dan terbentuk secara bebas didalam tubuh. Menurut Praptiwi (2006), senyawa oksidan reaktif juga dihasilkan dalam proses metabolisme oksidatif dalam tubuh, seperti proses oksidasi makanan menjadi energi. Radikal bebas seperti Hidrogen peroksid (H_2O_2) dihasilkan

oleh makrofag untuk membunuh mikro organisme didalam tubuh (Bratawidjaja 2010). Radikal bebas didalam tubuh dapat distabilkan oleh antioksidan endogen seperti *Superoxide Dismutase* (SOD), namun jika jumlah radikal bebas berlebih didalam tubuh menyebabkan ketidakseimbangan antara oksidan radikal bebas dengan antioksidan endogen sehingga menimbulkan stres oksidatif. Stres oksidatif ditimbulkan akibat elektron yang tidak berpasangan berusaha untuk mencapai keseimbangan dengan cara mengikat atom hidrogen pada makromolekul seperti protein, karbohidrat dan lemak. Makromolekul yang paling rentan mengalami oksidasi oleh radikal bebas adalah asam lemak tidak jenuh pada membran sel (Heater *et al.*, 2012; Yustika, 2013).

Malondialdeida terbentuk melalui proses peroksidasi lipid yang diawali dengan penghilangan atom hidrogen (H) dari molekul *Poly unsaturated fatty acid* oleh gugus radikal hidroksil (·OH), hal ini menyebabkan lipid bersifat radikal. Radikal lipid ini kemudian bereaksi dengan atom oksigen (O_2) membentuk radikal peroksil (·OO), selanjutnya menghasilkan MDA (Gambar 5.1).

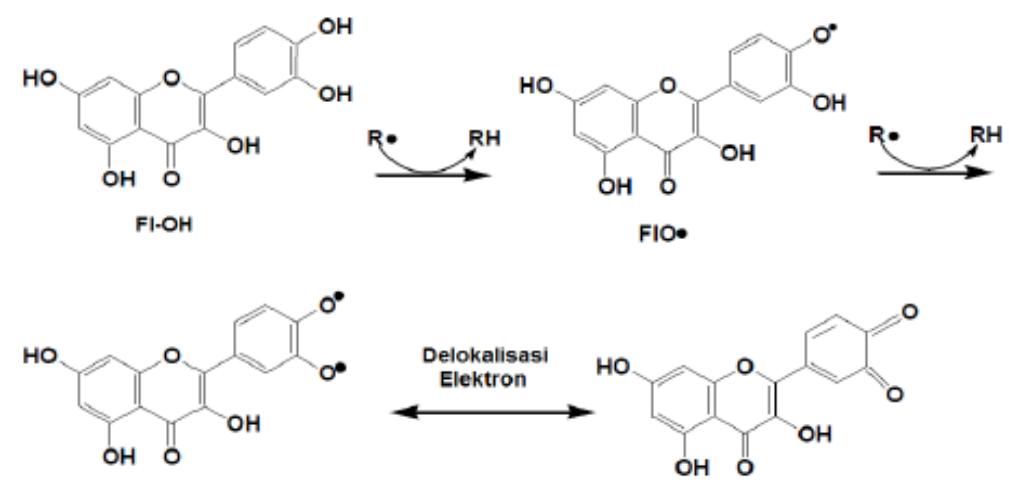


Gambar 5.1. Mekanisme Pembentukan MDA (Yustika, 2013)

Pemberian terapi daun putri malu dengan dosis 500 mg/ Kg BB mampu menurunkan kadar MDA sebesar 14,3 % dan pemberian dengan dosis 1000 mg/Kg BB menurunkan kadar MDA sebesar 20% terhadap tikus sakit. Penurunan kadar MDA dikarenakan dalam ekstrak daun putri malu mengandung flavonoid yang bertindak sebagai antioksidan yang mampu menyeimbangkan radikal bebas. Keseimbangan ini mempengaruhi stres oksidatif sehingga berpengaruh terhadap penurunan kadar MDA. Ekstrak daun putri malu yang digunakan sebagai terapi telah diidentifikasi kandungan Flavonoidnya dengan menggunakan metode LCMS (Lampiran 3). Turunan flavonoid yang berhasil teridentifikasi adalah Isorientin, Isovitenin, Orientin, Vitexin, Isoqueracetin, Quercetin dan Kaempferol. Flavonoid tersebut diduga memiliki kemampuan untuk menstabilkan radikal bebas akibat inflamasi pada saluran pernafasan sehingga mampu menurunkan kadar MDA sebesar 20 % dan 14,3%. Hasil ini diperkuat dengan penelitian Zhang *et al.*, (2011) bahwa ekstrak daun Putri malu mampu menurunkan kadar Malondialdehida dikarenakan memiliki total flavonoid dan phenolik yang tinggi, serta memiliki konsentrasi efektif (IC_{50}) sebesar 54,13 μ g/ mL (Zafar *et al.*, 2011). Kandungan flavonoid yang tinggi dalam daun Putri malu bertindak sebagai antioksidan yang mampu menyeimbangkan radikal bebas yang dihasilkan pada proses pemaparan Ovalbumin dan LPS.

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat reaksi oksidasi atau zat yang mampu menetralkan radikal bebas (Widjaya, 2003). Pemberian ovalbumin dan lipolisakarida pada penelitian ini akan

meningkatkan kadar radikal bebas didalam tubuh sehingga terjadi ketidakseimbangan antara antioksidan endogen yang menyebabkan stres oksidatif. Oleh karena itu tubuh memerlukan antioksidan eksogen untuk menyeimbangkan kadar radikal bebas didalam tubuh diantaranya menggunakan ekstrak daun putri malu.



Gambar 5.2 Reaksi *scavenging* radikal bebas oleh flavonoid (Rahmah, 2012)

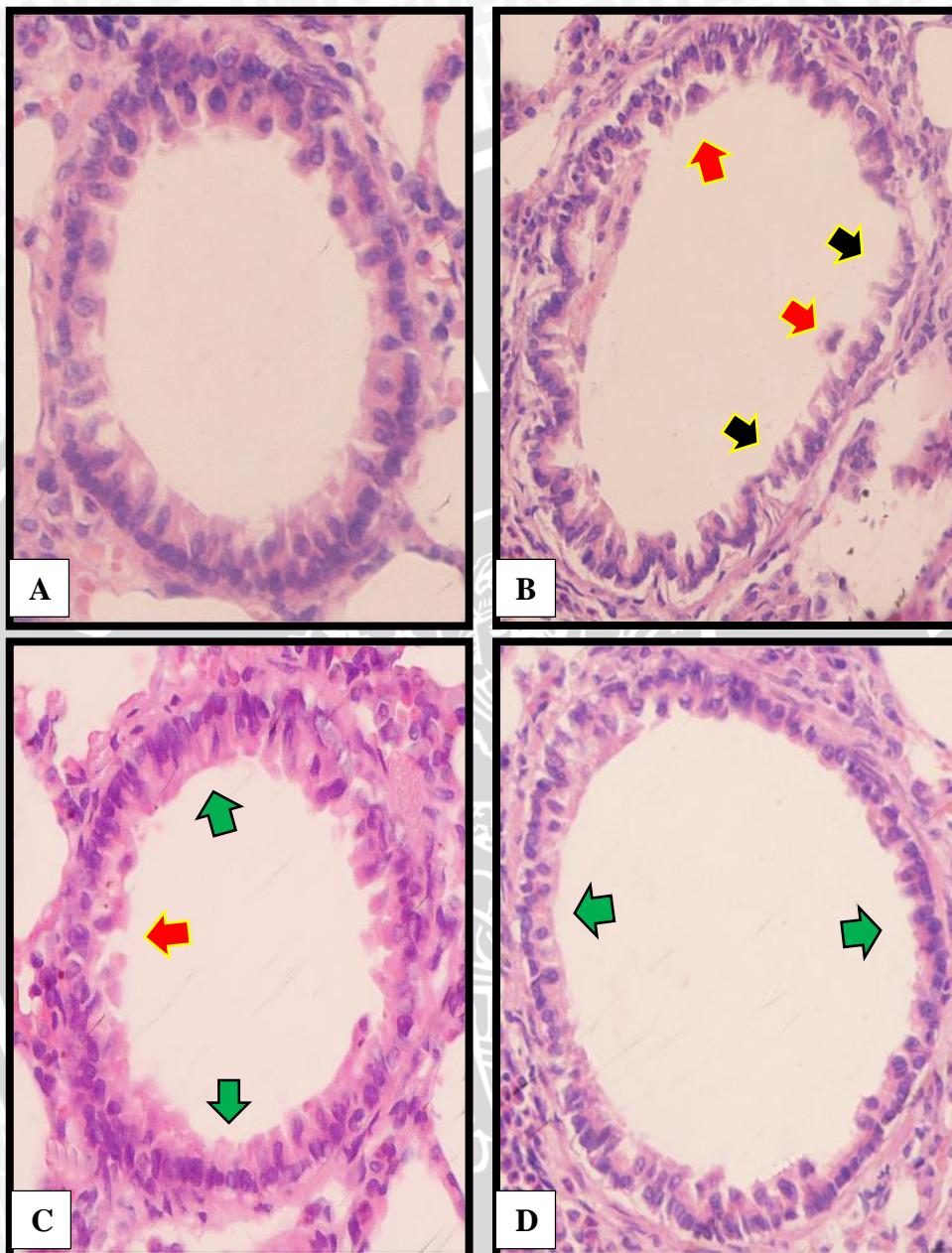
Menurut Rahmah (2012), Flavonoid mampu mendonasikan atom hidrogen (H) dari gugus hidrokil (OH) kepada radikal bebas (R·) sehingga flavonoid berubah menjadi radikal fenoksil flavonoid (FIO·). Radikal fenoksil flavonoid yang pertama terbentuk akan diserang kembali oleh radikal bebas (R·) sehingga membentuk radikal fenoksil flavonoid yang kedua (FIO·) (Gambar 5.2). Radikal fenoksil flavonoid (FIO·) memiliki ikatan rangkap terkonjugasi sehingga dapat menyeimbangkan strukturnya dengan delokalisasi elektron sehingga menghilangkan efek radikal bebas (Sofia, 2013). Hilangnya efek radikal bebas mengakibatkan penurunan stres oksidatif sehingga

kerusakan sel akibat radikal bebas dapat menurun, yang mengakibatkan penurunan kadar Malondialdehida (MDA).

5.2 Gambaran Histopatologi Epitel Bronkiolus Tikus Model Asma setelah Diterapi dengan Ekstrak Daun Putri Malu

Parameter keberhasilan suatu terapi, salah satunya dilihat melalui Gambaran histopatologinya. Secara histologi, permukaan epitel bronkiolus dilapisi oleh epitel kolumner simplek bersilia (*Columnar epithelium ciliated*) (Palmas *et al.*, 2002). Histopatologi organ paru dalam keadaan asma terdapat perubahan sel dan abnormalitas struktur karena terjadi inflamasi. Secara teori menurut Nelson (2007) asma merupakan penyakit inflamasi kronis yang terjadi pada saluran nafas sehingga menyebabkan penyempitan saluran nafas. Penyempitan saluran nafas melibatkan banyak sel inflamatori seperti eosinofil, sel mast dan limfosit T.

Gambaran histologi bronkiolus dengan pewarnaan HE (Gambar 5.3), pada kelompok tikus normal (Gambar 5.3 A) terlihat gambaran epitel kolumner simplek bersilia (*Columnar epithelium ciliated*) dan membrana basalis masih utuh. Kerusakan sel terjadi pada tikus model asma (Gambar 5.3B), pemaparan alergen dan LPS akan mengaktifkan makrofag, sel mast dan eosinofil untuk melepaskan enzim protease dan radikal bebas yang mampu merusak sel epitel bronkiolus (Bratawidjaya, 2010). Pada hewan model asma yang telah dipapar LPS telah terjadi peningkatan infiltrasi sel inflamatori sehingga menyebakan tingginya produksi radikal bebas (Takahasi, 2013).



Gambar 5.3. Gambar Histopatologi preparat paru tikus dengan pewarnaan HE (400x)

Keterangan: (A) Tikus kontrol; (B) Tikus Asma; (C) Tikus terapi dosis 500 mg/kg BB; (D) Tikus terapi dosis 1000 mg/kg BB. (Epitel lepas dari membrana basalis; (Kerusakan epitel bronkiolus; (Perbaikan epitel bronkiolus

Aktivasi makrofag oleh antigen melepaskan bahan-bahan yang bersifat oksidan reaktif seperti Hidrogen peroksida (H_2O_2), Nitrit Oksida ($\cdot NO$) dan enzim protease (Bratawidjaya, 2010). Nitrit Oksida ($\cdot NO$) yang terbentuk akan bereaksi dengan superoksida ($\cdot O_2^-$) sehingga membentuk *Peroxynitrite* ($ONOO^-$) yang merupakan molekul sitotoksik dan dapat menyebabkan kerusakan epitel serta meningkatkan jumlah sel inflamasi.

Kerusakan epitel bronkiolus dan kerusakan membrana basalis pada hewan model asma di tampilkan pada Gambar 5.3 B. Pemaparan LPS mampu menyebabkan aktifasi sel Th2, sehingga memproduksi sitokin pro inflamasi seperti IL-13, IL-5 dan IL-4. Ikatan sitokin IL-5 dengan sel Th2 mampu mengaktifkan eosinofil. Eosinofil dibantu dengan IL-4 menyebabkan migrasi limfosit T, monosit, basofil dan eosinofil ke daerah inflamasi. Semakin tinggi jumlah sel inflamasi di daerah inflamasi mengakibatkan peningkatan jumlah radikal bebas yang mampu merusak sel (Bratawidjaja, 2010)

Radikal bebas yang terbentuk mampu mengoksidasi asam lipid tidak jenuh (*Polyunsaturated fatty acid* atau PUFA) pada membran sel sehingga menghasilkan peroksidasi-lipid hidroperoksida dan produk aldehida, misalnya MDA (Sofia, 2013). Target utama radikal bebas adalah ikatan ganda karbon-karbon dari PUFA sehingga melemahkan ikatan karbon hidrogen, yang menyebabkan atom hidrogen tersebut terpisah dan terbentuklah radikal lipid peroksil. Radikal lipid peroksil ini mampu bereaksi dengan PUFA lainnya, yang secara terus menerus mampu menyebabkan kerusakan epitel bronkiolus.

Teraktivasinya eosinofil pada hewan model asma mampu menyebabkan keparahan asma dengan menghasilkan molekul radikal bebas dan enzim proteolitik berupa *Major Basic Protein* dan *Eosinophil Cationic Protein* (Buse and Lemanske, 2001). Enzim proteolitik yang terbentuk akan berinteraksi melalui reseptor *protease activated receptor* (PAR). Fungsi PAR yaitu merespon adanya pelepasan protease yang terdistribusi pada sel saluran pernafasan (Peters and Henry, 2009). Interaksi antara protease dan reseptornya memungkinkan menyebabkan keparahan rusaknya sel epitel bronkiolus paru, hal ini sesuai dengan penelitian Fujiwara *et al.*, (2013) yaitu enzim proteolitik yang dihasilkan mampu merusak sel epitel bronkiolus, seperti terlepasnya epitel dari membrana basalis.

Rusaknya epitel bronkiolus pada Gambar 5.3 B disebabkan adanya proses proteolitik protease terhadap sel epitel bronkiolus melalui dua jalur yang berbeda, jalur 1 melalui respon langsung protease yang berikatan dengan reseptor PAR (*Protease Activated Receptor*) dan jalur 2 melalui sel dendrit yang mengaktifkan sel TH-2. Sel TH-2 yang aktif, merangsang sel B untuk memproduksi IgE. Molekul IgE yang dilepas diikat oleh reseptor Fc ϵ R 1 pada sel mast. Aktifasi sel mast mampu menyebabkan keluarnya enzim proteolitik. Pelepasan enzim proteolitik menyebabkan membrana basalis tidak mampu menyokong sel epitel sehingga terjadi pengelupasan sel dan pelepasan silia epitel bronkiolus (Caughey, 2011).

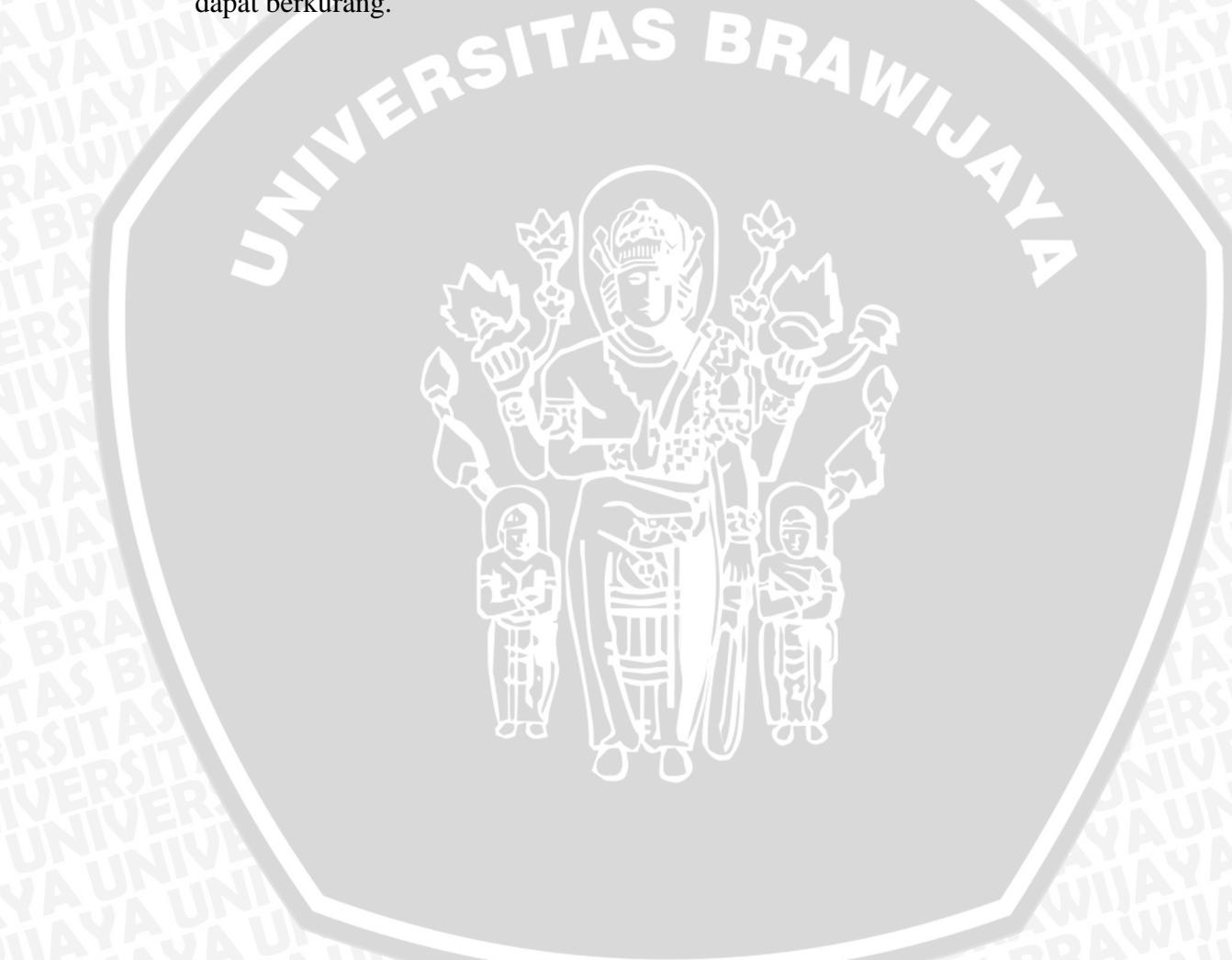
Gambaran histopatologi paru tikus yang mendapatkan terapi daun putri malu dengan dosis 500 mg/Kg BB menunjukkan bahwa terdapat penurunan

kerusakan sel epitel bronkiolus (Gambar 5.3 C). Penurunan di tunjukkan dengan membrana basalis masih utuh namun masih terdapat sedikit kerusakan sel epitel yang ditandai dengan terlepasnya sel dari membrana basalis. Tingkat kerusakan sel yang terjadi pada Gambar 5.3. C lebih ringan dibandingkan dengan Gambar 5.3 B. Penurunan kerusakan diakibatkan kandungan flavonoid pada daun putri malu mapu mendonasikan atom hidrogen dari gugus hidroksil (-OH) kepada radikal bebas (R[·]) sehingga merubah flavonoid menjadi radikal fenoksil flavonoid (FIO[·]) yang memiliki elektron lebih stabil (Rahmah, 2012). Pemberian dengan dosis 500 mg/kg BB belum mampu menyeimbangkan jumlah radikal bebas didalam tubuh sehingga masih menimbulkan kerusakan sel.

Pemberian terapi dengan menggunakan dosis 1000 mg/Kg BB pada tikus model asma memberikan perbaikan gambaran histopatologi organ paru yang ditandai dengan utuhnya membrana basalis dan tidak ditemukan pelepasan sel epitel dari membrana basalis. Perbaikan itu dikarenakan flavonoid dalam ekstrak daun putri malu mampu meningkatkan kemampuan enzim *Superoksid Dismutase* (SOD) untuk menyeimbangkan radikal bebas. Peningkatan aktivitas SOD dan radikal fenoksil flavonoid (FIO[·]) akan menyeimbangkan radikal bebas sehingga kerusakan sel akibat radikal bebas juga berkurang. Menurut Takahasi dan Tanaka (2013) flavonoid mampu menghambat aktivasi IL-4 dan IL-13 yang dikeluarkan oleh sel Th2. Sel Th2 yang tidak berikatan dengan IL-13 dan IL-4 mengakibatkan Ig-E tidak dihasilkan oleh sel B sehingga sel mast tidak aktif. Tidak teraktivasinya sel

mast menurunkan radikal bebas sehingga memperbaiki organ paru tikus asma.

Berdasarkan penelitian Kashiwabara dan Asano (2013), flavonoid yang diberikan pada hewan model asma dapat menghambat aktivasi IL-5 sehingga jumlah eosinofil akan berkurang. Berkurangnya jumlah eosinofil memberikan pengaruh terhadap rendahnya jumlah enzim proteolitik sehingga kerusakan sel dapat berkurang.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian ekstrak daun Putri malu (*Mimosa pudica*) pada tikus model asma dengan dosis 500 dan 1000 mg/Kg BB menurunkan kadar MDA sebesar 14,3% dan 20%.
2. Pemberian ekstrak daun Putri malu (*Mimosa pudica*) pada tikus model asma memperbaiki gambaran histopatologi sel epitel bronkiolus.

6.2 Saran

Diperlukan kajian lebih lanjut kandungan bioaktif yang berpotensi untuk terapi asma pada *pet animal*.



DAFTAR PUSTAKA

- Abrahim, N.N., M.S. Kanthimathi and A.B. Aziz. 2012. *Piper betle* show atioxidant activities inhibits MCF-7 cell Proliferation increase activities of catalase and superoxide dismutase. *Complementary and Alternative medicine (BMC)*;12:220
- Allaker, R.P., D.R. Rosaryo, K.A. Young and J.M. Hardie. 1997. Prevalence of *Phorphyromonas* and *Prevotella species* in the dental plaque of dog. Departement of Oral Microbiology, St. Bartholomew's, London (Abstr): 140
- Amin, M.H.F, A.P.W. Marhendra, dan Aulanni'am. 2009. Pengaruh Paparan *Lipopolisakarida* pada Rongga Mulut dan Assisted Drainage Therapy (Adt) terhadap Kadar S-Ige dan Profil Radikal Bebas Pada Tikus Asma .Hal:437-443
- Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus*. Animal Diversity Web Online.at: //animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rattus_norvegicus/. [05 September 2013].
- Azmi, L, M.K. Singh and A.K Akhtar. 2011. Pharmakological and biological overview on *Mimosa pudica* Linn. *International Journal of Pharm*, (2)11:1226-1234
- Barlianto, W, S.C.K, Mohammad, K. Setyawati, dan M. Karyono. Pengembangan Model Mencit Alergi dengan Paparan Kronik Ovalbumin. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 2(15):2-5
- Barnes, P.J, Djukanovic, and S.T. Holgate. 2003. *Pathogenesis of asthma*. In: Gibson, G.J., D.M. Geddes., U. Costabel., P. Sterk., B. Corrin (eds.)
- Bekow, C.A and V. Baumans. 2003. *Common Non Surgical Techniques and Procedures*. In Hau J and Van Housier GL, editors Handbook of Laboratory Animal Science. CRC Press. 351-390.
- Beumer, C, W. Marty, R.Willem, R. Danielle, and B. Ruud. 2003, Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, A Novel Therapeutic Drug For *Lipopolysaccharide (Lps)* Mediated Diseases, Atteanuates Lps Toxicity In Mice And Piglets, *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 307(2):737-744.
- Bizaliel, E. 2011. Pemberian Ekstrak Metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Kadar Malondialdegid (MDA) Pada Kolon Tikus Wistar Yang Diinduksi DMBA (7,12 Dimethylbenz A Anthracene. Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang



- Bulan, M.S dan P. Adi. 2012. The level of SGOT and SGPT After Consuming *Mimosa pudica* Leave Boiled on Carbon Tetra Chloride Induced in Wistar Strain. PSPD, (Abstr):1
- Busse, W.W. and R.F. Lemanske. 2001. Asthma. *The New England Journal of Med* 344(5) : 350-362.
- Brand, W, W. Cuvelier, and M.E. Berset. 1995. *Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity*. LWT-Food Sci. Technol.28:25-30
- Bratawidjaja, K.G dan I, Rengganis. 2010. *Imunologi Dasar*.Fakultas Kedoteran, Unineversitas Indonesia, Jakarta.
- Caughey, G.H. 2011. Mast cell Protease As Protective and Inflammatory Mediators. *Med Biol*,716:212-234
- Danusantoso, H. 2003. Peran radikal bebas terhadap beberapa penyakit paru. *Jurnal Kedoteran Trisakti*, 1(22):31-36
- Djamil, R. 1998. Latihan Olah Raga dan Radikal Bebas Simposium : *Radikal Bebas dan Penyakit Degeneratif*. Universitas Andalas
- Dong, L., H, Li., S, Wang and Y, Li. 2009. Different Dose of *Lipopolysaccharides* regulate the lung Inflammation of Asthmatic Mice via TLR-4 Pathway in Alveolar Macrophages. *J Asthma*.2009. Apr;46(3):229-33.
- Edgar, J.D.M. 2006. Master medicine: *Imunology*. New york: Elsevier Churchill Livingstone.
- Elango. V, C. Oliver and P.S. Raghu. 2012. Antiulcer of te Leaf Ethanolic Extract of *Mimosa Pudica* in Rat. *Journal Drug and Medicine*,4(1): 34-40
- Epstein, M.M. 2004. Do Mouse Models of Allergic Asthma Mimic Clinical Disease?. *Int. Arch. Allergy Immunol.*133, 84-100
- Eric, D Beatman. (2010). *Global Initiative for Asthma*. Diperoleh tanggal 09 Agustus 2013 dari www.ginasthma.org/uploads/users/files/GINA_Report_2011.pdf.
- Fitriyani, A., L. Winarti., S. Muslichah dan Nuri. 2011. Uji Antiinflamasi Ekstrak Metanol Daun Sirih (*Piper Crocatum*) Pada Tkus Putih. *Majalah Obat Tradisional*, 16 (1), 34-42
- Foster, S.F, G.S. Allan, P, Martin, and I.D. Robertson. 2004. Twenty five asthma syndrom (1995-2000). *Journal of offline medical and surgery*, 6(3):181-188

- Friskawati, I. 2001. Daya Kerja Anti Bakterial Lipopolisaarida (LPS) Asal Bakteri *Vibrio harveyi* Terhadap Bakteri Lingkungan . Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Indonesia
- Fujiwara, A, K. Tushima, S. Sugiyama, K. Yamaguchi and Y. Setoguchi. 2013. *Histological types and localization of lung cancers in patient with combined pulmonary fibrosis and Emphysema*. Departemnet of Pulmonary Medicine, Tokyo Medical University, Tokyo, Japan
- Ghani, A. 2003. *Medicinal plants of Bangladesh*, 2nd Ed; The Asiatic Society of Bngladesh, Dhaka. Pp-302303.
- Gunawan, G., Sulistia, S. Rianto, Nafrialdi dan Elysabeth .2007. *Farmakologi dan Terapi*. Departemen Farmakologi dan Terapeutik. FK UI :Jakarta
- Halliwell, B and J.M.C. Gutteridge. 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. Fourth edition. New York. Oxford University Press.
- Halliwell. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine 3rd Edition. Inggris: Oxford University Press. Hal. 200 – 219, 225 – 231, 246, 336, 625-627.
- Hamilton, W. 1998. The Mammals of Eastern United States, 3rd edition. Ithaca, NY: Comstock Publishing.
- Handa, S.S., Khanuja, S.P.S. Longo and Rakesh, D.V.2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*.International Centre For Science And High Technology
- Haq, A.S. 2009. *Pengaruh Ekstrak Herba Putri malu (*Mimosa pudica*) terhadap efek sedasi pada mencit balb/C*. Laporan hasil penelitian karya tulis Ilmiah. FK UNDIP :Semarang
- Heater, J.B, H.K. Anthony and H.J. Gould. 2012. Cytokinergic Ig E Action in Mast Cell Activation. *Front Immunol*,2012;3:229.
- Hirst, R.G. 1988. *Bacteria Antigen*. In : Burgess, G. (Ed) Elisa Technology in Diagnosis and Research. JCU. Townsville. P:197-213
- Huntingeston, J.A and P.E. Stein. 2001. Structure and Properties of *Ovalbumin*. *Journal of Chromatografy*, B756 (1-2):189-198
- Iman, E.R.S, R. Ratih, E.N. Hasutji, Suryani dan T. Wiwiek. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Veteriner I*. Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair (AUP) :Surabaya
- Iris. (2008). *Asma Bronkial*. Diperoleh tanggal 09 Agustus 2012 dari www.docstoc.com Medical Record RSUD Arifin Achmad Pekanbaru. 2012. *Prevalensi penderita Asma di Poliklinik Paru dan Ruang Nuri 2*



- RSUD Arifin Achmad Pekanbaru.* Pekanbaru: RSUD Arifin Achmad Pekanbaru.
- Jenova, R. 2009. *Uji Toksisitas Akut yang Diukur dengan Penentuan LD50 Ekstrak Herba Putrimalu (Mimosa pudica) Trhadap Mncit Balb/C.* Fakultas kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang
- Johnson, J.R, R.E. Wiley, R. Fattouh and F.K. Swirski. 2004. Countinous exposure to house dust mite elicitis chronic airway inflamation and structural remodelling. *Am. J.Respir. Crit. Care Med.* 169:378-385
- Junqueira, L.C and J. Carneiro. 2004. *Basic Histology Text and Atlas.* McGraw-Hill Education, New york city, US
- Kaefer, M, D.J.A. Carvalho, S.J. Piva, A.M. Becker, C.L. Hermes, and R, Tonello. 2012. Plasma Malondialdehidae Level and Risk Factor For Development of Chronic Complications in Type 2 Diabetic Patients on Insulin Therapy. *Clin Lab.* 2012;58(9-10):973-8
- Karthikeyan, M., and M.K, Deepa. 2009. Antinociceptive Activity of *Mimosa Pudica*. *Indian Journal of pharmacology* ,7(3):2009
- Kashiwabara, M.S., and K. Kasano. 2013. Inhibitory Action of Quercetin on Eosinophil Activation in Vitro. *Evid Based Complement Alternative Med*,doi :10.11155/2013/12705
- Kasmira, J.G., and A.L. Mayuri.2011. A Comprehensive Review on *Mimosa pudica*: Potential Herbal Panaceae. *Journal of Biologically Active Products From Nature* 1(5);285-292
- Kumar, R.K, C. Harbet and P.S. Foster .2008. The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr Drug Targets* 9:485-94.
- Kusriningrum.2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap.*Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.Surabaya
- Kurniawati, A. 2005. Uji Aktivitas Anti Inflamasi Ekstrak Metanol *Graptophyllum griff* pada Tikus Putih. *Majalah Kedokteran Gigi Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional IV*, 11-13Agustus 2005: 167-170.
- Locke, N.R, S.G. Royce, J.S. Wainewright and M.L. Tang. Comparison of airway remodeling ini acute, subacute, and chronic models of allergic airways disease. *Am Jrespir Cell Mol Biol.*2007;3278:193-201
- Malole, M.B.M dan C.S.U. Pramono. 1989. *Penggunaan Hewan-Hewan Percobaan di Laboratorium.* Bogor : Pusat antar Universitas Bioteknologi IPB Medicine 344(5) : 350-362

- Middleton. 2000. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev* 52:673–751, Vol. 52, No. 4
- Murphy, K.J, A.K. Chronopolous, and I. Sigh. 2003. Dietary Flavonol from cocoa (*Theobroma cacao*) Inhibit Platelet Function. *America Journal of Clinical Nutrition.* 77(6):1466-1473
- Nadeem, A, S.K. Chhabra, A. Masood, and H.G. Raj. 2003. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidant in asthma. *J Allergy Clin Immunol* (I) Volume 111
- Nelson, F.I, C.L.L. Linnemannn, and N.H. Weldon. 2007. Sub Lingual Imunoterapy for Respiratory allergic. *J. Allergy Clin Immunol.* 2007.117:1021-35
- Nials, A.T, and S, Udin. 2008. Tikus model asma alergi: akut dan kronis tantangan alergen. *Dis Model Mech,* 1:213-20.
- Nielsen, F, B.B. Mikkelsen, H.R. Andersen, and P, Grandjean. 1997, Plasma Malondialdehyde as Bomarker for Oxidative stress : Reference Interval and Effect of Life-style Factor. *Clin Chem, Jul* 43(7):1209-14
- Notoatmojo, S. 2002. *Metodologi Penelitian Kesehatan.* Jakarta: PT.Rineka Cipta, hal 165-167.
- Palmas, E., N.J, Vanacer., R.A, auwels and J.C, Kips.2002. Effect of age on Allergen induced Structural Air way Changes in *Brown Norway Rats.* *Am J Respir Crit Care Med Vol* 165:1280-1284
- Peters, T., and P.J, Henry.2009. Protease Activated Receptors and Prostaglandins in Inflammatory Lung disease. *British Journal Of Pharmacology;* 158(4):1017-1033
- Pham-Huy, L.A.P, H, He., and Pham-Huy, C. 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci* 4: 89-96.
- Praptiwi, P, D.M. Harapini. 2006. Nilai Peroksida dan Anti Radikal Bebas dyphenyl pycryl Hydrazil hidrate DPPH ekstrak Metanol Knema Laurena. *Majalah Farmasi Indonesia,* (17)1: 32-36
- Purnomo.2008. Faktor-Faktor Risiko yang Berpengaruh Terhadap Kejadian Asma Bronkial pada Anak. [Tesis]. Program pasca sarjana univ. Diponegoro: Semarang
- Rahmah, N.L., 2012, The Potency of *Sargassum duplicatum* Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in *Rattus norvegicus*, *Journal of Life Sciences* 6, pp. 144-154

- Rajendran, R, S. Hemalatha, K. Akasakalai and R.M. Sundaran.2010. Hepatoprotective activity of *Mimosa Pudica* Leave extract againts *Carbontetracloride* Induced Toxycity. *Jurnal of Natural Product*, (2);116-122
- Redon, J, O.R. Maria, T. Carmen, G. Vicente, and I. Antonio. 2014. *Antioxidant Activities and Oxidative Stress By Products in Human Hypertension*. Departement of Biochemistry and Molecular Biology and Physiology, The medical School, Valencia, Spain.
- Rifa'i, M. 2011. *Alergy and Hipersensitisif*. Diktat Konsep Alergi dan Hipersensitif. Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya
- Sarpong, S.B., L. Zhang., and S.R. Kleeberger. 2003. A novel mouse model of experimental Asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 132-354
- Sharma, A, S. Bansal, and R.K. Nagpal. 2003. Lipid Peroxidation in Bronchial Asthma. *Indian Journal of Pediatrics* 70(9) : 715717
- Sofia, V, Aulanni'am dan C, Mahdi .2013. Studi Pemberian Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum Prismaticum*) Terhadap Kadar Malondialdehida dan Gambaran Histologi Jaringan Ginjalpada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Diabetes Melitus Tipe 1. *Kimia Student Journal* 1(1);119-125
- Stephanie, C., Eisenbarth., A. Damani., Piggott., W. James., Huleatt., Irene Visintin ,Christina A. Herrick, and Kim Bottomly. 2002. *Lipopolysaccharide-Enhanced, Toll-Like Receptor 4-Dependent T Helper Cell Type 2 Responses To Inhaled Antigen*. Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06520
- Suckow, M.A., H, Steven., and C.L, Frangklin. 2006. *The Laboratory Rat Second Edition*. A volume in American Coolege of Laboratory Animal Medicine. Academic Press.
- Suwandi, T. 2012. *Pemebrian Ekstrak Kelopak Bunga Rosela Menurunkan Malondialdhida Pada Tikus Yang diberi Minyak Jelantah* [Tesis]. Program Magister. Program Studi Ilmu Biomedik. Program Pascasarjana. Universitas Udayana : Denpasar
- Takashi, R and Tanaka, T. 2013. *Flavonoid and Asthma*. US national Library of Medicine, National Institut of Health. Jun 2013;5(6):2128-2143
- Tang, M.L.K, J.W. Wilson, and A.G. Stewert. 2006 Airway remodeling in Asthma: Current Understanding and Implication For future therapies. *Pharmacology & Therapeutic*, 112: 474488

- Temelkovski, J., Hogan, S.P., Shepherd, D.P., and Foster, P.S. An Improved Murine Model of Asthma: selective airway inflammation, epithelial lesion and increase methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. *Thorax*. 198;53:849-56
- Terr. A.I. 1987. Allergic disease. In: Stites D.P, Stobo J.D, Well. J.V (eds) *Basic and clinical Immunology 6th ed.* Norwalk, Connecticut, Appleton & Lange ;435-456
- Utomo, H. 2012. Rapid Relief Mechanism of Allergic Rhinosinusitis after "Assisted Drainage" Therapy. *Journal of Dentistry Indonesia*, 19(3); 57-64
- Vaidyaratnam, P.S. 2001. *Indian Medical Plants database 1st ed*, vol. II, Orient Logman, Arya Vidyashala Kottakkal, pp 36-37
- Vinothapooshan, G and K. Sundar.2010. Antiulcer activity of *Mimosa pudica* leaves against gastric ulcers in rats. *RJPBCS* 2010; 1 (4): 606-614.
- Wagner, J.G, and J.R. Harkerman. Animal model of Alergic Rhinitis: Relevantion with human photofisiology. *Curr Asthma alergy Rep* 7:134-40, 2007.
- Widodo, M. A. 1995, *Efek Pemicu Radikal Bebas Dan Vitamin E Pada Diabetes Bagian ilmu penyakit dalam fakultas kedokteran Komplikasi Pembuluh Darah Tikus Diabetes*. Laporan Penelitian Hibah Bersaing Tahun 1992-1995, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Widjaya, C.H.2003. Peran antioksidan terhadap Kesehatan Tubuh. *Healthy Choice*, Edisi IV.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan alami dan Radikal Bebas*. Kasinumedia:Yogyakarta
- Winarsih, Siswanto, dan M. Puspitasari. 2011. Uji Antimikroba Ekstrak Daun dan Alar Putri Malu (*Mimosa pudica Linn*) terhadap *Pseudomonas Aeruginosa* secara In Vitro. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, 1-8
- Wood, L.G, P.G.Gibson, and M.L. Garg. 2003. Biomarkers of Lipid Peroxidation, Airway Inflammation and Asthma. *European Respiratory Journal* 21: 177–186
- Yustika, A.R, Aulanni'am, dan S, Prasetyawan. 2013. Kadar Malondialdehida (MDA) dan Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvrgicus*) Pasca Induksi *Cylosporine-A*. *Kimia Student Journal*,1(2):222-228
- Zafar, Z, M.S. Talkad, and M. Sinha. 2011. Antioxidant Activity of five Selective Medical Plants. *African Journal of Scientific Research* 2(1): 127-147

Zang, J., Keyuan, W.L. Zhou., J. Zhou., and Ping-Yang. 2011. Studies on the active components and antioxidant active of the extract *Mimosa pudica*. Shouthern China. Vol Jan-Mar; 7(25):35-39

Zosky, G.R., A.N. LarcombE, O.J. White, J.T. Burchell, and D.J. Turner. 2007. Ovalbumin sensitised rat are good model for airway hyperresponsiveness. Clinical and Experimental Allergy. 38:829-838. *Journal of Immunology* 179:5748-5749

Zuhra, C.F., J.Br. Taringan dan H. Sihotang. 2008. Aktivitas antioksidan senyawa flavonoid dari daun Katuk. *Jurnal Biologi Sumatera*, januari 2008, hlm 7-10



LAMPIRAN

Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik

| | |
|--|---|
|  | |
| <p>KOMISI ETIK PENELITIAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA</p> | |
| <p>KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARENCE"</p> | |
| <p>No: 208-KEP-UB</p> | |
| <p>KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE) UNIVERSITAS BRAWIJAYA</p> | |
| <p>TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAWAH:</p> | |
| PENELITIAN BERJUDUL | : PENGARUH TERAPI EKSTRAK DAUN PUTRI MALU (<i>Mimosa pudica</i>) BERDASARKAN PADA PENGUKURAN KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA) SERTA GAMBARAN HISTOPATOLOGI EPITEL BRONKIOLUS TIKUS (<i>Rattus norvegicus</i>) MODEL ASMA |
| PENELITI | : RIZY AHMADA |
| UNIT/LEMBAGA/TEMPAT | : UNIVERSITAS BRAWIJAYA |
| DINYATAKAN | : LAIK ETIK |
| <p>Malang, 3 Maret 2014 Ketua Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya</p> | |
|  <p>Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES. NIP. 19600903 198802 2 001</p> | |

Lampiran 2. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman



**LABORATORIUM TAKSONOMI, STRUKTUR DAN
PERKEMBANGAN TUMBUHAN**
JURUSAN BIOLOGI, FAKULTAS MIPA
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
JALAN VETERAN, MALANG 65145
Telepon/faks: 0341-575841

KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0102/Takso.Identifikasi/03/2013

Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

| | | |
|----------|---|---|
| Nama | : | Rizy Ahmada (NIM. 105130101111075) Anita Wanda S (NIM. 105130101111063) Nisa Mufidah (NIM. 105130101111062) Adekhantari Y (NIM. 105130101111064) Yehuda Laksana A (NIM. 105130101111101) Hadlrotus Okvianty M P (NIM. 105130107111013) |
| Instansi | : | Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya |

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume I, halaman 561, diidentifikasi sebagai:

| | | |
|---------|---|-------------------------|
| Familia | : | Fabaceae |
| Genus | : | Mimosa |
| Species | : | Mimosa pudica L. |

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 26 Agustus 2013

Kepala Laboratorium
Taksonomi, Struktur dan
Perkembangan Tumbuhan,

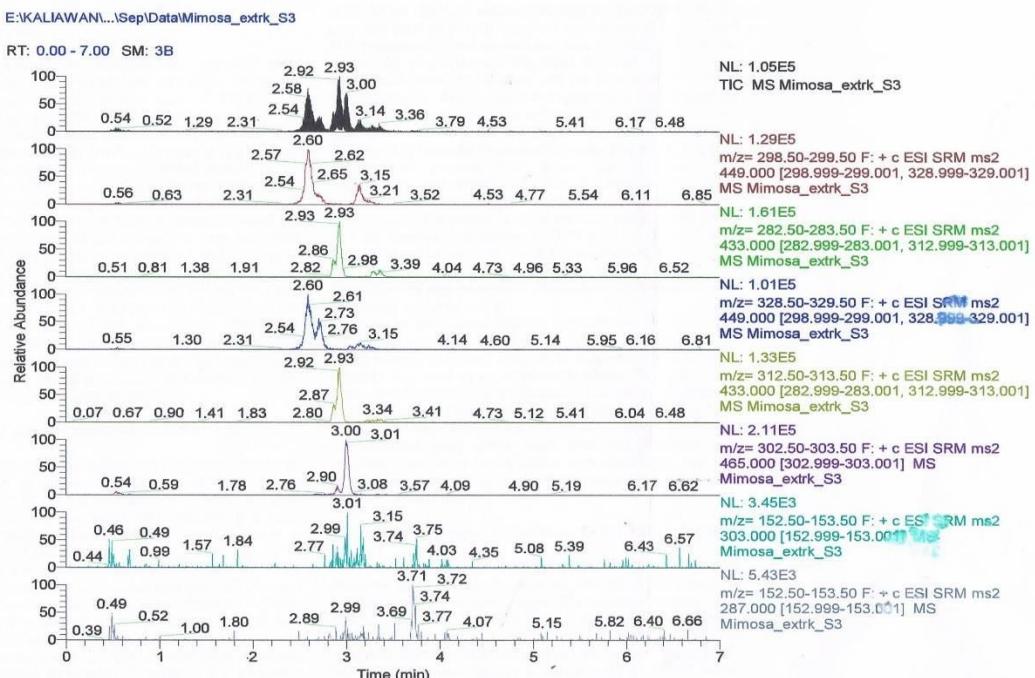

Dr. Serafinah Indriyani, M.Si.
NIP. 1988022001



Lampiran 3. Hasil Uji LCMS

Uji ini Untuk Mengetahui Adanya Flavonoid didalam Ekstrak Air

daun Putri malu (*Mimosa pudoca*)



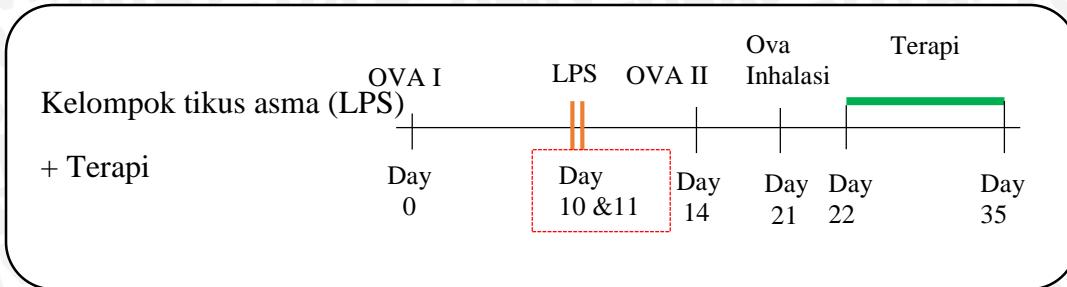
Pada Uji LCMS telah diketahui bahwa ekstrak air daun putri malu yang digunakan sebagai terapi terdapat kandungan flavonoid didalamnya. Beberapa turunan Flavonoid yang berhasil teridentifikasi berdasarkan berat molekulnya adalah :

- 1) Isoorientin : Molar mass 299 g/mol
- 2) Isoviteinx : Molar mass 283 g/mol
- 3) Orientin : Molar mass 329 g/mol
- 4) Vitexin : Molar mass 313 g/mol
- 5) Isoquercetin : Molar mass 303 g/mol
- 6) Quercetin : Molar mass 153 g/mol
- 7) Kaempferol : Molar mass 153 g/mol



Lampiran 4. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian

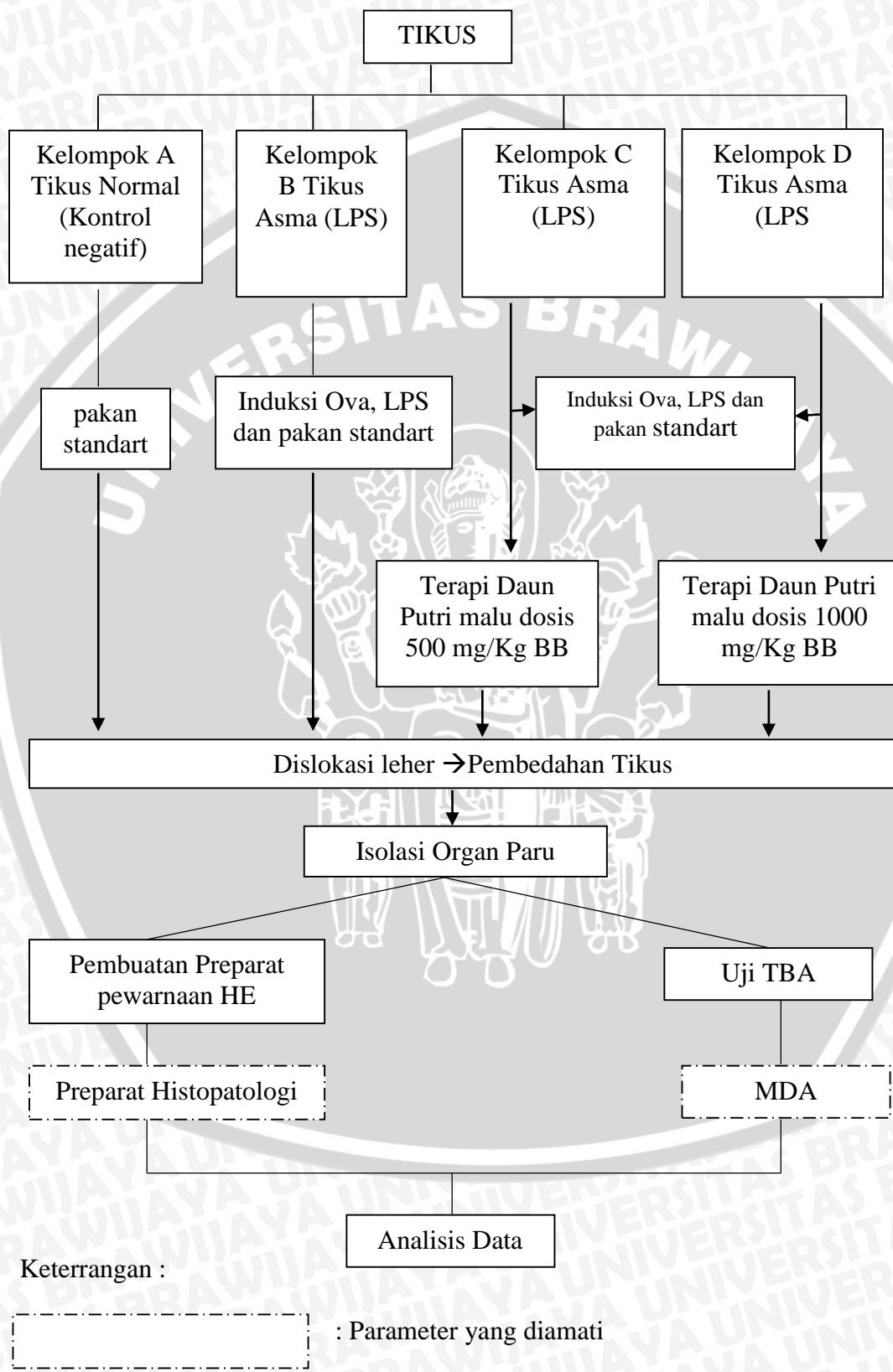
A. Rancangan Perlakuan



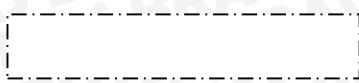
Keterangan

1. Injeksi OVA I, OVA II dan OVA III dilakukan secara intraperitoneal dengan dosis $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ dengan ajuvan AlOH_3 dalam larutan PBS
2. Injeksi LPS dilakukan secara intrasulkuler di sulkus ginggiva tikus dengan dosis $1 \mu\text{g}/\text{ml}$
3. Inhalasi OVA dilakukan dengan nebulasi OVA dalam larutan NaCl steril dengan dosis $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ selama 20 menit
4. Pada hari ke-21 untuk tikus kontrol sakit, 30 menit setelah inhalasi OVA, dilakukan pembedahan pada tikus untuk mengisolasi organ paru yang digunakan untuk pengukuran kadar MDA dengan uji TBA dan pembuatan preparat histopat paru dengan pewarnaan HE
5. Pada kelompok tikus C dan D pada hari ke-22 sampai hari ke- 35 dilakukan terapi dengan dosis $500 \text{ mg}/\text{Kg BB}$ dan $1000 \text{ mg}/\text{Kg BB}$

B. Kerangka Operasional



Keterrangan :



: Parameter yang diamati

Lampiran 5. Perhitungan Dosis

Dosis experimental ditentukan berdasarkan penelitian Rajendran, 2010.

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 500 mg/Kg BB dan 1000 mg/Kg BB, hal ini dikarenakan dosis yang sering dipakai dalam penelitian menggunakan ekstrak daun putri malu antara 200 mg/Kg BB sampai 2000 mg/Kg BB. Pemberian dosis lebih dari 2000 mg/Kg BB diduga merupakan dosis yang toksik.

Kelompok C (Dosis terapi = 500 mg/kg BB)

Perhitungan untuk dosis 500 mg/Kg BB

Diketahui :

- Rata-rata berat badan tikus adalah 200 g,

$$\text{Dihitung : } \frac{200}{1000} \text{ kg} \times 500 \text{ mg/kg}$$

$$= 100 \text{ mg berat kering daun putri malu/ ekor tikus}$$

Perhitungan berat kering daun putri malu untuk satu kelompok perlakuan terapi 500 mg/Kg BB

Diketahui :

- Banyaknya daun putri malu yang dibutuhkan per ekor adalah 100 mg
- Jumlah kelompok terapi 500 mg/Kg BB adalah 5 ekor

Dihitung :

Berat kering daun putri malu = jumlah pemberian/ekor x jumlah tikus

$$= 100 \text{ mg} \times 5$$

$$= 500 \text{ mg/ 5 ekor tikus}$$



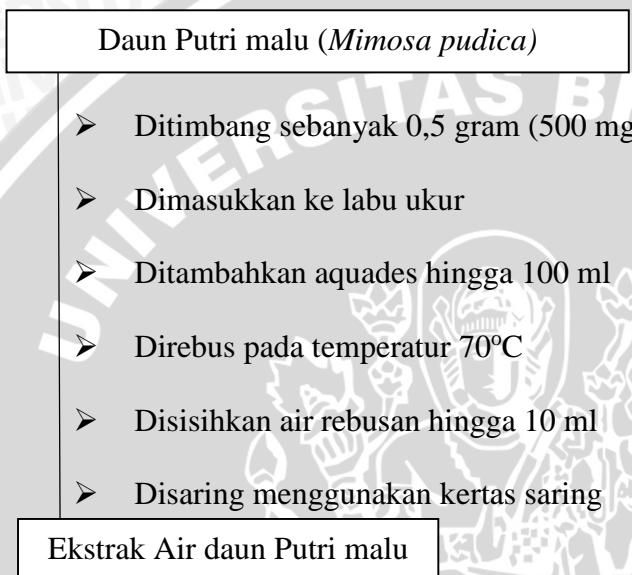
Perhitungan = 500 mg --- 100 ml \rightarrow 500 mg/ 10 ml

100 mg/ 2 ml

Dosis terapi = 500 mg, untuk tikus berat 200 gr = 100 mg/ekor tikus

Volume pemberian 2 ml/ekor tikus.

Diagram :



Kelompok D (Dosis terapi = 1000 mg/kg BB)

Perhitungan untuk dosis 1000 mg/Kg BB

Diketahui :

- Rata-rata berat badan tikus adalah 200 g,

$$\text{Dihitung : } \frac{200}{1000} \text{ kg} \times 1000 \text{ mg/kg}$$

$$= 200 \text{ mg berat kering daun putri malu/ ekor tikus}$$

Perhitungan berat kering daun putri malu untuk satu kelompok perlakuan terapi

1000 mg/Kg BB



Diketahui :

- Banyaknya daun putri malu yang dibutuhkan per ekor adalah 200 mg
- Jumlah kelompok terapi 1000 mg/Kg BB adalah 5 ekor

Dihitung :

$$\text{Berat kering daun putri malu} = \text{jumlah pemberian/ekor} \times \text{jumlah tikus}$$

$$= 200 \text{ mg} \times 5$$

$$= 1000 \text{ mg/ 5 ekor tikus}$$

$$\text{Perhitungan} = 1000 \text{ mg --- 100 ml} \rightarrow 1000 \text{ mg/ 10 ml}$$

$$200 \text{ mg/ 2 ml}$$

$$\text{Dosis terapi} = 1000 \text{ mg, untuk tikus berat 200 gr} = 200 \text{ mg/ekor tikus}$$

Volume pemberian 2 ml/ ekor tikus

Diagram :

Daun Putri malu (*Mimosa pudica*) Kering

- Ditimbang sebanyak 1 gram (1000 mg)
- Dimasukkan ke labu ukur
- Ditambahkan aquades hingga 100 ml
- Direbus pada temperatur 70°C
- Disisihkan air rebusan hingga 10 ml
- Disaring menggunakan kertas saring

Ekstrak Air Daun Putri malu

Lampiran 6. Komposisi Larutan

Tabel L6.1 Komposisi Larutan

| No | Larutan | Bahan-Bahan |
|----|------------------------------|--|
| 1 | 100 ml NaCl fisiologis 0,9 % | 4,5 gram garam NaCl Akuades |
| 2 | PBS pH 7,4 | 0,2 gram KCl 0,2 gram KH ₂ PO ₄ 8 gram NaCl 2,16 gram Na ₂ HPo ₄ . H ₂ O |
| 3 | Larutan OVA injeksi | 10 µg Ovalbumin 1,5 mg AlOH ₃ Dilarutkan dalam 200 µl PBS |
| 4 | TCA 10 % | TCA 10 g Akuades 100 ml |
| 5 | Na-Thio 1 % | Asam thiobarbiturat 0,868 g NaOH 0,241 Akuades 100 ml |
| 6 | HCl 1 N | HCL 37 % 7,780 ml Akuades 100 ml |
| 7 | Buffer formalin 10 % | 100 ml formaldehida 40 % 4 g NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O 6,5 g Na ₂ HPO ₄ 900 ml Akuades |



Lampiran 7. Prosedur Pengukuran Kadar MDA

Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum MDA

100 μ l Stok Kit MDA konsentrasi 1,2,3,4,5,6,7 dan 8 mg/ml

- Dimasukkan dalam tabung reaksi kecil
- Ditambah 550 μ l aquades
- Ditambahkan 100 μ l TCA 10 %
- Dihomogenkan
- Ditambahkan 250 μ l HCl
- Dihomogenkan
- Ditambah 100 μ l Na-Thio 1 %
- Dihomogenkan
- Disentrifugasi 500 rpm selama 10 menit

Supernatan

- Diinkubasi pada water bath 100° C selama 30 menit
- Diangkat dan dibiarkan dalam suhu ruang
- Diukur absorbansinya dengan menggunakan spektfotometer (λ maks = 533 nm)

Absorbansi Larutan standar dan kurva standar MDA

Pembuatan Homogenat

Organ Paru

- Ditimbang 0,5 gram
- Dipotong kecil-kecil dan daigerus dalam mortar dingin
- Ditambahkan 1 ml NaCl 0,9 %
- Disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 20 menit
- Diambil supernatannya

Supernatan



Pengukuran Kadar MDA Homogenat

Supernatan

- Diambil 100 µl sampel supernatan
- Ditambah 550 µl Aquades Ditambahkan 1 ml Nacl 0,9 %
- Ditambah 100 µl Asam Trikloroasetat atau TCA 10 %
- Dihomogenkan dengan vorteks
- Ditambah 250 µl HCl 1 M
- Ditambah 100 µl Na-Thio 1%
- Dihomogenkan dengan Vorteks
- Dipanaskan dalam water bath dengan suhu 100°C selama 20 menit
- Diangkat dan didinginkan pada suhu ruang
- Diukur absorbansinya dengan spektfotometer pada α maksimum
- Dperoleh nilai absorbansi sampel

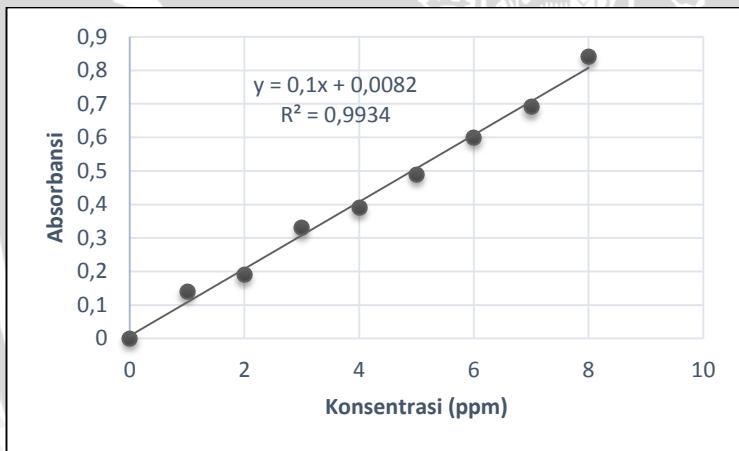
Hasil



Lampiran 8. Kurva Baku MDA, Data Absorbansi dan Perhitungan Kadar Malondialdehida (MDA)

Tabel L8.1 Hasil Pengukuran Absorbansi Kurva Baku MDA dengan panjang gelombang max 533 nm

| Konsentrasi mg/mL | Absorbansi |
|-------------------|------------|
| 0 | 0,000 |
| 1 | 0,140 |
| 2 | 0,190 |
| 3 | 0,330 |
| 4 | 0,390 |
| 5 | 0,490 |
| 6 | 0,600 |
| 7 | 0,691 |
| 8 | 0,841 |



Gambar L8.1 Kurva Baku MDA pada panjang gelombang 533 nm

Tabel L.8.2 Data Absorbansi MDA

| Perlakuan | Absorbansi Kadar MDA | | | | |
|----------------------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Kontrol | 0,052 | 0,054 | 0,059 | 0,057 | 0,058 |
| Sakit | 0,071 | 0,072 | 0,069 | 0,071 | 0,071 |
| Terapi 500 mg/Kg BB (T1) | 0,062 | 0,064 | 0,063 | 0,061 | 0,060 |
| Terapi 1000 mg/Kg BB (T2) | 0,060 | 0,061 | 0,058 | 0,055 | 0,058 |

Tabel L.8.3 Perhitungan Kadar MDA

Perhitungan kadar MDA dilakukan untuk semua nilai absorbansi dengan menggunakan persamaan kurva standar MDA (Gambar L8.1) $y = 0,1x + 0,0082$. Contoh perhitungan Kadar MDA adalah

$$y = 0,1x + 0,0082$$

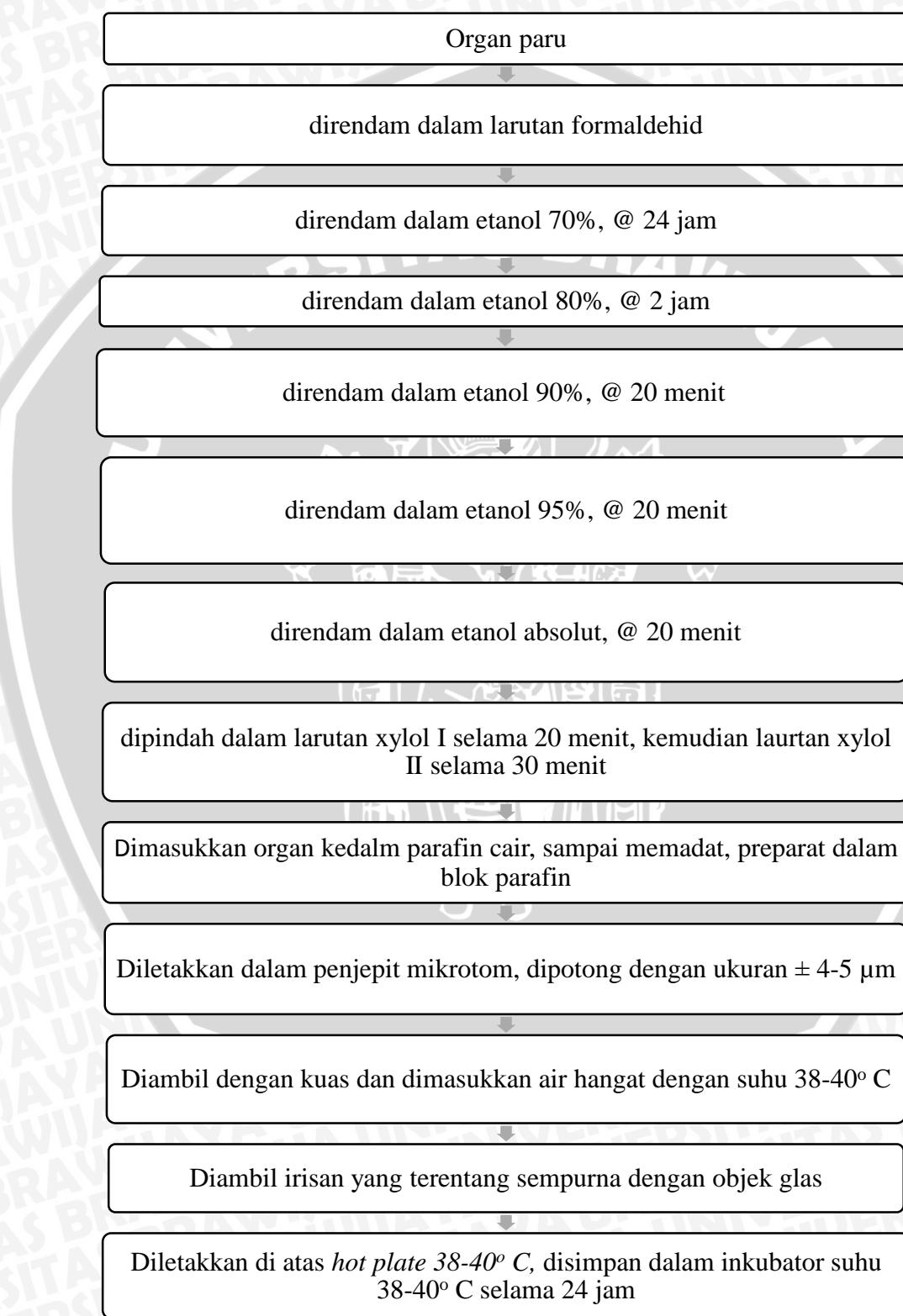
$$0,052 = 0,1x + 0,0082$$

$$X = (0,052 - 0,0082) / 0,1$$

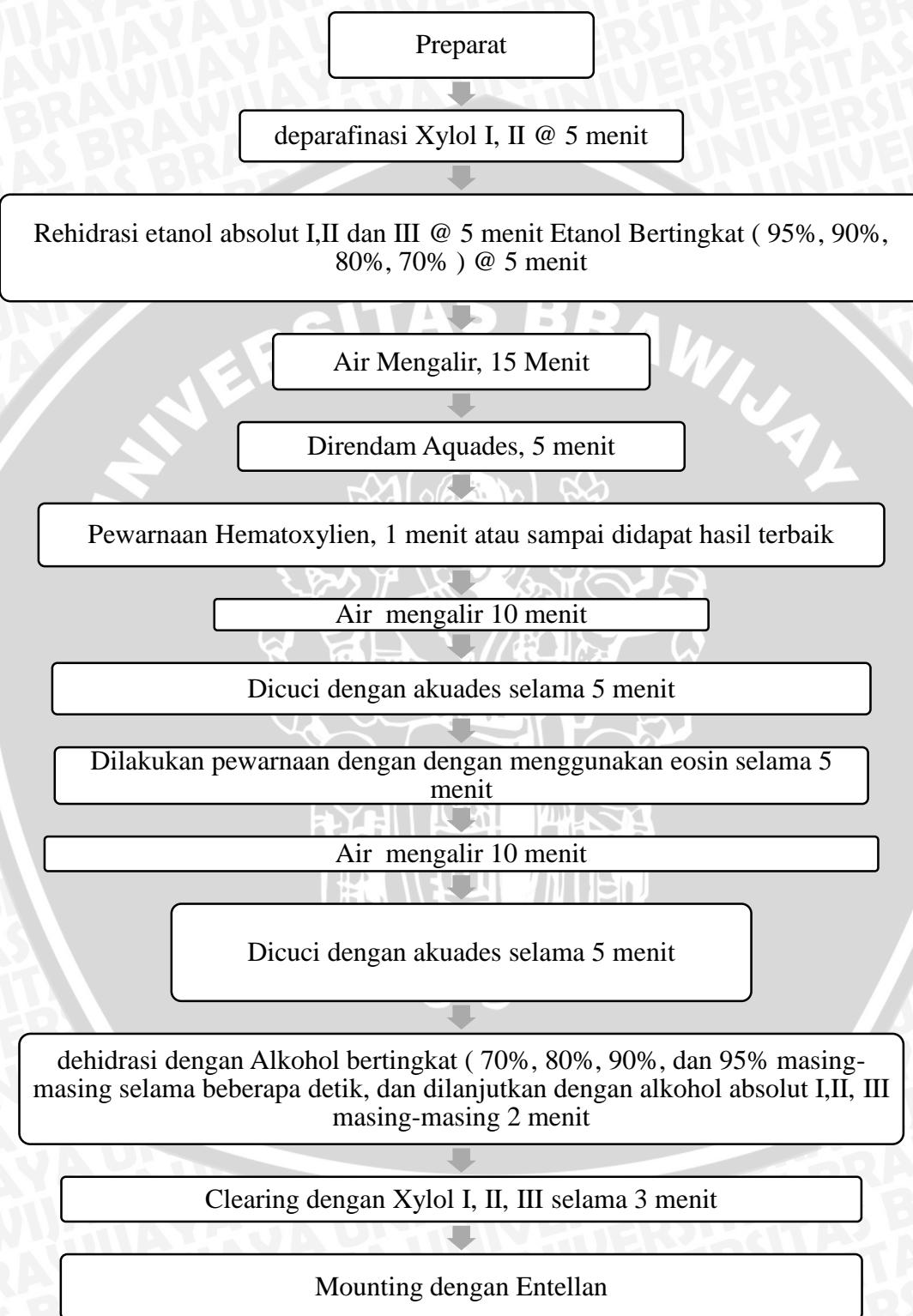
$$= 0,438 \text{ mg/ml}$$

| Perlakuan | Perhitungan kadar MDA (mg/ mL) | | | | | Rata-rata |
|----------------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Kontrol | 0,438 | 0,458 | 0,508 | 0,488 | 0,498 | $0,478 \pm 0,029$ |
| Sakit | 0,628 | 0,638 | 0,608 | 0,628 | 0,628 | $0,626 \pm 0,01$ |
| T1 | 0,538 | 0,558 | 0,548 | 0,528 | 0,518 | $0,538 \pm 0,01$ |
| T2 | 0,518 | 0,528 | 0,498 | 0,468 | 0,498 | $0,502 \pm 0,023$ |

Lampiran 9. Pembuatan Preparat Histologi Organ Paru menggunakan Metode Parafin



Lampiran 10. Pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE)



Lampiran 11. Hasil Uji Statistika

Tabel L 11.1 Uji Normalitas Data

| | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|-------|
| | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Kelompok | ,169 | 20 | ,139 | ,863 | 20 | ,009 |
| Kadar | ,152 | 20 | ,200* | ,918 | 20 | ,093* |
| MDA | | | | | | |

*. P> 0,05 data tidak berbeda

Tabel L 11.2 Uji Homogenesitas

Kadar MDA

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|-------|
| 2,376 | 3 | 16 | ,108* |

*P>0,05 data tidak berbeda

Tabel L 11.3 Uji statistik ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | ,063 | 3 | ,021 | 48,091 | ,000 |
| Within Groups | ,007 | 16 | ,000 | | |
| Total | ,070 | 19 | | | |

*P< 0,05 terdapat perbedaan antar perlakuan

Tabel L 11.4 Uji lanjutan BNJ (Beda Nyata Jujur)

| Multiple Comparisons | | | | | | | |
|-------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| Dependent Variable: Kadar MDA | | | | | | | |
| | Jenis Perlakuan | Jenis Perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Tukey HSD | Normal | Sakit | -,148000* | ,013229 | ,000 | -,18585* | -,11015 |
| | | Terapi 500 mg/KgBB | -,060000* | ,013229 | ,002 | -,09785* | -,02215 |
| | | Terapi 1000 mg/KgBB | -,024000 | ,013229 | ,303 | -,06185 | ,01385 |
| | Sakit | Normal | ,148000* | ,013229 | ,000 | ,11015* | ,18585 |
| | | Terapi 500 mg/KgBB | ,088000* | ,013229 | ,000 | ,05015* | ,12585 |
| | | Terapi 1000 mg/KgBB | ,124000* | ,013229 | ,000 | ,08615* | ,16185 |
| | Terapi 500 mg/KgBB | Normal | ,060000* | ,013229 | ,002 | ,02215* | ,09785 |
| | | Sakit | -,088000* | ,013229 | ,000 | -,12585* | -,05015 |
| | | Terapi 1000 mg/KgBB | ,036000 | ,013229 | ,065 | -,00185 | ,07385 |
| | Terapi 1000 mg/KgBB | Normal | ,024000 | ,013229 | ,303 | -,01385 | ,06185 |
| | | Sakit | -,124000* | ,013229 | ,000 | -,16185* | -,08615 |
| | | Terapi 500 mg/KgBB | -,036000 | ,013229 | ,065 | -,07385 | ,00185 |

Tabel 11.5 Pemberian Notasi pada Uji BNJ

| Kelompok | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|---------------------|--------------------|-------------------------|--------|--------|
| | | a | b | c |
| Normal | 5 | ,47800 | | |
| Terapi 1000 mg/KgBB | 5 | ,50200 | ,50200 | |
| Tukey HSD | Terapi 500 mg/KgBB | | ,53800 | |
| Sakit | 5 | | | ,62600 |
| Sig. | | ,303 | ,065 | 1,000 |