

**PENGARUH TERAPI PERASAN BUAH LABU SIAM
(*Sechium edule*) TERHADAP AKTIVITAS PROTEASE
DAN PROFIL PROTEIN ILEUM TIKUS (*Rattus
norvegicus*) INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD)
HASIL INDUKSI INDOMETASIN**

SKRIPSI

**Oleh :
ARINDA NALA KUSUMA
105130101111016**



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

**PENGARUH TERAPI PERASAN BUAH LABU SIAM
(*Sechium edule*) TERHADAP AKTIVITAS PROTEASE
DAN PROFIL PROTEIN ILEUM TIKUS (*Rattus
norvegicus*) INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD)
HASIL INDUKSI INDOMETASIN**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Kedokteran Hewan

Oleh :

ARINDA NALA KUSUMA

10513010111016



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

**STUDI TERAPI PERASAN BUAH LABU SIAM
(*Sechium edule*) TERHADAP AKTIVITAS PROTEASE
DAN PROFIL PROTEIN ILEUM TIKUS
(*Rattus norvegicus*) INFLAMMATORY
BOWEL DISEASE HASIL
INDUKSI INDOMETASIN**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

**Oleh :
ARINDA NALA KUSUMA
105130101111016**



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

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**STUDI TERAPI PERASAN BUAH LABU SIAM (*Sechium edule*)
TERHADAP AKTIVITAS PROTEASE DAN PROFIL PROTEIN
ILEUM TIKUS (*Rattus norvegicus*) INFLAMMATORY BOWEL DISEASE
(IBD) HASIL INDUKSI INDOMETASIN**

Oleh:
ARINDA NALA KUSUMA
105130101111016

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 17 November 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

Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc
NIP. 19820914 200912 2 004

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 : ARINDA NALA KUSUMA

NIM : 105130101111016

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

**STUDI TERAPI PERASAN BUAH LABU SIAM
(*Sechium edule*) TERHADAP AKTIVITAS
PROTEASE DAN PROFIL PROTEIN ILEUM
TIKUS (*Rattus norvegicus*) INFLAMMATORY
BOWEL DISEASE (IBD) HASIL INDUKSI
INDOMETASIN**

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, 17 November 2014
Yang menyatakan,

(ARINDA NALA KUSUMA)
NIM.105130101111016

Studi Terapi Perasan Buah Labu Siam (*Sechium edule*) Terhadap Aktivitas Protease dan Profil Protein Ileum Tikus (*Rattus norvegicus*) *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) Hasil Induksi Indometasin

ABSTRAK

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan penyakit pada saluran pencernaan terutama organ ileum yang disebabkan oleh efek pemberian NSAID diantaranya Indometasin. Dosis pemberian indometasin 15mg/kg BB per oral dapat menyebabkan IBD pada hewan coba. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek terapi perasan buah labu siam (*Sechium edule*) terhadap penurunan aktivitas protease dan perubahan profil protein pada ileum tikus (*Rattus norvegicus*). Hewan coba yang dipakai yaitu tikus (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 8-12 minggu yang dibagi menjadi empat kelompok yakni kelompok 1 yaitu kontrol, kelompok 2 yaitu IBD, kelompok 3 dan 4 yaitu dosis 10g/tikus dan 20g/tikus. Aktivitas protease diukur menggunakan metode spektrofotometri. Profil protein ileum di analisis dengan SDS-PAGE. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi perasan buah labu siam secara signifikan ($p < 0,05$) menurunkan aktivitas protease. Dosis efektif terapi adalah 20 g/tikus yang menurunkan aktivitas protease sebesar 46,95%. Hasil analisis profil protein menunjukkan bahwa protein BM 62 kDa tidak disintesis setelah terapi perasan buah labu siam dan protein ini diduga sebagai *Vasoactive intestinal polypeptide* (VIP). Dapat disimpulkan bahwa terapi perasan buah labu siam dapat menurunkan aktivitas protease ileum dan menghambat sintesis protein 62 kDa.

Kata Kunci : *Inflammatory Bowel Disease* (IBD), Indometasin, Perasaan buah labu siam (*Sechium edule*), Aktivitas protease dan Profil protein.

**The Therapeutical Effect of Chayote Extract (*Sechium edule*) towards
Protease Activity and Protein Profile Ileum of *Inflammatory Bowel Disease*
(IBD) Indhomethacine Induction Rat (*Rattus norvegicus*)**

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) is a digestive system disease especially in ileum organ which is caused by the effect of NSAID such as Indomethacine. The dose of 15 mg/kg BW Indomethacine per oral resulted IBD on rat animal model. The research was aimed to find out the effect of chayote (*Sechium edule*) extract therapy toward protease activity and protein profile alteration in the rats ileum. The research used male rats (*Rattus norvegicus*) aged of 8-12 weeks divided into four groups. They were control group, IBD group, therapy group with dose of 10g/rat and 20g/rat chayote extract. Protease activity was assessed by spectrophotometry. Protein profile was analyze using SDS-PAGE. The results showed that chayote extract therapy decreased protease activity significantly ($p < 0.05$). The effective dose was 20g/rats, decreased to be 46.95% of protease activity. The protein profile analysis showed that 62 kDa MW assumed as *Vasoactive intestinal polypeptide* (VIP) was not synthesized after chayote extract therapy. In conclusion, chayote extract therapy could decrease ileum protease activity and prevent the synthesize of 62 kDa protein.

Keywords: *Inflammatory Bowel Disease* (IBD), Indomethacin, Chayote's extract (*Sechium edule*), Protease activity, and Protein profile.

KATA PENGANTAR

Puji Syukur atas kehadiran Allah SWT yang melimpahkan segala rahmat dan pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“Studi Terapi Perasan Buah Labu Siam (*Sechium edule*) Terhadap Aktivitas Protease dan Profil Protein Ileum Tikus (*Rattus norvegicus*) Inflammatory Bowel Disease (IBD) Hasil Induksi Indometasin”**. Penelitian ini merupakan payung penelitian dosen yang diketahui oleh Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES serta menjadi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Program Kedokteran Hewan, Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Universitas Brawijaya.

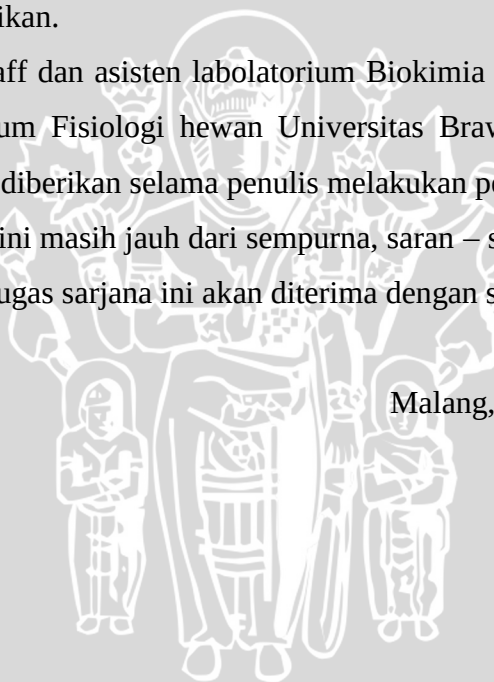
Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terimakasih kepada segenap pihak secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih terutama kepada :

1. Prof. Dr. Aulanni’am, drh., DES sebagai Pembimbing I tugas Sarjana ini atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
2. Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc sebagai Pembimbing II tugas Sarjana ini atas bimbingan dan arahan yang telah diberikan kepada penulis.
3. drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P., M.Biotech sebagai penguji I tugas Sarjana ini atas bimbingan dan arahan yang telah diberikan kepada penulis dengan baik serta penuh kesabaran.
4. drh. Handayu Untari sebagai penguji II tugas Sarjana ini atas bimbingan dan arahan yang telah diberikan kepada penulis dengan baik dan penuh kesabaran.
5. Dr. Agung Pramana Warih Marhendha, M.Si. Selaku Ketua Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas kepemimpinan dan fasilitas yang telah diberikan.

6. Bapak Ilyas, SE. Ibu Siti Komariyah,spd. Kakak saya satu-satunya Mila Afwillla serta keluarga besar yang begitu ikhlas menyayangi serta begitu sabar menanti, mendorong, membantu penulis selama belajar di Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang
7. Chaliditya Bustan, Haryadi Saptono atas inspirasi dan bantuan yang luar biasa serta Devy Ika, Devi Anggraeni, Hermayani Nawang teman seperjuangan dalam menyelesaikan penelitian ini.
8. Seluruh Sahabat yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala perhatian, dorongan, penghargaan, ajaran, dukungan dan doa yang telah diberikan.
9. Seluruh staff dan asisten labolatorium Biokimia Fakultas MIPA dan Laboratorium Fisiologi hewan Universitas Brawijaya atas bantuan yang telah diberikan selama penulis melakukan penelitian.

Tugas sarjana ini masih jauh dari sempurna, saran – saran demi kebaikan dan pengembangan isi tugas sarjana ini akan diterima dengan senang hati.

Malang, 17 November 2014



DAFTAR ISI

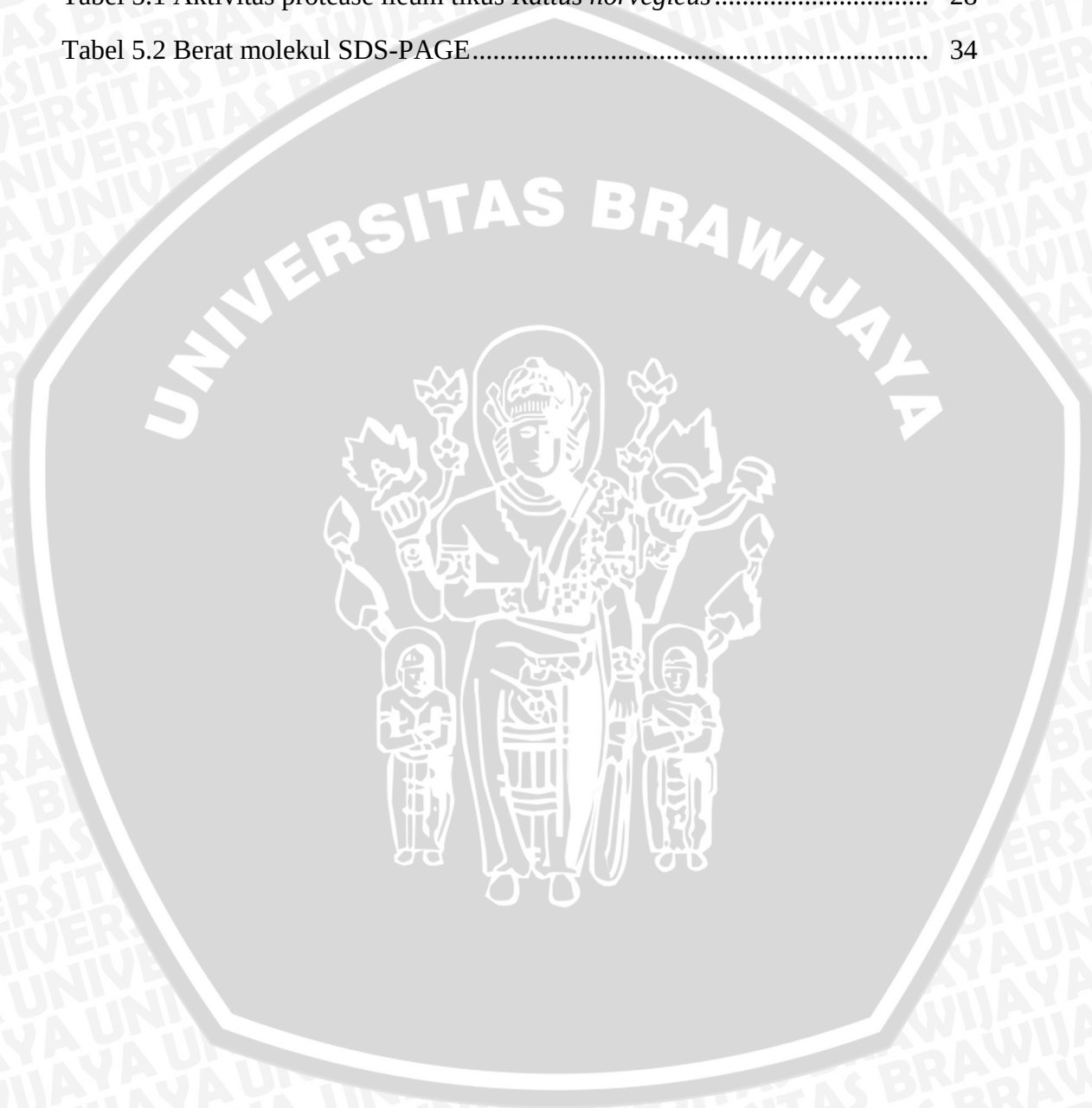
	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG.....	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Inflammatory Bowel Disease.....	6
2.2 Efek Indometasin Pada Ileum Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>).....	7
2.3 Labu Siam	8
2.3.1 Taksonomi.....	9
2.3.2 Senyawa kimia dalam labu siam yang berStudi dalam IBD	9
2.3.3 Manfaat	11
2.4 Hewan Coba Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	12
2.5 Aktivitas Protease terhadap ileum	13
2.6 SDS-PAGE	14
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	17
3.1 Kerangka Konseptual.....	17
3.2 Hipotesis Penelitian	18
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN.....	19
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	19
4.2 Sampel Penelitian	19
4.3 Rancangan Penelitian	20
4.4 Variabel Penelitian	20
4.5 Materi Penelitian	20
4.6 Prosedur Penelitian	21
4.6.1 Preparasi Hewan Coba	21
4.6.2 Persiapan Hewan Model IBD dengan Indometasin.....	21
4.6.3 Tata Laksana Pemberian Air Perasan Buah Labu Siam Per Oral	22
4.6.4 Pengambilan Organ Ileum	23
4.6.5 Penentuan Aktivitas Protease	23

4.6.5.1 Pembuatan kurva baku tirosin	23
4.6.5.2 Pengukuran aktivitas protease hasil isolasi dari ileum	24
4.7 Elektroforesis SDS-PAGE.....	25
4.7.1 Persiapan Gel	25
4.7.2 Injeksi Sampel dan running	26
4.7.3 Perlakuan setelah running.....	26
4.7.4 Penentuan Berat molekul	26
4.7.5 Analisis Data.....	26
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	28
5.1 Aktivitas Protease	28
5.2 Profil Protein	32
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	37
6.1 Kesimpulan.....	37
6.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN.....	44



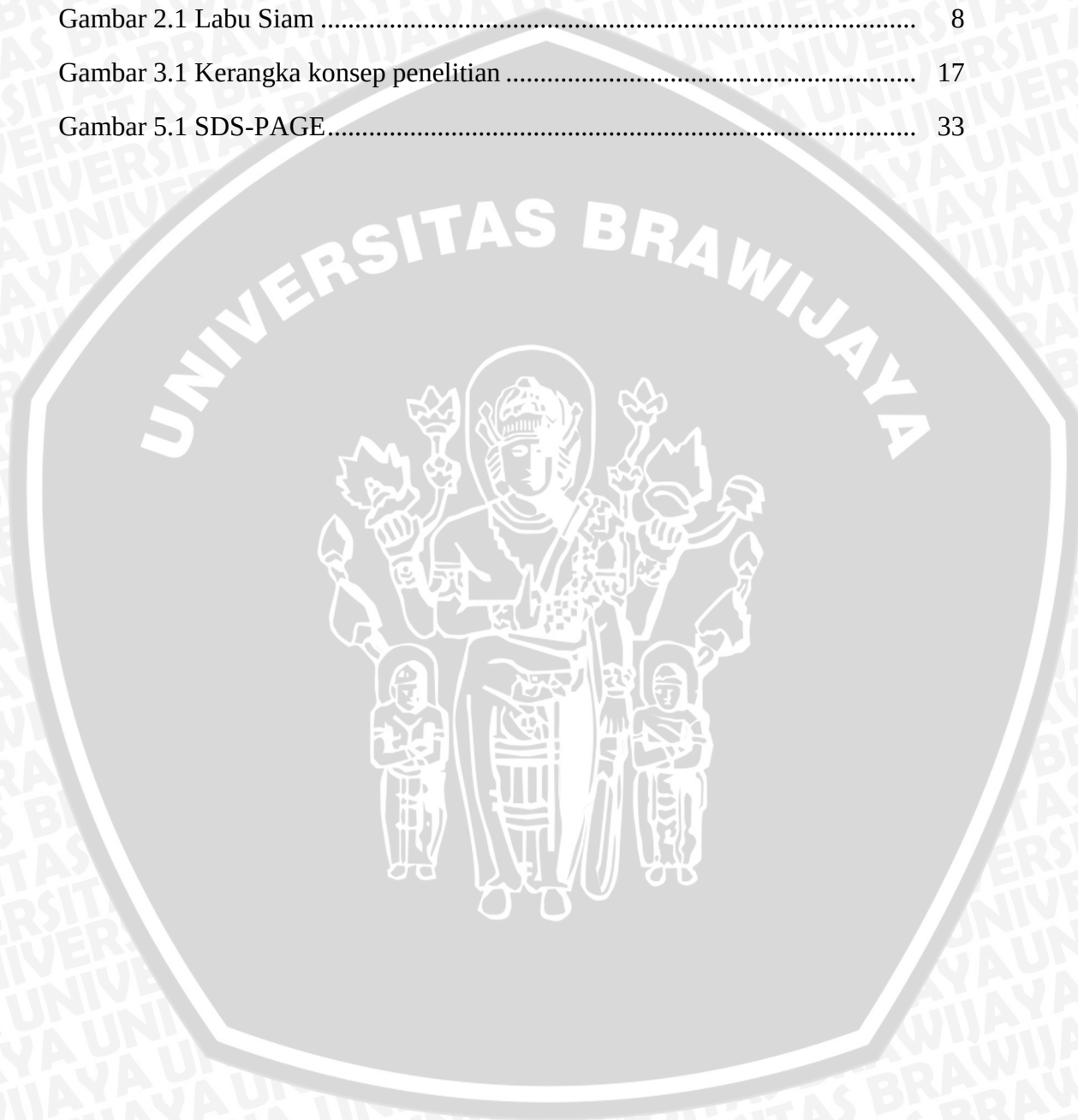
DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Aktivitas protease ileum tikus <i>Rattus norvegicus</i>	28
Tabel 5.2 Berat molekul SDS-PAGE.....	34



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Labu Siam	8
Gambar 3.1 Kerangka konsep penelitian	17
Gambar 5.1 SDS-PAGE.....	33



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian	44
Lampiran 2. Pembuatan Perasan Buah Labu Siam	45
Lampiran 3. Pembuatan Stok Indometasin	46
Lampiran 4. Diagram kerja pengukuran aktivitas protease	47
Lampiran 5. Profil Protein dengan Teknik Sds-Page	51
Lampiran 6. Preparasi Larutan	53
Lampiran 7. Determinasi Labu Siam (<i>Sechium edule</i>)	54
Lampiran 8. Laik Etik	55
Lampiran 9. Dokumentasi Penelitian	56
Lampiran 10. Penentuan Panjang Gelombang Tirosin.....	57
Lampiran 11. Pembuatan Kurva Standar Tirosin.....	58
Lampiran 12. Perhitungan Aktivitas Protease.....	60
Lampiran 13. Hasil Uji Statistika.....	62
Lampiran 14. Hasil Uji LCMS.....	65
Lampiran 15. Kurva standar Marker SDS PAGE	67

DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ANOVA	Analisis of Variant
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
BB	Berat Badan
CD	<i>Chrons disease</i>
COX-1	<i>Cyclooxygenase-1</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i>
CHCl ₄	<i>Triklorometana (Kloroform)</i>
GIT	<i>Gastrointestinal Tract</i>
H ₂ SO ₄	Asam Sulfat
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
IBD	<i>Inflammatory Bowel Disease</i>
KCl	<i>Kalium Klorida</i>
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogram
KHPO ₄	Potasium Hidrogen Sulfat
KLT	<i>Kromatografi Lapis Tipis</i>
LSD	<i>Lower Significant Different</i>
Na ₂ HPO ₄ (H ₂ O)	<i>Natrium Hidrogen Fosfat</i>
NaOH	<i>Natrium Hidroksida</i>
NO	<i>Nitrit oxide</i>
NSAIDs	Nonsteroid anti-inflammatory drugs
PBS	<i>Phospate Buffer Saline</i>
PGE2	<i>Prostaglandin E2</i>
SDS PAGE	<i>Sodium Deodecyl Sulphate Poly-acrylamid Gel</i>
VIP	<i>Elektroforesis</i> <i>Vasoactive intestinal polypeptide</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan penyakit peradangan usus yang memiliki gejala antara lain, diare, sembelit, rasa nyeri pada perut, sendawa dan kembung. IBD ini dibagi menjadi dua sub tipe klinis, yaitu *Crohn's disease* (CD) dan *ulcerative colitis* (UC). CD merupakan inflamasi yang terjadi pada bagian yang lapisan dinding usus dan bagian saluran pencernaan meliputi mulut, esophagus, perut dan usus halus, sedangkan UC hanya terbatas pada usus besar, rektum dan peradangan terjadi pada lapisan usus (Kappelmen *et al.*, 2007).

Gejala klinis IBD secara umum meliputi diare kronik, penurunan berat badan dan nyeri abdominal. Penderita IBD biasanya berusia antara 20-40 tahun pada manusia. Di Indonesia dari data yang di peroleh dari unit endoskopi RS di Jakarta didapatkan data bahwa kasus IBD terdapat pada 12,2% dari kasus yang dikirim dengan diare kronik, 3,9% dari kasus dengan diare berdarah (Dharmika Djojoningrat, 2006). Penyakit radang usus (IBD) yang dikenal sebagai gangguan gastrointestinal pada manusia, namun penyakit ini juga hadir dan sering terjadi pada pet animal. Salah satu contoh dalam hal ini adalah pada Anjing. *Inflammatory Bowel Disease* pada anjing juga mampu berkembang menjadi enteropathies kronis jika berlangsung lebih dari tiga minggu. Pada anjing perkembangan IBD diduga sebagai akibat dari deregulasi kekebalan mukosa yang cenderung pada hewan. Hilangnya toleransi terhadap antigen (makanan, bakteri usus) adalah salah satu mekanisme yang paling banyak

dipelajari yang bisa berkembang menjadi peradangan usus kronis. Gejala klinis dari IBD pada anjing yang paling umum adalah terjadi penurunan berat badan, terus menerus atau muntah berulang atau diare.

Inflamasi pada saluran pencernaan khususnya organ ileum sering terjadi karena disebabkan oleh efek penggunaan NSAIDs (*Non Steroid Anti Inflammatory Drugs*) seperti Indometasin. Indometasin merupakan obat anti inflamasi yang sering digunakan karena memiliki efek yang sangat efektif untuk menekan terjadinya inflamasi dan menghambat *cyclooxygenase 1* (COX1) yang berperan dalam pembentukan prostaglandin pada usus. Penurunan prostaglandin menyebabkan penurunan perlindungan terhadap mukosa barier usus sehingga memudahkan invasi bakteri patogen (Takeuci *et al.*, 2003).

Indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB dapat mengaktifkan makrofag yang akan melepaskan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Produksi ROS yang berlebih dalam sel menyebabkan aktivasi NF- κ B dan fosforilasi inhibitor NF- κ B. Kemudian NF- κ B berpindah menuju nukleus dan mengekspresi sitokin pro-inflamasi seperti TNF α . Produksi TNF α yang berlebih pada sel akan menyebabkan inflamasi. Adanya inflamasi akan meningkatkan aktivasi neutrofil serta pelepasan enzim protease yang menyebabkan kerusakan jaringan (Campbell *et al.*, 2006). Adanya kerusakan atau inflamasi pada ileum dapat diamati dengan adanya kerusakan pada pita protein. Pada penderita IBD apabila diberikan terapi menggunakan obat-obatan yang berasal dari bahan kimia maka kondisi ini hanya akan memperparah kondisi inflamasi pada ileum, sehingga

diperlukan terapi antiinflamasi yang bersifat aman (Lanas & Scarpignato, 2006; Laudanno *et al.*, 2006).

Fungsi labu siam dapat memberikan efek anti inflamasi dan melindungi mukosa ileum sehingga penelitian ini dapat membuktikan peran terapi perasan buah labu siam dapat berpotensi sebagai obat karena inflamasi pada dinding sel usus ileum yang di induksi indometasin dengan melihat aktivitas protease dan profil protein. Penelitian ini menggunakan hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) IBD yang telah diinduksi indometasin dengan dosis 15-16 mg/kg BB secara oral (Aulanni'am *et al.*, 2012).

Bangsa Indonesia telah memanfaatkan tanaman berkhasiat obat sebagai salah satu upaya untuk menanggulangi masalah kesehatan. Salah satu tanaman obat yang dapat digunakan seperti labu siam (*Sechium edule*) yang merupakan salah satu ragam tanaman yang banyak terdapat di Indonesia. Famili ini mencakup lebih dari 750 jenis yang terbagi dalam 100 genus.

Labu siam (*Sechium edule*) dikenal masyarakat sebagai sayuran yang mudah didapat dan digunakan sebagai bahan masakan. Selain sebagai sayuran, labu siam dapat menyembuhkan beberapa penyakit sehingga dapat disebut sebagai tanaman obat (Priantono, 2011). Namun pengetahuan tentang kandungan kimia yang sudah dipelajari pada labu siam masih sedikit sekali diantaranya adalah citrulline, asam alfa amino ureido butirrat, asam oksalat, dan asam gamma amino butirrat (Duke, 2003). Pengobatan IBD secara konvensional dilakukan dengan pemberian obat-obatan dari jenis anti inflamasi, penekan sistem imun. Selain itu terdapat pula terapi herbal labu siam yang berpotensi

sebagai obat yang berguna untuk kesehatan, sampai saat ini belum dipelajari manfaat perasan buah labu siam (*Sechium edule*) untuk *Inflammatory Bowel Disease*. Oleh karena itu pada penelitian ini akan dipelajari pada manfaat perasan labu siam yang diambil bagian atasnya sehingga endapannya harus dibuang, untuk terapi IBD melalui aktivitas protease dan profil protein .

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan :

1. Apakah terapi perasan labu siam (*Sechium edule*) dapat menurunkan aktivitas protease ileum tikus IBD hasil induksi indometasin ?
2. Apakah terapi perasan labu siam (*Sechium edule*) berpengaruh terhadap profil protein ileum tikus yang *Inflammatory Bowel Disease* hasil induksi indometasin ?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan pada sub bab sebelumnya, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar dengan umur 8-12 minggu dan berat badan antara 150-200 gram yang telah mendapatkan sertifikat laik etik oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No: 216-KEP-UB (**Lampiran 1**).
2. Dosis pemberian indometasin yang diberikan satu kali selama penelitian per oral (po) adalah 15 mg/kg BB (Aulanni'am *et al*, 2012).

3. Dosis terapi perasan buah labu siam yaitu 10 g/tikus dan 20 g/tikus yang diberikan selama 14 hari sebanyak 2 ml per oral.
4. Perubahan profil protein ileum dianalisis menggunakan metode SDS-PAGE sedangkan aktivitas protease didalam dinding sel ileum diukur dengan metode spektrofotometri.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh efek terapeutik perasan buah labu siam (*Sechium edule*) terhadap penurunan aktivitas protease dari ileum tikus (*Rattus norvegicus*) *Inflammatory Bowel Disease* yang mendapat paparan indometasin.
2. Mengetahui pengaruh terapi perasan buah labu siam (*Sechium edule*) terhadap perbaikan gambaran profil protein ileum yang mendapat terapi perasan buah labu siam (*Sechium edule*) hasil induksi indometasin.

1.5 Manfaat Penelitian

Melalui penelitian ini dapat dibuktikan kemampuan perasan daging buah labu siam (*Sechium edule*) dalam menekan *Inflammatory Bowel Disease* pada ileum tikus (*Rattus norvegicus*) hasil induksi indometasin, sehingga nantinya perasan daging buah labu siam dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan herbal untuk inflamasi yang terjadi pada pencernaan (GIT).

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Inflammatory Bowel Disease (IBD)

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan suatu kondisi inflamasi kronik yang disebabkan oleh kegagalan regulasi sistem imun, kerentanan genetik, dan rangsangan flora normal di saluran cerna. *Inflammatory Bowel Disease* dapat disebabkan oleh adanya infeksi pada saluran pencernaan karena adanya pemicu seperti bakteri dan virus (Achkar, 2000). Penggunaan *Non steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDs) juga dapat menyebabkan IBD dengan cara menghambat kerja dari enzim siklooksigenase (COX). Penghambatan COX-1 dan COX-2 akan menyebabkan penghambatan pembentukan prostaglandin (PGE₂) sehingga sekresi mukus berkurang. Produksi mukus yang berkurang dapat mengakibatkan hilangnya barrier mukosa kolon. Hal ini dapat menyebabkan mudahnya invasi bakteri patogen pada permukaan kolon (Kaser *et al.*, 2010).

Dalam pathogenesis IBD, Indometasin terbukti meningkatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) yaitu untuk Chohn's disease (CD) diawali pada sel T helper 1 (Th1) yang mengeluarkan sitokin TNF- α , interleukin-12 dan interferon - γ yang akan mengawali proses penyakit inflamasi. Sedangkan pada ulcerative colitis (UC) yang berperan adalah sel T helper 2 (Th2) yang akan mengeluarkan sitokin seperti interleukin-4 dan interleukin-13 (Solanki *et al.*, 2010). Respon imun diawali ketika limfosit T sitotoksik (CD8⁺) atau sel T helper CD4⁺ pada lumen usus mengenal antigen (Neuman, 2004). Pengaktifan

sel Thelper akan menghasilkan sitokin. Sitokin berperan pada epitel usus dan secara langsung akan mengaktifkan makrofag ($M\phi$) untuk melepaskan mediator inflamasi seperti sitokin *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *nitric oxide* (NO), yang selanjutnya akan merekrut leukosit dan menyebabkan inflamasi terus menerus, sehingga dapat merusak jaringan usus (Loroux *et al.*, 2001). Produksi ROS yang berlebihan pada saat selama inflamasi akan merusak biomolekul seperti asam nukleat, protein, dan lemak yang pada akhirnya dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan memperparah inflamasi yang terjadi pada usus (Pan *et al.*, 2010).

2.2 Efek Indometasin Pada Ileum Tikus (*Rattus norvegicus*)

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS) merupakan golongan obat-obatan anti inflamasi yang paling sering digunakan. Namun penggunaan obat ini memiliki efek samping yang dapat menyebabkan kerusakan berupa inflamasi pada seluruh bagian dari *gastrointestinal tract* (GIT), baik pada hewan maupun manusia (Bures, 2011). Indometasin merupakan obat NSAIDs yang memiliki efek samping berupa *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) yang meliputi inflamasi dan kerusakan pada usus halus. Dosis pemberian indometasin yaitu 10-15 mg/kg BB perhari (24 jam) dengan pemberian secara oral dapat menyebabkan erosi akut mukosa usus. Selain itu juga obat golongan NSAIDs termasuk indometasin dapat menghambat aktivitas enzim siklooksigenase (COX) 1 dan 2. Penghambatan pada COX-2 berfungsi sebagai pengurangan nyeri. Namun, penghambatan terhadap COX-1 akan menghambat sintesis Prostaglandin yang berfungsi pada sekresi mukus untuk melindungi

mukosa usus halus (Tanaka *et al.*, 2002). Sehingga membuktikan bahwa penggunaan obat NSAIDs memiliki pengaruh dan respon inflamasi berupa induksi *Inflammatory cytokines* dan infiltrasi neutrofil (Takeuchi, 2002). Pada kasus inflamasi yang disebabkan oleh indometasin terbukti meningkatkan ROS yaitu radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal nitrit oksida ($\text{NO}\cdot$) (Basivireddy *et al.*, 2002 ; Takeuchi *et al.*, 2003).

2.3 Labu Siam(*Sechium edule*)

Labu siam (*Sechium edule*) merupakan sayuran yang berbentuk buah (mirliton atau mango squash) yang berasal dari Amerika Tengah (Montano *et al.*, 2000). Sayuran ini tergolong suku Cucurbitaceae dalam genus *Sechium*. Dari 11 spesiesnya, *Sechium edule* Sw.



Gambar 2.1 Labu Siam (*Sechium edule*) (Bakti Husada, 2001)

Labu siam biasanya berbentuk seperti persik, berdaging dan berkulit lunak dengan alur membujur dan berwarna putih kehijauan. Ujung buah secara khas tampak berlubang (3-5 cm), pipih dan berwarna putih, kadang-kadang terbentuk buah partenokarpik (Williams *et al.*, 1993). Menurut Amic *et al.*, (2003) buah labu siam mengandung zat saponin, alkaloid dan tanin. Sehingga daunnya mengandung saponin, flavonoid dan polifenol. Sedangkan hasil penelitian Melo *et al.*, (2006) menunjukkan bahwa buah labu siam

mengandung senyawa fenol dan flavonol namun dalam jumlah yang sangat sedikit.

2.3.1 Taksonomi Labu Siam (*Sechium edule*)

Taksonomi labu siam

Divisi : Spermatophyta

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledonae

Bangsa : Cucurbitales

Suku : Cucurbitaceae

Marga : *Sechium*

Jenis : *Sechium edule*

2.3.2 Senyawa Kimia dalam Labu Siam yang berpengaruh dalam IBD

Hampir semua alkaloid yang ditemukan di alam mempunyai keaktifan biologis tertentu, ada yang sangat beracun tetapi adapula yang sangat berguna dalam pengobatan, misalnya kuinin, morfin dan stiknin adalah alkaloida yang terkenal dan memiliki efek fisiologis dan psikologis (Lenny, 2006). Alkaloid umumnya ditemukan dalam kadar yang kecil dan harus dipisahkan dari campuran senyawa yang rumit yang berasal dari jaringan tumbuhan (Lenny, 2006).

Polifenol merupakan persenyawaan alami yang sangat banyak ragamnya dan tersebar luas dalam tanaman pangan. Polifenol terdiri dari sejumlah besar persenyawaan yang biasanya dibedakan atas flavonoid dan beberapa kelompok non flavonoid (Meng, 2009). Senyawa ini merupakan

metabolit sekunder yang terdiri dari beberapa struktur diver seperti asam fenolat, hidroksikoumarin, hidroksilasi antar kuinon, antron, xanthone, flavonoid, dan lain-lain (Shahidi, 1995).

Polifenol dapat dikelompokkan sebagai berikut: Asam fenolat (*phenolic acid*) merupakan molekul sederhana seperti asam kafeit (*caffeic acid*), vanillin dan *courmaric acid*. Asam folat membentuk sebuah kelompok besar, termasuk didalamnya hydroxybenzoic dan asam hidroksinamit. Senyawa ini tersebar secara merata pada tanaman. Selanjutnya, asam fenolat mungkin terdapat dalam tanaman pangan sebagai ester atau glikosida konjugasi dengan senyawa alam lainnya seperti flavonoid, *alksohol*, *hidroxyfatty acid*, sterol dan glukosida (Sahelian, 2006).

Flavonoid merupakan bagian dari polifenol yang tersebar secara merata di alam, walaupun tidak seragam. Struktur polifenol dalam flavonoid dan tanin membuatnya cukup sensitif terhadap oksidasi enzim dan kondisi pengolahan. Penggolongan flavonoid meliputi *katekin*, *proantosianidin*, *flavanon*, *flavanonol*, *flavon*, *flavonol*, *isoflavan*, *antosianin*, *kalkon* dan *hidrokalkon* serta *auron*. Buah labu siam biasanya mengandung 5-10 flavonol glikosida yang berbeda (Robinson, 1995).

Amic *et al.*, (2005), mengatakan bahwa buah labu siam mengandung 90% air, 7,5% karbohidrat, 1% protein, 0,6% serat, 0,2% abu dan 0,1% lemak. Labu siam juga mengandung 20mg kalsium, 25 mg fosfor, 100 mg kalium, 0,3 mg zat besi, 2 mg natrium serta beberapa zat kimia yang berkasiat obat. Labu siam memiliki kadar serat yang cukup baik, yaitu 1,7 g per 100 g.

konsumsi serat dalam jumlah yang cukup baik untuk mengatasi sembelit dan aman untuk lambung yang sensitif atau radang usus. Serat pangan dapat mengurangi risiko penyakit kanker yang disebabkan sistem pencernaan yang tidak sempurna (Astawan, 2007).

Kandungan asam folat pada buah labu siam juga baik, yaitu 93 mg per 100 g. Konsumsi 100 g labu siam cukup untuk memenuhi 23,25 % kebutuhan tubuh akan asam folat (Astawan, 2007). Baik buah maupun bijinya kaya akan asam amino seperti asam aspartate, asam glutamate, alanine, arginine, sistein, fenilalanin, glisin, histidin, leusin, metionin (hanya pada buah), prolin, serin, tirosin, treonin dan valin.

Menurut Amic *et al.*, (2003) buah labu siam mengandung zat saponin, alkaloid, dan tannin. Sedangkan daunnya mengandung saponin, flavonoid dan polifenol. Pada hasil penelitian Melo *et al.*, (2006) menunjukkan bahwa buah labu siam mengandung senyawa fenol dan flavonol namun dalam jumlah yang sangat sedikit.

2.3.3 Manfaat

Saponin sangat bermanfaat dalam menghambat dan mencegah penyerapan kolesterol dalam tubuh. Alkaloid mampu memperlancar peredaran darah sehingga dapat mencegah stroke, sedangkan tanin memiliki aktivitas antimikroba (Maryam, 2009). Senyawa polifenol, antosianin, dan flavonoid memiliki aktivitas antioksidan, yang dapat membantu mencegah kanker, dan membantu menghentikan proses inflamasi (Higgins, 2004; Melo *et al.*, 2006). Pektin merupakan serat makanan yang dapat larut (soluble dietary fibers), yang

diketahui dapat mencegah hiperkolesterol, kanker usus besar, dan diabetes (Agustini *et al.*, 2006).

2.4 Tikus (*Rattus norvegicus*)

Rattus norvegicus memiliki ciri rambut berwarna putih dan mata berwarna merah. Sebagai hewan percobaan, *Rattus norvegicus* memiliki beberapa keunggulan, yaitu pemeliharaan dan penanganan mudah, kemampuan reproduksi tinggi dan masa kebuntingan singkat, serta cocok untuk berbagai penelitian. Dalam penelitian menggunakan tikus *Rattus norvegicus*. *Rattus norvegicus* adalah hewan percobaan yang paling sering digunakan dalam penelitian yang berkaitan dengan pencernaan (Hofstetter *et al.*, 2005).

Penelitian yang dapat dilakukan menggunakan *Rattus norvegicus* diantaranya penelitian mengenai hipertensi, diabetes melitus, obesitas, dan lain-lain (Sirois, 2005). Umumnya para peneliti menggunakan indometasin untuk membuat kondisi inflamasi diusus dengan menggunakan hewan coba *Rattus norvegicus* (Hendrich, 2006).

Adapun taksonomi tikus putih menurut Besselsen (2004) dan Depkes (2011) sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Odontoceti
Familia	: Muridae

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus norvegicus*

Ciri-ciri morfologi *Rattus norvegicus* antara lain memiliki hidung tumpul, panjang badan 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20-23 mm. *Rattus norvegicus* memiliki waktu hidup 2,5 tahun sampai 3,5 tahun, denyut jantung 330-480 kali permenit, frekuensi respirasi 85 kali permenit dan memasuki masa dewasa pada usia 40-60 hari (Armitage, 2004). Ada banyak jenis dan spesies hewan model yang digunakan untuk penyakit asma. Tikus, cavia, anjing, domba, monyet, dan kuda telah digunakan untuk studi proses inflamasi dan gangguan fungsi pernapasan. Diantara hewan tersebut, tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan hewan model yang paling baik digunakan sebagai hewan model asma jika dibandingkan dengan hewan model lain.

2.5 Aktivitas Protease terhadap Inflamasi

Protease atau enzim proteolitik adalah salah satu enzim yang memiliki peranan penting dalam pencernaan, yaitu berfungsi sebagai penyederhana molekul protein dengan menghidrolisis ikatan peptide pada protein (Nuraini, 2002). Inflamasi merupakan reaksi lokal suatu jaringan terhadap infeksi bakteri pathogen yang melibatkan mediator dan sistem imun (Baratawidjaya, 2013). Enzim protease yang terlibat pada kerusakan jaringan adalah protease serin (elastase neutrofil) yaitu jenis protease yang tersimpan dalam neutrofil yang berfungsi sebagai pertahanan anti mikroba dengan mekanisme penelanan mikroorganisme di dalam fagolisosom neutrofil (Segal, 2005).

Besarnya aktivitas protease ditentukan berdasarkan jumlah tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis kasein yang dapat ditentukan secara spektrofotometer. Asam amino yang mampu diukur oleh spektrofotometer UV adalah asam amino aromatic seperti tirosin, triptofan dan fenilalanin. Absorpsi sinar pada panjang gelombang sekitar 280 nm dapat digunakan untuk mengetahui konsentrasi protein dalam larutan.

Enzim proteolitik intraseluler memainkan peran penting dalam metabolisme dan proses regulasi pada sel hewan, tumbuhan dan mikroorganisme, selain itu juga berperan dalam fungsi fisiologis lainnya misal respon imun dan inflamasi (Naiola & Widyastuti, 2007). Jenis protein yang terlibat pada kerusakan jaringan adalah protease serin (elastase neutrofil). Plasmin dan matrix metallo proteinase (Barr, 2011). Neutrofil merupakan salah satu sel yang berperan pada proses inflamasi. Protease yang tersimpan dalam neutrofil disebut protease serin neutrofil seperti *cathepsin G*, proteinase dan neutrofil elastase. Ketiga protease ini berfungsi sebagai pertahanan anti mikroba dengan mekanisme penelanan mikroorganisme di dalam fago lisosom neutrofil (Segal, 2005), sedangkan neutrofil berfungsi menghancurkan mikroorganisme tetapi juga dapat merusak sel maupun jaringan inang (Weiss, 1989).

2.6 SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly-acrylamide Gel*)

Salah satu metode yang umumnya digunakan untuk analisa campuran protein secara kualitatif adalah SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*). Metode ini sering digunakan untuk menentukan berat molekul suatu protein disamping untuk memonitor pemurnian

protein. Sodium Dodecyl-Sulphate Poly-acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) merupakan standar metode pengujian terhadap berat molekul protein, struktur subunit dan kemurnian protein. Tahap pertama yang harus dilakukan untuk SDS-PAGE yaitu preparasi sampel dengan menambahkan *Reducing Sample Buffer* (RSB) pada masing-masing sampel yang bertujuan untuk merusak struktur protein. SDS memiliki sifat polar dan non polar yang dapat mengikat protein (Rantam, 2003). Fungsi dari SDS-PAGE yaitu untuk memberikan muatan negatif pada protein yang akan dianalisa. Protein yang terdenaturasi sempurna akan mengikat SDS dalam jumlah yang setara dengan berat molekul protein tersebut (Dunn, 1989). Denaturasi protein dilakukan dengan merebus sampel dalam buffer yang mengandung β -merkaptoetanol (berfungsi untuk mereduksi ikatan disulfide), gliserol dan SDS. Muatan asli protein akan digantikan oleh muatan negatif dari anion yang terikat sehingga kompleks protein- SDS memiliki rasio permuatan berat molekul yang konstan (Hames, 1987).

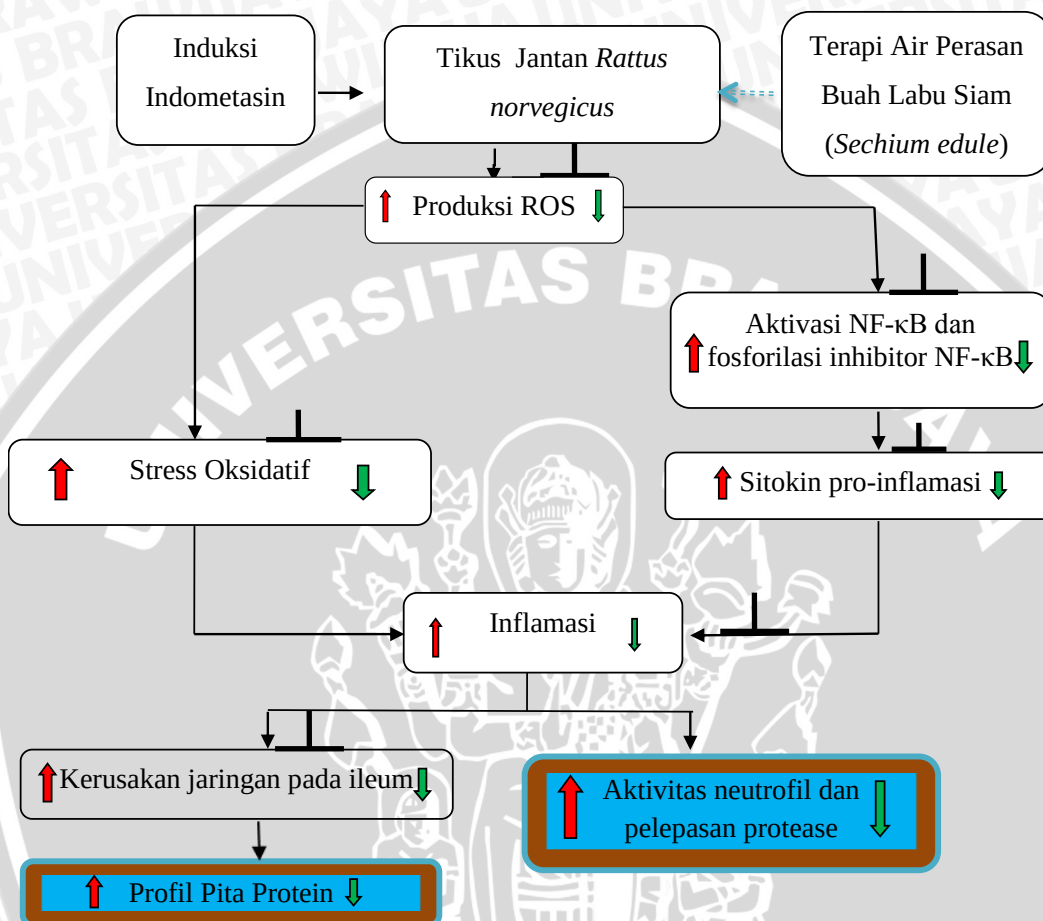
Prinsip penggunaan metode ini adalah migrasi komponen protein, metode ini sering digunakan untuk menentukan berat molekul suatu protein disamping untuk memonitor pemurnian protein. Sampel - sampel enzim yang diinjeksikan ke dalam sumur gel diberi warna dengan bromphenol biru yang dapat terionisasi. Fungsi pewarnaan adalah untuk membantu memonitor jalannya elektroforesis. Berat molekul protein dapat diketahui dengan membandingkan R_f protein dengan protein standar yang berat molekulnya telah diketahui. SDS-PAGE banyak digunakan untuk mengetahui tingkat kemurnian suatu protein, penentuan berat molekul, untuk mengetahui komposisi subunit dari protein, juga kadang dapat

digunakan untuk menyusun kembali suatu protein, dan dapat digunakan untuk pembelajaran pada bidang spektrometri dan proteomic.

Terdapat dua wilayah pada gel SDS-PAGE, bagian wilayah atas adalah *stacking gel* (gel pengumpul) dimana protein akan ditekan ke bawah menuju lapisan tipis melalui arah migrasi katoda ke anoda. Hal ini terjadi karena *stacking gel* mengandung ion Cl^- (klorin) yang memiliki kecepatan migrasi lebih cepat dibandingkan migrasi protein sampel, juga adanya ion *glycine* dari larutan buffer yang memiliki kecepatan lebih lambat, sehingga molekul protein akan terperangkap diantara dua ion tersebut. Selanjutnya molekul protein masuk ke wilayah bawah atau *resolving gel*, dimana gel ini memiliki pori-pori yang lebih kecil dibandingkan *stacking gel* dikarenakan memiliki pH yang lebih tinggi dan konsentrasi garam yang tinggi. Pada wilayah ini, ion *glycine* akan diionisasi oleh gradient voltase yang dialiri ke dalam gel, sehingga menyebabkan molekul molekul protein terpisah tergantung pada ukuran dan berat molekul (Wilson & Walker, 2000).

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 3.1 kerangka konsep penelitian

Keterangan :

- : Variabel yang diteliti
- ↓ : Pengaruh induksi Indometasin
- ⊥ : Menghambat
- ↑ : Efek induksi indometasin pada tikus
- ↓ : Efek terapi air perasan buah labu siam

Indometasin merupakan salah satu NSAID yang dapat menimbulkan IBD, indometasin yang masuk dalam tubuh akan dikenali oleh makrofag dan akan di fagositosis, di dalam proses proses fagositosis akan menghasilkan ROS. Oksigen reaktif yang terlepas menyebabkan ketidakseimbangan antara radikal bebas sehingga menimbulkan stress oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan ileum.

Perasan buah labu siam mengandung senyawa flavonoid yang merupakan salah satu senyawa antioksidan. Senyawa flavonoid sebagai antioksidan berperan dalam menekan efek ROS yang berlebih dengan cara mendonasikan atom hidroksil. Diredamnya ROS maka NF-kB dan fosforilasi inhibitor NF-kB serta sitokin pro-inflamasi tidak teraktivasi. Proses inflamasi tidak terjadi lagi sehingga aktivasi neutrofil serta pelepasan enzim protease menurun serta terjadi perbaikan profil pita protein ileum

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka dapat disusun hipotesis sebagai berikut :

1. Perasan buah labu siam dapat menurunkan aktivitas protease ileum *Rattus norvegicus* yang terpapar indometasin.
2. Terdapat perbedaan perbaikan gambaran profil protein ileum *Rattus norvegicus* yang terpapar indometasin dengan yang mendapat terapi perasan buah labu siam (*Sechium edule*).

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2013 – Januari 2014.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar berumur 8 – 12 minggu. Berat badan tikus berkisar antara 150 – 200 gram.

Hewan coba diadaptasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008) :

$$t(n-1) \geq 15$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk perlakuan sejumlah 4 kelompok maka minimal dilakukan 5 kali ulangan, maka diperlukan 20 ekor tikus.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental yang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi empat kelompok perlakuan, yakni kelompok kontrol, kelompok IBD, kelompok terapi labu siam dosis 10 gram, dan kelompok terapi labu siam dosis 20 gram. Kelompok kontrol merupakan tikus tanpa perlakuan. Masing – masing kelompok perlakuan terdiri atas lima ekor tikus sebagai ulangan.

4.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas	: Induksi Indometasin dan terapi buah labu siam
Variabel tergantung	: Aktivitas protease dan profil protein ileum
Variabel kendali	: Umur, berat badan, jenis kelamin, Tikus strain Wistar, pakan dan minum.

4.5 Materi Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), indometasin dengan dosis 15mg/kilogram berat badan tikus, air perasan buah labu siam dosis 10 gram/ekor tikus dan dosis 20 gram/ekor tikus, minyak jagung, aquades, PBS – Azida, *Formaldehyde*, NaCl, KCl, PFA, NaCl Fisiologis 0,9 %, Na-thiol, *Tri Chloro Acetic Acid* (TCA), HCl 1 N, parafin, *xylol*.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tabung reaksi, seperangkat alat bedah, labu takar (100 mL, 500 mL, dan 1.000 mL), gelas ukur 500 mL, pipet tetes, pengaduk kaca, mortar, aluminium foil, tabung *microtube*, rak tabung reaksi, mikropipet (10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, dan 1.000 μ L), pengaduk kaca, penangas air, *waterbath*, lemari pendingin, seperangkat alat sentrifugasi, *vortex*, timbangan digital, spektrofotometri UV, stirer, plastik klip, *blue tip*, *yellow tip*, pH meter digital, sarung tangan, pisau, mikroskop cahaya, *autoclave*, spuit.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Preparasi Hewan Coba

Tikus yang digunakan sebagai hewan coba diadaptasikan selama 1 minggu. Tikus dibagi dalam 4 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri atas 5 ekor tikus. Dikandangkan pada kandang berukuran 17,5 x 23, 75 x 17,5 cm. Jumlah tikus disesuaikan dengan ukuran kandang yang digunakan. Kandang terletak pada tempat yang bebas dari bising dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya.

Lantai kandang mudah dibersihkan dan didesinfeksi. Suhu optimum ruangan berkisar antara 22 – 24⁰C dan kelembaban 50% - 60% dengan ventilasi cukup. Tikus dipelihara di *animal room*, Laboratorium Molekuler Seluler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang. Pakan tikus yang diberikan berupa konsentrat dengan komposisi air maksimal 12%, protein kasar minimal 16%, lemak kasar 3 - 7%, serat kasar maksimal 8%, abu maksimal 10%, kalsium 0,9 - 1,2%, dan fosfor 0,6 - 1%. an minumnya berupa air secara *ad libitum*.

4.6.2 Persiapan Hewan Model IBD dengan Indometasin

Persiapan hewan coba model IBD dengan cara induksi indometasin 15mg/kg BB tikus. Berat rata-rata tikus yang digunakan 160 gram, sehingga diperlukan 2,25 mg indometasin. Untuk membuat larutan stok indometasin maka 45 mg indometasin dilarutkan dalam 4 ml pelarut minyak jagung. Banyaknya larutan yang diperlukan untuk pemberian peroral adalah :

$$\text{Kebutuhan indometasin} = 15\text{mg/kg BB} \times 0,16\text{kg} = 2,4\text{mg/ekor}$$

$$\begin{aligned}\text{Pengenceran indometasin dengan minyak jagung} &= 2,4 \text{ mg}/45 \text{ mg} \times 4 \\ &\text{ml} = 0,213 \text{ mL/ekor}\end{aligned}$$

Indometasin diberikan secara per oral. Sebelum diberikan pada tikus, indometasin dilarutkan terlebih dahulu dengan minyak jagung. Minyak jagung ini berfungsi sebagai pelarut. Indometasin yang sudah dihitung dosisnya, tambahkan dengan minyak jagung secukupnya.

Setelah itu divortex, yang berguna untuk melarutkan indometasin. Induksi indometasin ini dapat mengakibatkan kerusakan sel – sel pada daerah intestin. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam.

4.6.3 Tata Laksana Pemberian Air Perasan Labu Siam Per Oral

Dosis pemberian perasan labu siam yaitu 20 gram/tikus dan 10 gram/tikus. Masing – masing dosis terapi terdapat 5 ekor tikus. Sebelum dilakukan pemerasan, buah labu siam terlebih dahulu dihilangkan kandungan saponinnya .

Saponin dihilangkan dengan cara membelah buah labu siam menjadi dua bagian, selanjutnya kedua bagian tersebut digosok – gosokkan hingga keluar buih berwarna putih pada buah labu siam.

Lalu buah labu siam dikupas kulitnya, direndam dalam air selama 10 menit, dan dikeringanginkan selama 10 menit. Selanjutnya buah labu siam ditimbang sesuai pemberian kemudian diparut dan diperas, kemudian air perasan buah labu siam dimasukkan dalam gelas ukur dan diendapkan sampai terbentuk dua lapisan. Setelah diendapkan, air perasan yang berwarna bening diambil dan disondekan sebanyak 2 ml pada tikus setiap pagi satu kali sehari selama 14 hari.

4.6.4 Pengambilan Organ Ileum

Tikus di bedah dengan cara dislokasi leher, posisikan tikus pada papan bedah menggunakan pins, bedah mulai organ abdomen kemudian di ambil organ-organnya seperti ileum. Organ Ileum dipotong kecil-kecil dengan menggunakan gunting bedah, ditambah larutan PBS-Tween : PMSF (9 : 1) sebanyak 1 mL, ditambah sedikit pasir kuarsa, dan digerus dengan mortar dingin yang diletakkan diatas balok es. Setelah itu homogenat ditambah dengan larutan PBS-Tween : PMSF (9 :1) sebanyak 2 mL dan dipindahkan ke dalam tabung polipropilen yang telah disterilisasi dengan autoclave. Kemudian dihomogenkan dengan vortex, sonikator selama 10 menit dan disentrifugasi selama 15 menit (6000 rpm). Selanjutnya supernatannya diambil dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan. Setelah itu disentrifugasi selama 15 menit (10.000 rpm), diambil endapannya dan dikeringkan sampai bau etanol hilang. Kemudian endapan ditambah dengan

larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,5 dingin dengan perbandingan volume 1:1 (Walter, 1984).

4.6.5 Penentuan Aktivitas Protease

4.6.5.1 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Langkah awal dalam pembuatan kurva baku tirosin yaitu disiapkan 10 labu ukur dan masing-masing diisi larutan baku tirosin 20 ppm 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10mL untuk konsentrasi 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 ppm. Selanjutnya ditambah akuades sampai tanda batas kemudian tabung ditutup dengan alumunium foil lalu dikocok. Selanjutnya diukur absorbansinya pada masing-masing konsentrasi larutan baku pada panjang gelombang maksimum. Blanko yang digunakan adalah akuades.

4.6.5.2 Pengukuran Aktivitas Protease Hasil Isolasi dari Ileum

Langkah awal yang harus dilakukan adalah mencampurkan kasein 500 ppm sebanyak 200 μ L, 300 μ L larutan buffer fosfat pH 7 dan 100 μ L enzim protease lalu didiamkan 60 menit pada suhu 37°C di atas inkubator. Kemudian ditambahkan 400 μ L larutan TCA 4% didiamkan selama 30 menit pada suhu 27°C (suhu kamar).

Selanjutnya diputar dengan alat sentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil 100 μ L dan diencerkan 5 kali volume sampel dengan bufer fosfat lalu diukur nilai absorbansinya pada λ maks tirosin sebesar 275 nm. Blanko yang digunakan dibuat dengan prosedur sama dengan penentuan aktivitas, tetapi untuk perlakuan penambahan TCA dilakukan secepatnya setelah penambahan larutan enzim.

Pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan berdasarkan metode

walter (1984) menggunakan rumus :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times f_p$$

Dimana : v = volume total sampel (mL)

q = waktu inkubasi (mL)

f_p = faktor pengenceran

p = jumlah enzim (mL)

4.7 Elektroforesis SDS-PAGE

4.7.1 Persiapan Gel

Pada persiapan gel, langkah pertama plat gel dibuat dengan merangkai dua plat kaca dengan jarak antar plate kurang lebih 1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat sampel (*Stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*Separating gel*). *Separating gel* dibuat dari Lower Gel Buffer (LGB), T-Acryl, akuades, *ammonium persulphate* (APS), N, N, N', N', - *tetramethyl ethylene diamine* (TEMED) yang dilarutkan menjadi satu dalam akuades steril.

Lalu, dituangkan secara hati-hati ke dalam tempat lapisan gel menggunakan mikropipet dan dibiarkan 10-30 menit hingga terbentuk gel. Berikutnya *stacking gel* dituang diatas *separating gel* yang telah memadat sambil dipasang sisir hingga terbentuk gel berikut sumurannya. *Stacking gel* dibuat dari *Upper Buffer*, T-Acryl, APS, TEMED dan dilarutkan menjadi satu dalam akuades steril. Setelah terbentuk gel, sisir diangkat dengan hati-hati dan plate dipasang pada alat elektroforesis, dan dituangkan larutan *running buffer* dituangkan pada bejana elektroforesis.

4.7.2 Injeksi Sampel dan Running

Ekstrak kasar hasil isolasi dari ileum diambil 150 μ l, ditambahkan 150 μ l *Reducing Sampel Buffer* (RSB), dan dipanaskan pada penangas air dengan temperatur 100°C selama 3 menit.

Setelah didinginkan sampel dimasukkan dalam sumur-sumur gel dengan volume 20 μ l untuk tiap sumur, dimana salah satu sumuran gel diisi dengan protein standar marker. Selanjutnya, anoda dihubungkan pada reservoir bawah dan katoda dihubungkan pada reservoir atas dan dihubungkan *power supply* dengan arus listrik sebesar 30mA dan 130 V selama 1-2 jam. Dihentikan proses ini jika warna penanda biru berada kurang lebih 0,5 cm dari batas bawah plat gel.

4.7.3 Perlakuan Setelah Running

Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *staining* selama 30-60 menit dengan dikocok menggunakan shaker. Menghilangkan warna dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *destaining* sambil dikocok menggunakan shaker sampai gel menjadi jernih.

4.7.4 Penentuan Berat Molekul

Dengan membandingkan hasil elektroforesis sampel dengan marker protein maka dapat diketahui jenis-jenis protein dalam ekstrak kasar enzim tersebut. Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai R_f (*Retardation factor*) dari masing-masing pita dimana :

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal (cm)}}{\text{jarak pergerakan warna dari tempat awal (cm)}}$$

Kemudian dibuat kurva standar dengan harga R_f sebagai sumbu X dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu Y, kemudian diplotkan mobilitas dan berat molekul dari protein yang akan dicari sehingga diketahui berat molekulnya.

4.7.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan Analisis Ragam ANOVA dan uji lanjutan BNJ dengan $\alpha = 0.05$ untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan pada aktivitas protease sedangkan SDS PAGE menggunakan analisa deskriptif (Kusriningrum, 2008).



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh induksi indometasin terhadap aktivitas protease pada ileum tikus (*Rattus norvegicus*)

Pengukuran aktivitas protease dilakukan untuk mengetahui tingkat keparahan suatu inflamasi pada ileum akibat induksi indometasin dengan dosis 15mg/kg BB dan setelah pemberian terapi labu siam. Unit aktivitas protease didefinisikan sebagai banyaknya mikro mol tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis ikatan peptida pada kasein oleh protease hasil isolasi ileum tikus (*Rattus norvegicus*) pada kondisi optimum yaitu pH 6,5, suhu 37°C dan waktu inkubasi 60 menit (Ranuh, 2008). Hasil dari pengukuran aktivitas protease pada ileum tikus (*Rattus norvegicus*) pada tikus perlakuan ditunjukkan pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Aktivitas protease pada ileum Tikus *Rattus norvegicus*

Perlakuan	Rata – rata Aktivitas Protease (Unit) $\mu\text{mol.mL/menit}$	Peningkatan Aktivitas Protease (%) Terhadap Kontrol Negatif	Penurunan Aktivitas Protease (%) Terhadap Kontrol Positif
Kontrol	$0,045 \pm 0,0464^a$	-	-
Tikus IBD	$0,183 \pm 0,0281^c$	306,667	-
Terapi labu siam 10 g/tikus	$0,132 \pm 0,0648^b$	-	27,87
Terapi labu siam 20 g/tikus	$0,097 \pm 0,6088^a$	-	46,95

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

Hasil analisis statistika menunjukkan bahwa pemberian terapi dapat menurunkan aktivitas protease ($P < 0,05$) yang dilanjutkan dengan uji BNT (Beda

Nyata jujur) dihasilkan notasi yang berbeda yang menunjukkan adanya perbedaan antar perlakuan (**Tabel 5.1 dan Lampiran 13**). Dosis 20 g/tikus merupakan dosis terbaik yang mampu menurunkan aktivitas protease sebesar 46,95%. Nilai aktivitas protease pada kelompok tikus kontrol sebesar $0,0454 \pm 0,0464$ $\mu\text{mol/mL.menit}$ digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan atau penurunan yang terjadi karena pengaruh perlakuan. Enzim protease secara normal terdapat dalam jaringan tubuh yang berperan dalam pertahanan tubuh yaitu pemecahan protein asing yang masuk dalam tubuh. Protease juga berperan pada perkembangan sel yaitu pada perakitan kolagen dari prokolagen, proliferasi sel yaitu kontrol proteolitik pada kematian sel yang terprogram (apoptosis).

Kelompok tikus yang diinduksi indometasin 15 mg/kg BB mempunyai nilai aktivitas protease tertinggi yaitu $0,183 \pm 0,0281$ $\mu\text{mol/mL.menit}$ jika dibandingkan dengan nilai aktivitas protease kelompok terapi 10 gram/tikus yaitu $0,132 \pm 0,0648$ $\mu\text{mol/mL.menit}$ dan kelompok terapi 20 gram/tikus yaitu $0,097 \pm 0,6088$ $\mu\text{mol/mL.menit}$.

Nilai aktivitas protease pada kelompok tikus yang diinduksi indometasin meningkat sebesar 307% daripada kelompok kontrol, hal ini diduga karena adanya induksi indometasin pada hewan coba dapat menyebabkan terjadinya proses inflamasi ileum tikus sehingga akan mengaktivasi sel-sel inflamasi serta pelepasan enzim protease. Menurut Allard *et al.*, 2014 bahwa dalam keadaan inflamasi terjadi peningkatan infiltrasi sel-sel inflamasi yang dapat melepaskan enzim protease.

Indometasin dapat menyebabkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) meningkat sehingga menyebabkan kerusakan ileum (Strus *et al.*, 2009). Adanya ROS yang berlebih dapat mengaktivasi NF- κ B pada sel sehingga menyebabkan inflamasi serta meningkatkan aktivasi neutrofil. Neutrofil yang teraktivasi akan menghasilkan protease sebagai respon terhadap adanya inflamasi (Zhang *et al.*, 2001, Campbell *et al.*, 2006). Oleh karena itu pengukuran aktivitas protease bisa digunakan untuk mengukur tingkat keparahan inflamasi, semakin tinggi nilai aktivitas protease maka semakin parah keadaan inflamasi dan akan mempengaruhi perubahan profil protein.

Pemberian terapi perasan buah labu siam dengan dosis 10g/tikus menurunkan aktivitas protease yaitu sebesar $0,132 \pm 0,0648$ $\mu\text{mol/mL.menit}$ dan pada terapi 20g/tikus sebesar $0,097 \pm 0,6088$ $\mu\text{mol/mL.menit}$. Penurunan aktivitas protease pada terapi 10g/tikus dan 20g/tikus menunjukkan hasil berbeda nyata dengan kelompok IBD.

Penurunan aktivitas protease dalam penelitian ini diduga karena kandungan flavonoid yang terdapat pada perasan buah labu siam. Senyawa flavonoid pada perasan buah labu siam dapat menghambat radikal bebas pada penyakit *Inflammatory Bowel Disease*. Menurut Suhartono (2002) antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat memberikan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam. Hasil pengujian LCMS (**Lampiran 14**) menunjukkan bahwa dalam buah labu siam terdapat kandungan flavonoid yang merupakan salah satu dari antioksidan, yaitu orientin, asphalathin, luteolin, isoquercitrin dan daidzin. Antioksidan merupakan

senyawa yang mampu menghambat reaksi oksidasi atau zat yang mampu menetralkan radikal bebas (Widjaya, 2003). Antioksidan dibagi menjadi dua kelompok yaitu antioksidan non enzimatik yang didapat dari luar tubuh seperti flavonoid dan antioksidan enzimatik yang didapat didalam tubuh. Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman yang berfungsi sebagai penangkap radikal bebas sehingga mampu menekan pelepasan enzim protease sebagai mediator inflamasi.

Flavonoid merupakan senyawa fenolik yang berkhasiat sebagai antioksidan. Flavonoid menghambat kerja enzim yang terlibat dalam reaksi produksi anion superoksida (O_2^*) dengan mengikat senyawa yang menghasilkan radikal bebas. Flavonoid dapat menangkap radikal bebas dengan jalan reduksi senyawa radikal bebas sehingga menjadi senyawa yang stabil. Mekanisme lain dengan menyediakan sisi untuk mengikat radikal bebas (Simamora, 2009).

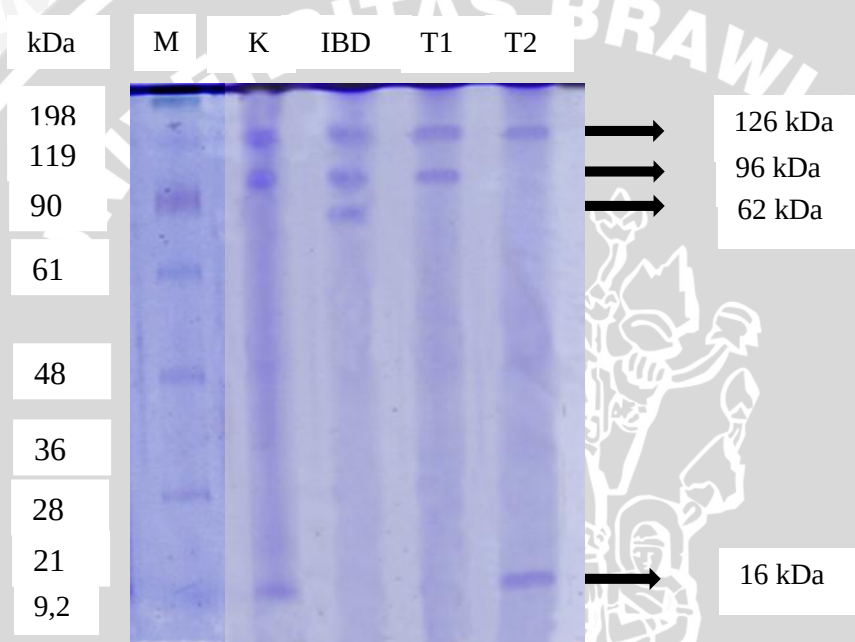
Flavonoid yaitu senyawa yang dapat dengan mudah menghambat radikal sehingga mampu mencegah stres oksidatif di dalam sel serta menurunkan peningkatan enzim protease pada jaringan (Danilhelova, *et al.*, 2013). Hal tersebut didukung oleh penelitian (Alam, *et al.*, 2010) bahwa jika radikal bebas berkurang, maka tidak akan terjadi stres oksidatif dan aktivitas protease akan menurun karena tidak terjadi kerusakan protein. Mekanisme hambatan yang dilakukan flavonoid sebagai antioksidan berfungsi untuk menetralkan efek toksik dari radikal bebas seperti ROS.

Penghambatan radikal bebas ini akan menekan terjadinya peroksidasi lipid, sehingga akan menurunkan aktivitas protease dan kerusakan jaringan pada ileum dapat ditekan. Karena itulah tidak terjadi peningkatan aktivitas enzim protease pada kelompok terapi saat diinduksi indometasin. Hal ini dapat membuktikan kemampuan perasan buah labu siam ini mampu menekan terjadinya inflamasi di ileum tikus (*Rattus norvegicus*).

Mekanisme kerja dari flavonoid yaitu mampu mendonasikan atom hidrogen dari gugus hidroskil (OH) kepada radikal bebas (R^*) sehingga flavonoid berubah menjadi radikal fenoksil flavonoid (Gambar 5.1). Sedangkan radikal fenoksil memiliki ikatan rangkap terkonjugasi sehingga tidak menimbulkan radikal bebas dan lebih stabil. Flavonoid juga efektif sebagai *scavenger* radikal peroksil (ROO^*) yang akan diregenerasi menjadi $ROOH$, dan radikal hidroksil (OH^*) akan diregenerasi menjadi H_2O . Hasil regenerasi tersebut bersifat lebih stabil (Astuti, 2008).

5.2 Pengaruh induksi indometasin terhadap profil protein ileum tikus (*Rattus norvegicus*)

Profil protein hasil SDS PAGE menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara profil protein pada ileum tikus kontrol, tikus IBD dan setelah mendapatkan terapi perasan buah labu siam (*Sechium edule*) selama 2 minggu dengan dosis 10 g/tikus dan 20 g/tikus secara per oral.



Gambar 5.1 Profil Pita Protein Ileum (SDS PAGE 12%)

Keterangan :

M : Marker

K : Kontrol

IBD : Sakit

T₁ : Terapi 10 g/tikus

T₂ : Terapi 20 g/tikus

Gambar 5.1 untuk menunjukkan adanya perbedaan pita protein yang muncul pada masing – masing perlakuan tikus yang di jelaskan pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Perbedaan Berat Molekul (BM) Profil Protein

Sumuran	Berat Molekul (BM) Protein (kDa)			
	126	96	62	16
Kontrol	√	√	-	√
Tikus IBD	√	√	√	-
Terapi 10g/tikus	√	√	-	-
Terapi 20g/tikus	√	-	-	√

Protein dengan berat molekul 126 kDa dan 96 kDa diduga sebagai *heat shock protein* (HSP). Protein 126 kDa muncul pada kelompok kontrol, IBD, terapi 10 g/tikus dan 20g/tikus. Sedangkan protein 96 kDa hanya muncul pada kelompok kontrol, tikus IBD dan terapi 10g/tikus tetapi tidak muncul pada terapi 20g/tikus. HSP merupakan protein mitokondrial yang ditemukan pada permukaan sel yang diekspresikan oleh organisme prokariot maupun eukariot (Wick *et al.*, 2001; Benagiano *et al.*, 2005; Okada *et al.*, 2007). HSP memiliki fungsi yang beraneka ragam dalam keadaan normal maupun stress (Mandal *et al.*, 2004). HSP berperan dalam mempertahankan berbagai macam protein seluler pada bentuk lipatan fungsionalnya (Moseley, 2000; Lamb *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2007). Dalam keadaan normal maupun stress, HSP memfasilitasi pembentukan lipatan protein baru, melarutkan kembali agregat protein, memperbaiki atau mencegah degradasi dari denaturasi protein, membantu pelipatan kembali protein yang sudah didenaturasi, membantu dalam transport molekular masuk ke membran intrasel, dan meningkatkan kemampuan sel untuk bertahan dari rangsangan stress (Mandal

et al., 2004). Secara fisiologi, HSP dikeluarkan dalam jumlah sedikit dan bertujuan untuk melindungi sel dari apoptosis (Fan *et al.*, 2005). Profil pita protein 96 kDa yang tidak muncul setelah pemberian terapi perasan buah labu siam (*Sechium edule*) dengan dosis 20g/tikus, karena flavonoid bertindak sebagai anti - inflamasi yang mampu memperbaiki inflamasi. Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat reaksi oksidasi atau zat yang mampu menetralkan radikal bebas berupa flavonoid pada *Inflammatory Bowel Disease* (Widjaya, 2003). Profil protein 96 kDa adalah suatu protein yang dihasilkan karena adanya *Heat Shock Respons* (HSR). Meningkatnya ekspresi *Heat shock proteins* berperan sebagai anti inflamasi pada ileum dalam menghambat NF- κ B. NF- κ B merupakan faktor transkripsi yang mengatur ekspresi sel – sel sitokin proinflamator (Petrof *et al.*, 2004). Sedangkan menurut Suheryanto & Elisa (2010), oleh karena enzim merupakan protein, maka munculnya ekspresi protein mengindikasikan adanya perubahan pada profil protein.

Gambar 5.1 menunjukkan adanya protein 62 kDa diduga jenis protein *Vasoactive intestinal polypeptide* (VIP) yang memiliki 60 – 62 kDa. Protein tersebut muncul pada saat inflamasi karena pemberian indometasin dengan dosis 15mg/kg BB dan mengakibatkan kerusakan mukosa pada ileum karena ileum untuk menyerap sari makanan. Gangguan gastrointestinal terjadi karena stres oksidatif dari ileum yang menyebabkan inflamasi dan aktivitas enzim protease meningkat. Peningkatan enzim protease yang berlebih mampu merusak kerja ileum sehingga terjadi kerusakan enzim-enzim pencernaan.

Menurut Lanas dan Scarpignato (2006) pemberian obat-obatan NSAIDs seperti indometasin dengan dosis 15 gram/kg BB dapat menyebabkan kerusakan vili dan mukosa di usus. Inflamasi dan eksudasi dapat terjadi akibat infeksi bakteri atau bersifat non infeksi seperti (IBD) (Manatsathit S *et al.*, 2002). Pada kelompok terapi tidak diproduksi *Vasoactive intestinal polypeptide* karena dalam kelompok ini sudah mendapat terapi perasan buah labu siam yang mengandung flavonoid.

Tikus kontrol dan terapi labu siam 20 g/tikus merupakan kelompok terapi yang mendapat terapi optimal yang muncul 16 kDa diduga *small heat shock protein* yang beranggotakan protein dengan berat molekul antara 15-30 kDa (Garrido, 2006). Protein ini akan menghambat kerja enzim *cyclooxygenase* (COX1) yang akan mencegah adanya kerusakan jaringan ileum pada tikus yang terinduksi Indometasin. Setelah diberikan terapi menggunakan labu siam (*Sechium edule*) dengan dosis 20 g/tikus akan mengurangi inflamasi pada ileum. Albert *et al.*, (2002) menjelaskan bahwa ketebalan pita protein menunjukkan konsentrasi protein tersebut, dimana protein dengan intensitas yang lebih tebal memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dan akan terjadi penurunan enzim protease.

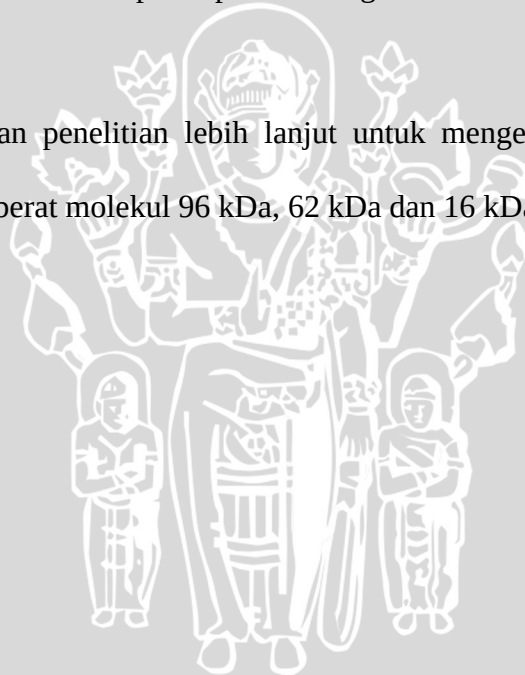
BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

1. Terapi perasan buah Labu Siam (*Sechium edule*) mampu menurunkan aktivitas protease. Dosis terapi perasan buah Labu Siam (*Sechium edule*) 20 gram/tikus adalah dosis terbaik dan mampu menurunkan aktivitas protease sebesar 46,95%.
2. Terapi perasan buah Labu Siam (*Sechium edule*) dengan dosis 20g/tikus dapat menghambat sintesis profil protein dengan BM 62 kDa.

6.2 Saran

Perlu di lakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui karakteristik profil protein dengan berat molekul 96 kDa, 62 kDa dan 16 kDa.



DAFTAR PUSTAKA

- Achkar, J.P. 2000. Inflammatory Bowel Disease. The American College of Gastroenterology. www.acg.gi.or. [11 Januari 2014]
- Alam, M.B., M.S, Hossain., and M.E, Haque. 2010. Antioxidant And Anti-Inflammatory Activities Of The Leaf Extract Of *Brassica Nigra*. Department of pharmacy, BRAC University,Dhaka, Bangladesh. *International Journal of Pharmaceutical Science Research*, 2(2): 303-310. ISSN: 0975-8232
- Allard, B., I. Bara., G. Gilbert., G. Carvalho., T. Trian., A. Ozier, J. Gilbert-Duplantier., O. Ousova., E. Maurat., M. Thumerel., J. Quignard., P. Girodet., R. Marthan., and P. Berger. 2014. Protease Activated Receptor-2 Expression and Function in Asthmatic Bronchial Smooth Muscle. *Journal PLOS One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0086945
- Astuti, S. 2008. Isoflavon Kedelai dan Potensinya Sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*, 13(2) : 126-136
- Albert. M and S.J. Edelstein . 2002. *Protein Methods*. New York : Willey--Liss.
- Amic, D.,D.D.Amic, D. Beslo, and N. Trinajstic. 2003. Structure Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Croatica Chemica Acta*. 76 (1): 55-61
- Armitage, D. 2004. *Rattus norvegicus*. Animal Diversity Web Online.at: [//animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rattus_norvegicus/](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rattus_norvegicus/). [05Maret 2014]
- Astawan, M. 2007. Pentingnya Labu Siam di Saat Hamil. http://wilystra2007.multiple.com/journal/item/63/pentingnya_Labu_Siam_diSaat_Hamil. [4 November 2014]
- Aulanni'am, A. Rosdianna. And N.L Rahmah. 2012. The Potency of *Sargassum duplicatum* Bory Extract on *Inflammatory Bowel Disease*. Therapy in *Rattus norvegicus*. *Journal of Life Sciences* 6 : 144-154
- Baratawidjaja, K. 2013. *Imunologi Dasar*. Edisi ke-10. Jakarta: Penerbit FKUI.
- Basivireddy, J., M. Jacob, R. Prabhu, A. B. Pulimood, and K. A. Balasubramanian. 2002. Indometachin-induced Free Radical Mediated Changes in The Intestinal Brush Border Membranes.*Biochem. Pharmacol*. 65: 683-695

- Besselsen, D.G. 2004. Biology of Laboratory Rodent. [terhubung berkala]. <http://www.ahsc.arizona.edu/>. [17 April 2014]
- Bures J, J. Pejchal, J. Kvetina, A. Tichy, S. Rejchrt, M. Kunes & M/ Kopacova. 2011. Morphometric Analysis of The Porcine Gastrointestinal Tract in a 10-day High Dose Indomethacin Administration With or Without Probiotic Bacteria *Escherichia coli* Nissle 1917. *Human and Experimental Toxicology* 30(12) 1955-1962
- Campbell K.J. and N.D. Perkins. 2006. *Regulation of NF-kappaB Function*. *Biochem Soc Symp.* 73:165-180.
- Danihelova, M., M. Veverka., and E. Sturdik. 2013. Inhibition Of Pathophysiological Proteases With Novel Quercetin Derivatives. Slovak University of Technology, Slovakia. *Journal Acta Chimica Slovaca*, 6(1) : 115-122. DOI: 10.2478/acs-2013-0018
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2011. Pedoman Pengendalian Tikus.<http://www.depkes.go.id/downloads/Pengendalian%20tikus.pdf>. [17 September 2013].
- Dharmika. 2006. *Inflammatory Bowel Disease: Alur Diagnosis dan pengobatannya di Indonesia*. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid 1 Edisi ke-IV. Hal 384-388. Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKUI. Jakarta
- Duke, J. A. 2003. Phytochemical and Ethnobotanical Databases. Agricultural Research Service. [Online Database] National Germplasm Resources Laboratory. Beltsville, Maryland. (<http://www.ars-grin.gov/duke>)
- Fan, G.C., X. Ren, J. Qian, Q. Yuan, P. Nicolaou, Y. Wang, W.K Jones, G. Chu, and E.G Kranias. 2005. Novel Cardioprotective Role of A Small Heat-Shock Protein, Hsp20, Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* 111 (14): 1792-9.
- Hendrich, H.J. 2006. Taxonomy Stock and Strain. *J The Laboratory Rat*:71-92
- Husada, B. 2001. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (I), Jilid 2*. Departemen Kesehatan dan Kesejahteraan Sosial Republik Indonesia. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Jolly, C., and I.R Marimoto. 2000. Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. *Journal of the National Cancer Institute*, 92 : 1564-72

- Ju, C. and J.P Uetrecht. 1998. Oxidation of a Metabolite of Indomethacin (Desmethyldeschlorobenzoylindomethacin) to Reactive Intermediates by Activated Neutrophils, Hypochlorous Acid, and The Myeloperoxidase System. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutic*. 26 (7): 676-680
- Kappelman, M., S.L. Rifas-Shiman , and K. Kleinman. 2007. The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United states. *Clin Gastrointestinal Hepatol* 5: 1424: 9
- Kaser, A., S. Zeissig, and R.S. Blumberg. 2010. Inflammatory Bowel Disease. *Annu. Rev. Immunol.*28:573-621
- Kazuhide H, E. Umegaki, T. Watanabe, Y. Yoda, E. Morita, M. Murano, S. Tokioka and T. Arakawa.2009. Present status and strategy of NSAIDs-induced small bowel injury. *J Gastroenterol* 44:879-888
- Kumar, V., S.C Ramzi, dan R.L Stanley. 2007. *Robins Buku Ajar Patologi*. Volume 1 Edisi 7. Penerbit Buku Kedokteran. EGC, Jakarta.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lamb, D.J., W. El-Sankary, and G.A.A Ferns. 2002. Molecular Mimicry in Atherosclerosis : a Role for *Heat Shock Proteins* in Immunization. *Atherosclerosis*, 167 : 177-85
- Lanas, A. and C. Scarpignato. 2006. Microbial Flora in NSAID-Induced Intestinal Damage: A Role for Antibiotics Digestion;73(Suppl.1) :136-150
- Laudanno OM, L Vasconelos, J Catalana, and J.A Cesolari.2006. Anti-Inflammatory Effect of Bioflora Probiotic Administered Orally or Subcutaneously with Liver or Dead Bacteria. *Dig Dis Sci* (2006) 51:2180-2183
- Lenny S. 2006. Senyawa Flavonoid, Fenil Propanoid, dan Alkaloid. Karya Ilmiah pada Departemen Kimia FMIPA Universitas Sumatera Utara
- Loroux, F., S. Pavlick , R.E. Wolf and M.B. Grismam. 2001. Dysregulation of Intestinal Mucosal Immunity : Implications in *Inflammatory Bowel Disease*. *New physiol Sci*. 16: 272-277
- Mandal, K., Jahangiri, and M.Q Xu. 2004. Autoimmunity to *Heat Shock Proteins* I atherosclerosis. *Autoimmunity reviews*, 3 : 31-7

- Manatsathit S, H.L Dupont, M.J.G Farthing. Guideline for the Management of Acute Diarrhea in Adults. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2002;17: S54-S71.
- Melo, EB., A.S Gomes, and I. Carvalhob. (2006). α - and β -glucosidase inhibitors: Chemical Structure and Biological Activity. *Tetrahedron*, 62, 10277–10302
- Moseley, P. 2000. Stress Proteins and the Immune Response. *Immunopharmacology*, 48 : 299-302
- Meng, X., A.M. Larissa, L.F. Anthony and N.U. Vladmir. 2009. Effect of Various Flavonoids On The α - Synuclein Fibrillation Process. Department of Chemistry, University of California. Santa Cruz. CA 95064. USA
- Montano, H.G., R.E. Davis, E.L. Dally, J.P. Pimental and P.S.T. Brioso. 2000. Identification and Phylogenetic Analitis of a New Phytoplasma from Diseased Chayote Brazil. *Plant Dis.* 85:429-436
- Naiola, E. dan N. Widyastuti. 2007. Semi Purifikasi dan Karakterisasi Enzim Protease. *Jurnal Penelitian Hayati*. 13 (51 – 56)
- Naiola, E., dan N. Widhyastuti. 2002. Isolasi, Seleksi dan Optimasi Produksi Protease dari Beberapa Isolat Bakteri. *Hayati*. 6: 467-473.
- Neuman, M.G. 2004. Signaling for Imflammation and Repair in Inflammatory Bowel Disease. *Romanian Journal of Gastroenterology*. 13(4) : 309-316
- Nuraini, A. D. 2002. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Protease dari *Bacillus Laterosporus*. [Skripsi] Fakultas MIPA. Universitas Brawijaya. Malang.
- Okada, T., K. Ayada, S. Usui, K. Yokota, J. Cui, Y. Kawahara, Y. Inaba, S. Hirohata, M. Mizuno, D. Yamamoto, S. Kusachi, E. Matsuura, and K. Oguma. 2007. Antibodies Against Heat Shock Protein 60 Derived From *Helicobacter Pylori* : Diagnostic Implications in Cardiovascular Disease. *Journal of Auitoimmunity*, 29 : 106-15
- Pan, M.H., C.S Lai, and C.T Ho. 2010. Anti-inflammmatory Activity of Natural Dietary Flavonoid. *Food Funct.* 1: 15-31
- Petrof. 2004. Probiotics Inhibit Nuclear Factor - Kappa Bandinduce Heat Shock Proteins in Colonic Epithelial Cells Through Proteasome Inhibition. *J Gastroenterology* 127:1474–1487

Priantono, H. 2005. Labu Siam Redam Hipertensi. http://cyberman.cbn.net.id/cbprtl/detail.aspxx=Hembing&y=cyber_med. [31 Agustus 2014]

Ranuh,R.,M.S. Subijanto., S. Ingrid and Aulanni'am.2008. The Role of Probiotik *Lactobacillus Plantarum* IS 20506 on Occludin and ZO-1 of Intestinal Tight Junctions Rehabilitation. Makalah Seminar Nasional Basic science Universitas Brawijaya Malang.

Roessner, A., D. Kuestera, P. Malfertheinerb, and R. Schneider-Stocka. 2008. Oxidative Stress in Ulcerative Colitis-Associated Carcinogenesis. Pathology – Research and Practice. 204: 511-524

Sahelian, R. 2006. Phytosterols (ulasan). Index of natural herbal medicine. <http://www.raysa helian.com/phytosterols.html>. [2 Juli 2014]

Segal, A. W. 2005. How Neutrophils Kill Microbes. *Annu. Rev. immunol.* 23:197-223

Simamora, A. 2009. Flavonoid dalam Apel dan Aktivitas Antioksidannya. Master Index. Universitas Kristen Krida Wacana, Jakarta.

Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine*. United of State America: Mosby. Inc. Hlm 87 -115.

Snoeck, L. H. E. H., R. N. Cornelussen., Van Nieuwenhoven, R. S. Reneman., and Van der Vusse. 2001. Heat Shock Protein and Cardiovascular Pathophysiology. *Physiological Rev* ; 81(4): 1461-85.

Solanki, R., D. Madat, K. Chauhan and L. Parmar. 2010. Recent Approaches in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *International Journal of PharmTech Research*. 2(3): 1796-1809

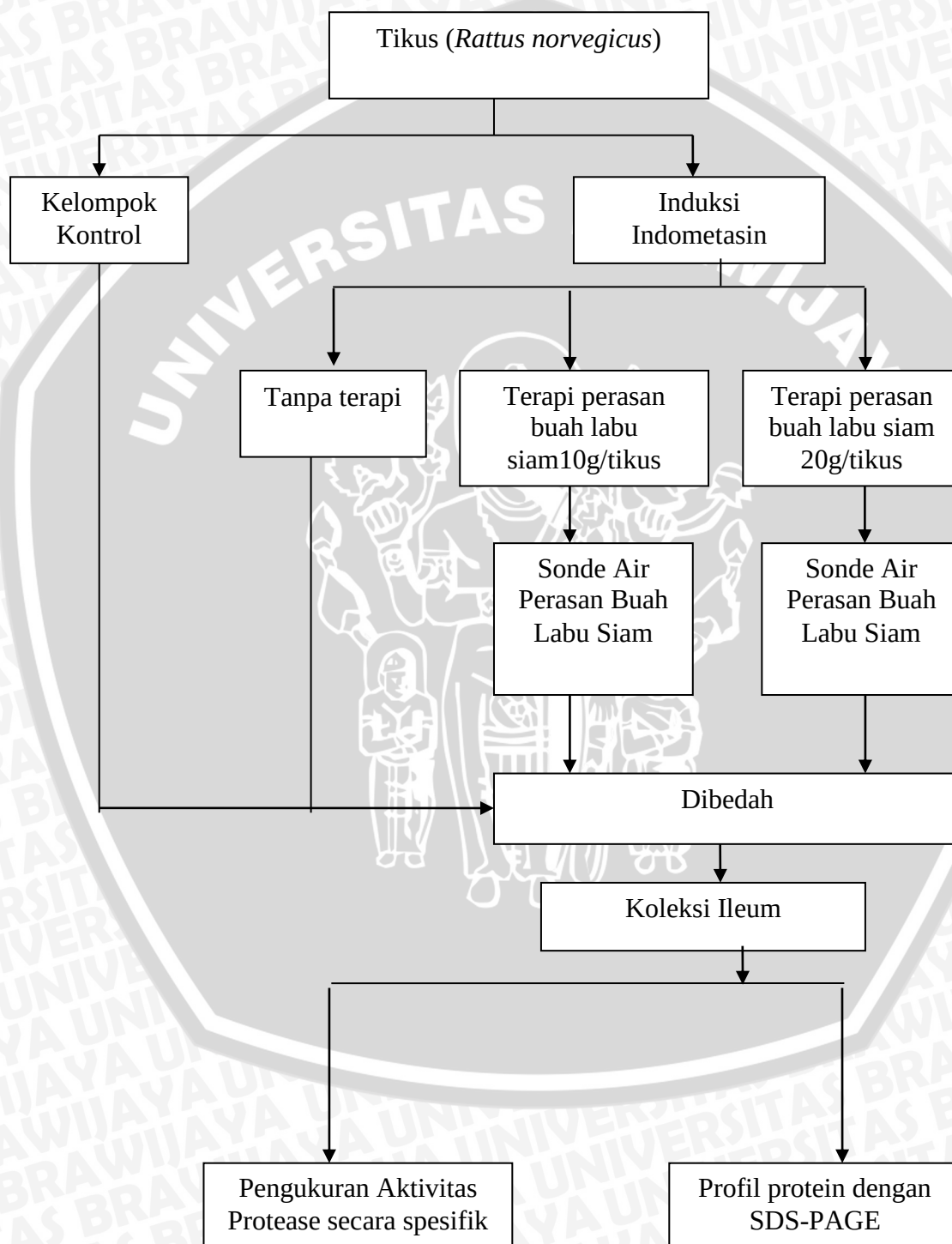
Strus, M.; T. Gosiewski; K. Fyderek; A. Wedrychowicz; K. Kowalska-duplaga; P. Kochan; P. Adamski and PB. Heczko. 2009. A Role of Hydrogen Peroxide Producing Commensal Bacteria Present in Colon of Adolescents with Inflammatory Bowel Disease in Perpetuation of The Inflammatory Process. *Journal Of Physiology and Pharmacology* 60 (6): 49-54.

Suhartono, E., Fujiati, and I. Aflanle. 2002. Oxygen Toxicity by Radiation and Effect of Glutamic Piruvat Transamine (GPT) Activity Rat Plasma After Vitamine C Treatmen, Role of COX Inhibition in Patogenesis of NSAID Induced Small Intestinal Damage. Internatinal seminar on Environmental Chemistry and Toxicology.

- Suheryanto dan E. Nurnawati. 2010. Profil Protein Bakteri Pendetoksifikasi Metilmerkuri Menggunakan Elektroforesis Gel Native. *Jurnal Kimia Indonesia*. 5 (1): 39-42.
- Takeuchi, K., A. Tanaka, R. Ohno and A. Yokota. 2003. Role of COX Inhibition in Phatogenesis of NSAID-Induced Small Intestinal Damage. Research article. Kyoto Pharmaceutical University. Kyoto
- Tanaka, A., H. Araki, Y. Komoike, S. Hase and K. Takeuchi. 2001. Inhibition of Both COX-1 and COX-2 is Required for Development of Gastric Damage in Response to *Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs*. *Journal of Physiology*. 95: 21-27
- Theoharides, T. 2009. Luteolin As A Therapeutic Option For Multiple Sclerosis. University School of Medicine and Tufts Medical Center, Boston, MA, USA. *Journal of Neuroinflammation*, 6:29 doi:10.1186/1742-2094-6-29
- Vermerris, G.H and S. Schreiber. 2006. *Phenolic Compound Biochemistry*. Spinger. Netherland
- Wick, G., H. Perschinka, and G. Millonig. 2001. Atherosclerosis as an Autoimmune Disease : an Update. *Trends in Immunology*, 22 : 665-7
- Widjaya, C.H. 2003. *Peran Antioksidan Terhadap Kesehatan Tubuh*. Healthy Choice . Edisi IV.
- Wilson K. 2000. Protein and Enzyme Techniques In Practical Biochemistry, (ed. Wilson K and Walker JM), Cambridge University Press. p.161-226.
- Williams, C. N., J. O. Uzo, and W. T. H.. Peregrine. 1993. *Produksi Sayuran di Daerah Tropika*. UGM Press. Yogyakarta
- Zhang, H.Y. 2005. Structure Activity Relationships and Rational Design Strategies for Radical Scavenging Antioxidants. *Computer Aided Drug Design*. 1 : 257 - 273.

LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. SKEMA KERJA PENELITIAN



LAMPIRAN 2. PEMBUATAN PERASAN BUAH LABU SIAM Per Hari

Buah Labu siam seberat 50 gram dan 100 gram)

- dihilangkan kandungan saponinnya (buah labu siam dibelah menjadi dua bagian, digosok – gosokkan hingga keluar buih berwarna putih).
- dikupas kulitnya,
- direndam dalam air selama 10 menit, dan dikering anginkan selama 10 menit
- Diparut dan diperas
- dimasukkan dalam gelas ukur (untuk 50 gram buah labu siam menghasilkan 30 ml perasan kemudian diendapkan selama 3 jam hingga menghasilkan lapisan endapan dan lapisan bening. Lapisan bening yang diambil 10 ml untuk 5 tikus, sedangkan untuk 100gram buah labu siam menghasilkan 60 ml perasan kemudian diendapkan selama 5 jam hingga menghasilkan lapisan endapan dan lapisan bening. Lapisan bening yang diambil 10 ml untuk 5 tikus
- disondekan sebanyak 2 ml per tikus

Perasan labu siam

LAMPIRAN 3 : PEMBUATAN STOK INDOMETASIN

Dosis indometasin yang digunakan untuk IBD yaitu 15mg/kg berat badan tikus. Indometasin dilarutkan dalam minyak jagung steril dengan perbandingan 45mg indometasin dilarutkan dalam 4 ml minyak jagung. Maka penghitungan dosis yang digunakan untuk satu ekor tikus dengan berat badan 160 gram yaitu

$$\text{Kebutuhan indometasin} = 15\text{mg/kg BB} \times 0,16\text{kg} = 2,4\text{mg/tikus}$$

Jadi untuk pemberian 15tikus ,stok indometasin yang diperlukan yaitu

$$= 15 \times 2,4$$

$$= 36\text{mg}$$

Pengenceran dengan minyak jagung (dalam 45mg diencerkan 4 ml)

$$= \frac{36\text{mg}}{45\text{mL}} \times 4\text{ml}$$

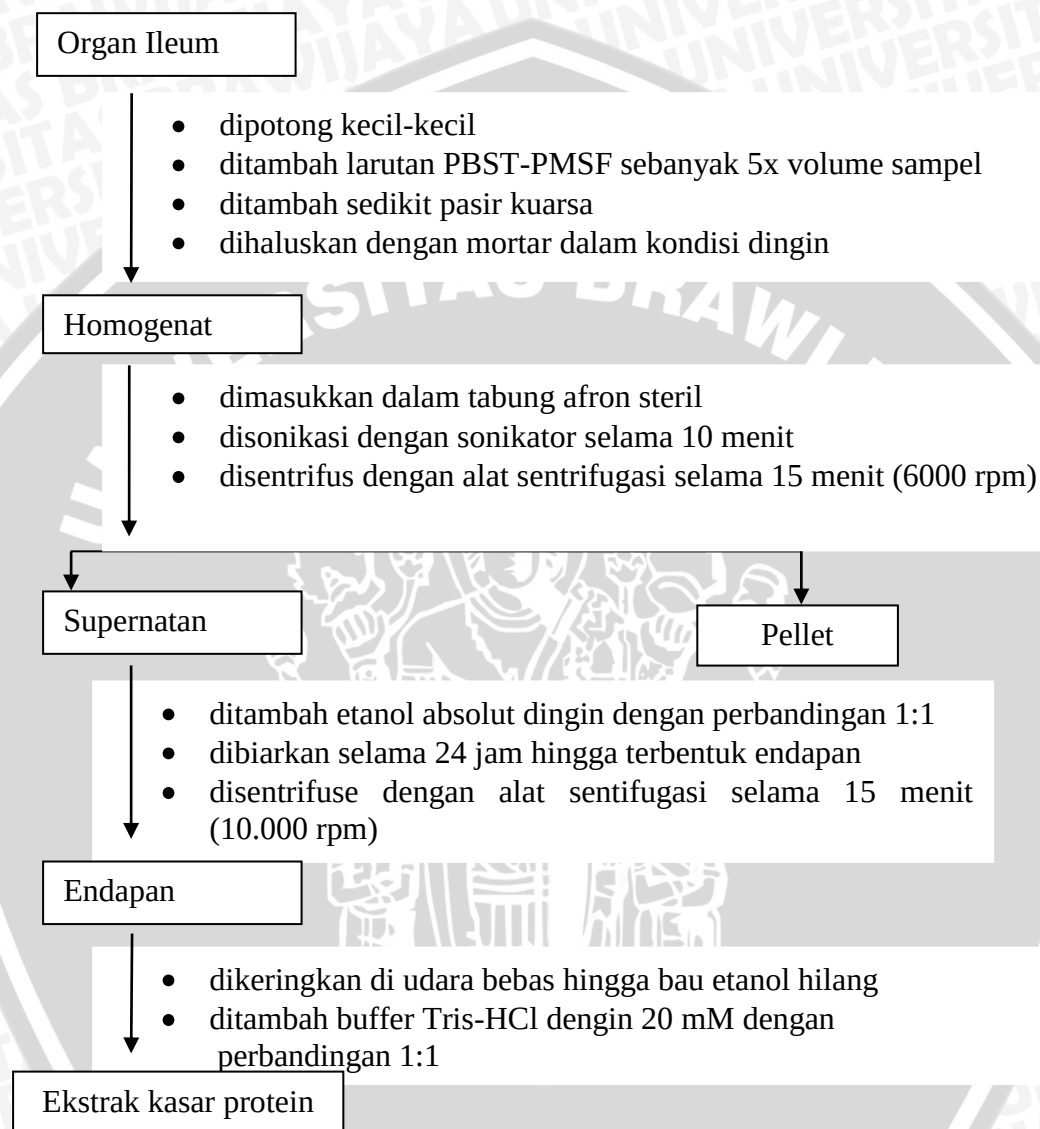
$$= 3,2 \text{ ml}$$

Jadi stok indometasin yang diperlukan yaitu 36 mg yang diencerkan dengan minyak jagung sebanyak 3,2 ml untuk 15 ekor tikus.

Induksi indometasin per ekor tikus sebanyak 0,213ml

LAMPIRAN 4. Diagram kerja pengukuran aktivitas protease

4.1 Isolasi protein



4.2 Pembuatan Larutan Kasein

0,025 g kasein

- dilarutkan dengan 25 mL akuades
- diaduk dengan pengaduk magnetik
- dipindahkan dalam labu ukur 50 mL
- diencerkan hingga tanda batas
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Larutan stok kasein 500 ppm

4.3 Pembuatan Larutan Stok Tirosin

0,025 g tirosin

- dilarutkan dengan 25 mL akuades
- diaduk dengan pengaduk magnetik
- dipindahkan dalam labu ukur 50 mL
- diencerkan hingga tanda batas
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Larutan stok tirosin 500 ppm

4.4 Pembuatan Larutan Tirosin standar

4 mL Larutan baku tirosin 500 ppm

- dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Larutan baku tirosin 20 ppm

- dipipet berturut-turut 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 mL
- dimasukkan masing-masing larutan kedalam labu ukur 10 mL
- diencerkan dengan aquades sampai tanda batas

Larutan baku tirosin 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 ppm

4.5 Pembuatan Panjang Gelombang Maksimum Tirosin

Larutan baku tirosin 20 ppm

- diukur absorbansinya pada λ maksimum tirosin

Panjang gelombang maksimum

4.6 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Larutan baku tirosin 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 ppm

- dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam eppendorf
- diukur absorbansinya pada λ maksimum tirosin 200-300 nm

Kurva Baku Tirosin

4.7 Pembuatan Larutan Blanko

Akuades steril

- dipipet 200 μ L
- dimasukkan dalam tabung reaksi
- ditambah 300 μ L larutan buffer fosfat pH 7
- ditambah 100 μ L ekstrak kasar protein
- diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit
- ditambah 400 μ L larutan TCA 4%
- didinginkan pada suhu ruang selama 30 menit
- disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit

Endapan

Supernatan

- dipipet 100 μ L
- ditambah buffer fosfat 5 kali volume sampel
- diukur serapannya pada λ maksimum tirosin 275 nm

Hasil

4.8 Pengukuran Aktivitas Protease

Larutan kasein 500 ppm

- dipipet 200 μL
- dimasukkan dalam tabung reaksi
- ditambah 300 μL larutan buffer fosfat pH 7
- ditambah 100 μL ekstrak kasar protein
- diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit
- ditambah 400 μL larutan TCA 4%
- didinginkan pada suhu ruang selama 30 menit
- disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit

Endapan

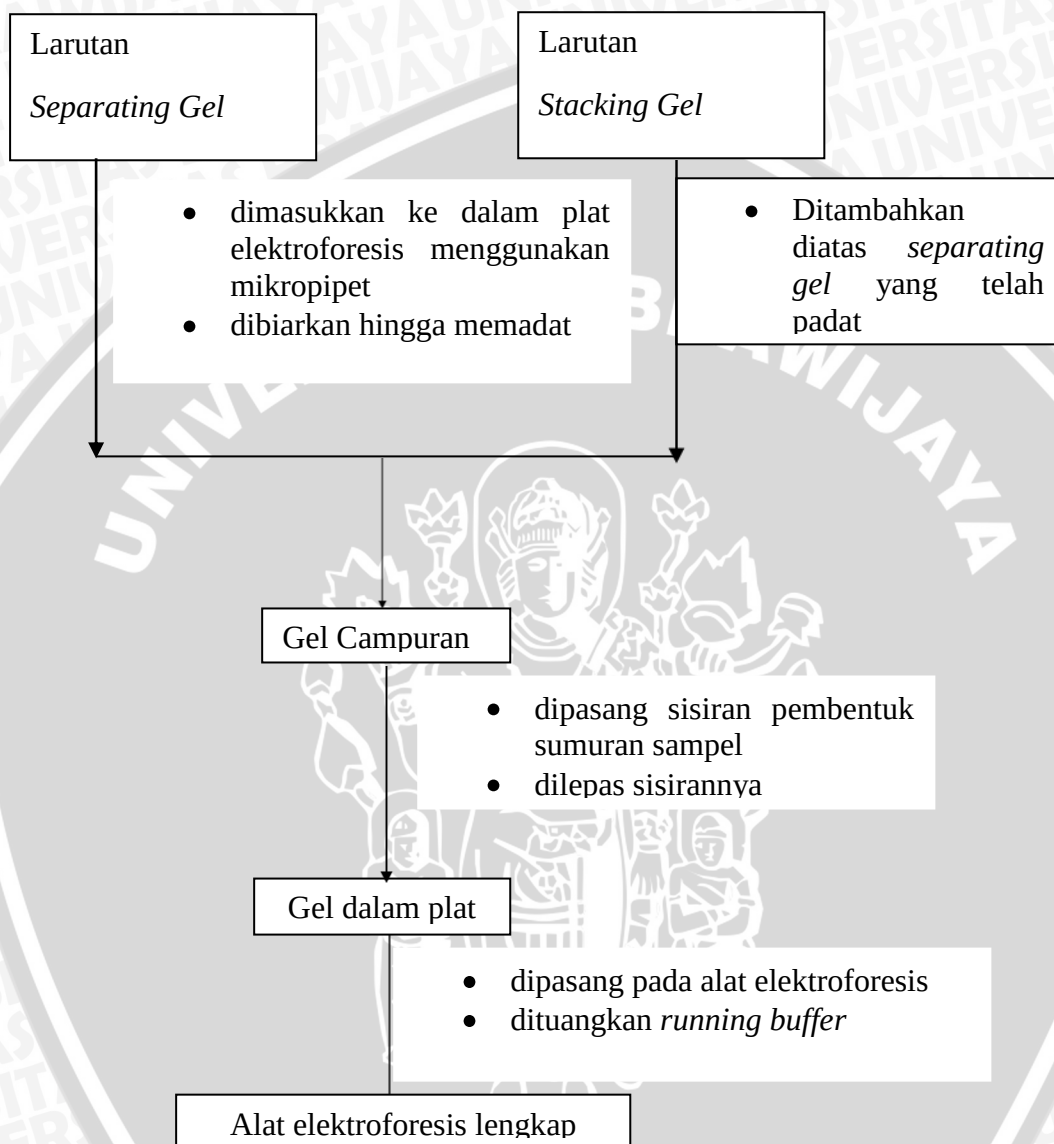
Supernatan

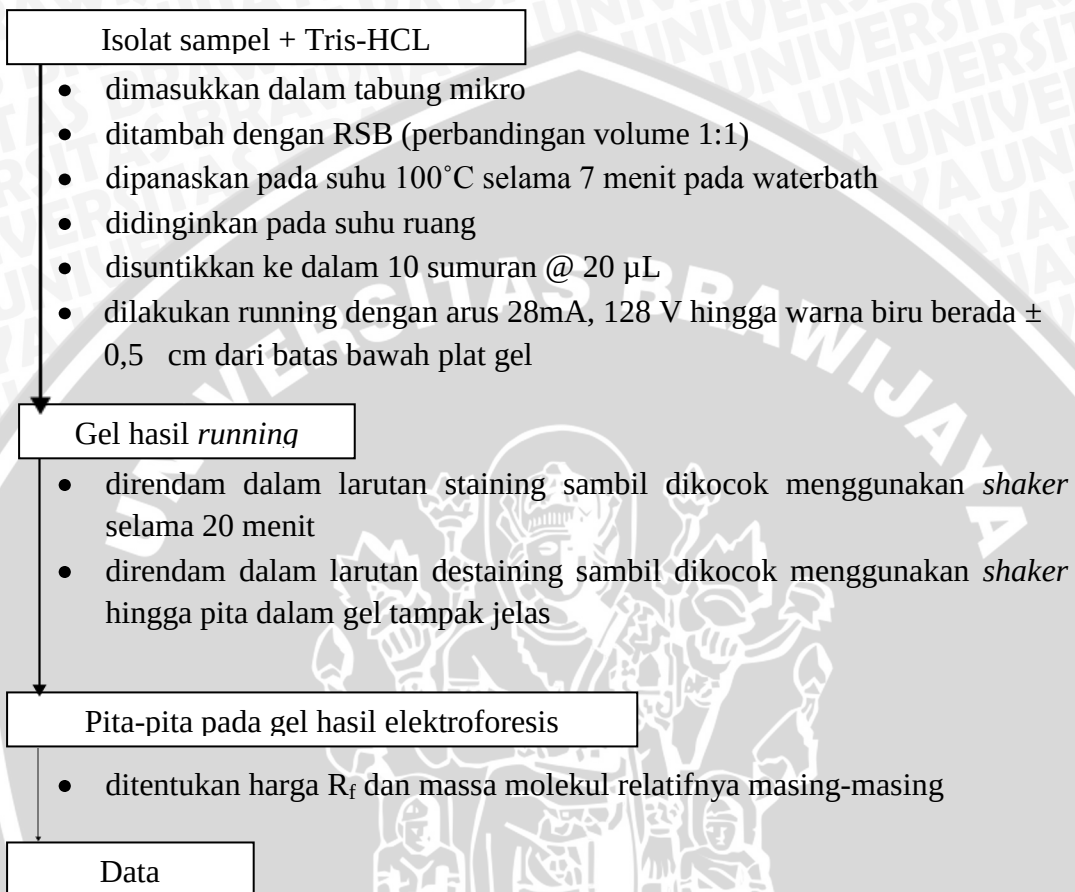
- dipipet 100 μL
- ditambah buffer fosfat 5 kali volume sampel
- diukur serapannya pada λ maksimum tirosin 275 nm

Hasil

LAMPIRAN 5. Profil Protein dengan Teknik Sds-Page.

5.1 Persiapan Gel



LAMPIRAN 5.2 Injeksi Sampel dan *Running*

LAMPIRAN 6. Preparasi Larutan

L.6.1 Pembuatan larutan phosphate buffer saline (PBS) pH 7,4

Ditimbang KCl sebanyak 0,1 gram, KH_2PO_4 sebanyak 0,1 gram, NaCl sebanyak 4 gram dan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebanyak 1,08 gram dicampur dan dilarutkan dalam 400 ml dan diadjust dengan Hcl 37 % sampai pH 7,4 dan ditandabatkan dengan aquades hingga 500 ml.

6.2 Pembuatan PBS-Azida

Dipipet 50 ml larutan PBS dengan pH 7,4, Kemudian ditambah 6 tetes larutan azida 1 % dan diaduk hingga homogen.

6.3 Pembuatan Larutan NaCl-fis 0,9%

Ditimbang NaCl sebanyak 4,5 gram dan dilarutkan terlebih dahulu dalam 100 ml aquades steril. Dipindahkan kedalam labu ukur 500 ml dan diencerkan dengan aquades steril hingga tanda batas.

6.4 Pembuatan PFA (Paraformaldehid) 4%

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 37 \% = 100 \text{ mL} \times 4 \%$$

$$V_1 = 10,8 \text{ mL}$$

Langkah pertama yaitu membuat larutan NaCl Fisiologis 0,9% sebagai pelarutnya yaitu ditimbang NaCl sebanyak 1,8 gram lalu dilarutkan dalam 200 mL aquades dan distirrer. Larutan PFA 4% dpat dibuat dengan mengambil 10,8 mL formaldehid 37% dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan NaCl Fisiologis sampai tanda batas.

LAMPIRAN 7. Determinasi Labu Siam (*Sechium edule*)



DINAS KESEHATAN PROPINSI JAWA TIMUR
UPT MATERIA MEDICA
 Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313)
KOTA BATU

Nomor : 074 / 0257 / 101.8 / 2013
 Sifat : Biasa
 Perihal : Determinasi Tanaman Labu siam

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : ARINDA NALA K (105130101111016)
 DEVY IKA L. (105130101111017)
 HARYADI SAPTONO (105130101111019)
 CHALIDITYA BUSTAN P (105130101111020)
 HERMAYANI NAWANG P (105130101111031)
 DEVI ANGGRAENI (105130101111050)

Fakultas : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang

1. Perihal determinasi tanaman Labu Siam :

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
 Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
 Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
 Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
 Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
 Sub Kelas : Dilleniidae
 Ordo : Violales
 Famili : Cucurbitaceae (suku labu-labuan)
 Genus : Sechium
 Spesies : *Sechium edule* (Jacq.) Sw.
 Sinonim : -
 Nama Daerah : Sumatera : Labu siam (Melayu) . Jawa : Labu siam Gambas (Sunda)
 Waluh jipang" (Jawa Tengah)

Kunci Determinasi : 1b-2a-27a-28b-29b-30b-31b

2. Morfologi : Habitus Perdu, merambat. Batang Lunak, beralur, banyak cabang, terdapat pembelit berbentuk spiral, kasap, hijau. Daun Tunggal, benluk jantung, tepi bertoreh, ujung meruncing, pangkal runcing, kasap, panjang 4-25 cm, lebar 3-20 cm, langkai panjang, pertulangan menjari, hijau. Bunga Majemuk, di ketiak daun, kelopak bertaju lima, mahkota beralur, benang sari lima, kepala sari jingga, putik satu, kuning. Buah Buni, bulat, menggantung, permukaan berlekuk, hijau keputih-putihan. Biji Pipih, berkeping dua, putih. Akar Tunggang, putih kecoklatan.

3. Nama Simplesia : Sechium Fructus/ Buah Labu Siam

4. Kandungan kimia : Buah dan daun *Sechium edule* mengandung saponin. Di samping itu buahnya juga mengandung alkaloida dan tanin. Selain itu pada buah labu siam mengandung flavonoida dan polifenol

5. Penggunaan : Penelitian

6. Daftar Pustaka :

- Steenis, CGGJ Van Dr, **FLORA**, 2008, Pradnya Paramita, Jakarta.
- Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johny Ria. **Inventaris Tanaman Obat Indonesia**, Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.
- Anonim/ [http://www.plantamor.com/labu kuning](http://www.plantamor.com/labu_kuning), diakses tanggal 9 Desember 2010
- Anonim/ [http://www.warintek.ristek.go.id/labu siam](http://www.warintek.ristek.go.id/labu_siam), diakses tanggal 5 September 2007

Demikian determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 26 November 2013
 Kepala UPT. Materia Medica Batu


 Drs. H. H. R. M. A. S. M. Kes.
 NIP. 196111021991031003

LAMPIRAN8. LAIK ETIK

55



KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"

No:216-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : TERAPI PERASAN BUAH LABU SIAM (*Sechium Edule*)
TERHADAP AKTIVITAS PROTEASE DAN EKSPRESI
TNF α PADA JEJUNUM TIKUS (*Rattus norvegicus*)
INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD) HASIL
INDUKSI ENDOMETASIN

PENELITI : DEVY IKA LISTYAWATI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 3 Maret 2014
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

LAMPIRAN 9. DOKUMENTASI PENELITIAN

Kandang pemeliharaan untuk hewan coba



Pembedahan hewan coba



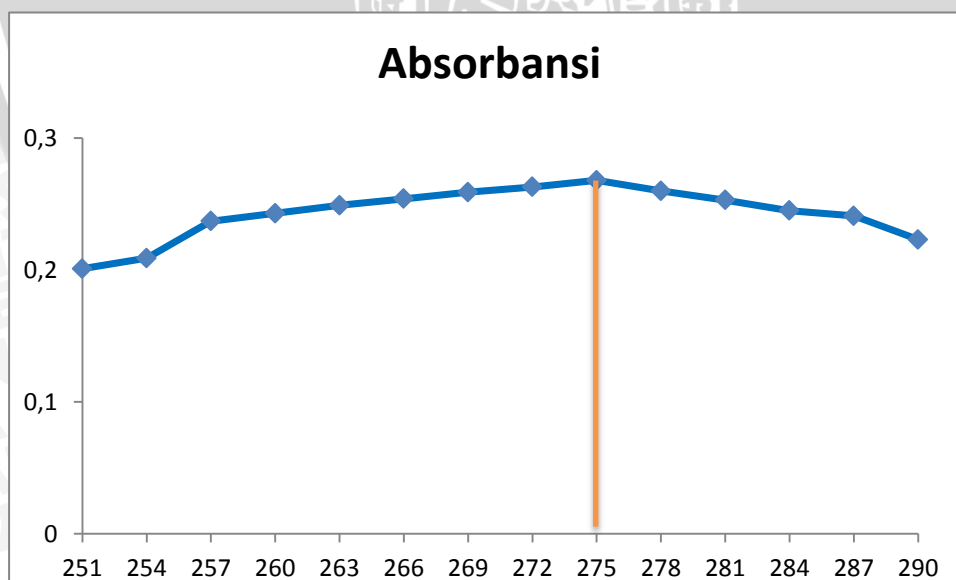
Penimbangan hewan coba



LAMPIRAN 10. PENENTUAN PANJANG GELOMBANG MAKSIMUM TIROSIN

Tabel L.10.1: absorbansi Larutan standar Tirosin 10 ppm

$\lambda_{\text{maks.}}$	Absorbansi
251	0.201
254	0.209
257	0.237
260	0.243
263	0.249
266	0.254
269	0.259
272	0.263
275	0.268
278	0.26
281	0.253
284	0.245
287	0.241
290	0.223

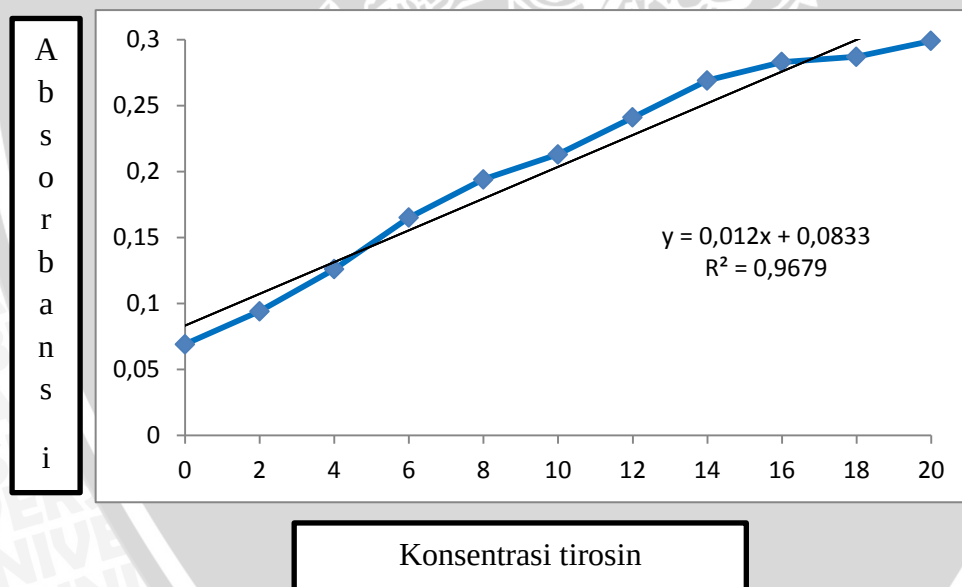


LAMPIRAN 11 : PEMBUATAN KURVA STANDAR TIROSIN

Tabel L. 11.1 Absorbansi Larutan Standar Tirosin

Tirosin (ppm)	Absorbansi
0	0,069
2	0,094
4	0,126
6	0,165
8	0,194
10	0,213
12	0,241
14	0,269
16	0,283
18	0,287
20	0,299

Kurva Baku Tirosin



Tabel L.11.2. Data Absorbansi Tirosin

Perlakuan	Tikus				
	1	2	3	4	5
sehat (-)	0,192	0,197	0,192	0,221	0,203
Tikus IBD	0,572	0,563	0,566	0,553	0,558
Terapi 10	0,431	0,401	0,448	0,425	0,427
Trapi 20	0,2984	0,3967	0,2977	0,2931	0,3981



LAMPIRAN 12. PERHITUNGAN AKTIVITAS PROTEASE

L. 12.1 Rumus Perhitungan

Misal : Pengukuran aktivitas protease kontrol dengan waktu inkubasi 60 menit dan suhu 37°C

Persamaan kurva baku tirosin : $Y = 0,012X + 0,0833$

Dimana x = konsentrasi tirosin

$$\text{Maka } x = \frac{0,192 - 0,0833}{0,012} = 9,08$$

Nilai x merupakan banyaknya tirosin yang terbentuk oleh enzim protease. Untuk menentukan aktivitas enzim protease digunakan persamaan :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times f_p$$

Dimana : v = volume total sampel (mL)
 q = waktu inkubasi (mL)
 f_p = faktor pengenceran
 P = jumlah enzim (mL)
 Mr = Berat Molekul Tirosin 181 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas enzim} &= \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times f_p \\ &= \frac{9,08 \mu\text{g/mL}}{181 \mu\text{g}/\mu\text{mol}} \times \frac{1}{0,1 \text{ mL} \times 60 \text{ menit}} \times 5 \\ &= 0,05 \times 0,167 \times 5 = \mu\text{mol/mL.menit} \\ &= 0,042 \mu\text{mol/mL.menit} \\ &= 0,042 \text{ Unit} \end{aligned}$$

Satu unit aktivitas protease dinyatakan dengan banyaknya jumlah mikro mol yang terbentuk oleh 1 mL protease per menit.

Tabel 12.1 Data Konsentrasi Tirosin

Perlakuan	TIKUS				
	1	2	3	4	5
sehat (-)	9,083333	9,5	9,083333	11,5	10
Tikus IBD	40,75	40	40,25	39,16667	39,583333
Terapi 10	29	26,5	30,41667	28,5	28,66667
Terapi 20	17,95	26,14167	17,89167	17,508337	26,25833

Tabel 12.2 Data Aktivitas Protease Ileum Tikus

	Tikus					
perlakuan	1	2	3	4	5	Rataan aktivitas enzim (Unit)
sehat	0,042	0,044	0,042	0,053	0,046	0,045 ± 0,0464 ^a
IBD	0,188	0,184	0,185	0,180	0,182	0,1836 ± 0,0281 ^c
terapi 10	0,134	0,123	0,143	0,131	0,132	0,132 ± 0,0648 ^b
terapi 20	0,040	0,0524	0,050	0,042	0,047	0,097 ± 0,6088 ^a

Induksi indometasin dapat meningkatkan aktivitas protease ileum tikus (*Rattus norvegicus*) dan terapi perasan buah labu siam (*Sechium edule*) dapat menurunkan aktivitas protease. Presentasi peningkatan dan penurunan dapat dihitung sebagai berikut :

➤ Peningkatan Aktivitas Protease = $\frac{\text{kontrol positif} - \text{kontrol negatif}}{\text{kontrol negatif}} \times 100\%$

$$= \frac{0,1836 - 0,0454}{0,0454} \times 100\%$$

$$= 3,07 \%$$

➤ Penurunan aktivitas Protease Terapi 10g/tikus = $\frac{\text{kontrol positif} - \text{terapi 10g/tikus}}{\text{kontrol positif}} \times 100 \%$

$$= \frac{0,1836 - 0,1326}{0,1836} \times 100 \%$$

$$= 0,27 \%$$

➤ Penurunan Aktivitas protease Terapi 20g/tikus = $\frac{\text{kontrol positif} - \text{terapi 20g/tikus}}{\text{kontrol positif}} \times 100\%$

$$= \frac{0,1836 - 0,0974}{0,1836} \times 100\%$$

$$= 0,47 \%$$

LAMPIRAN 13. HASIL UJI STATISTIKA

Tabel L. 13.1 Uji Normalitas Data

Tests of Normality

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Protease
N		20
Normal Parameters ^a	Mean	.1020
	Std. Deviation	.06088
Most Extreme Differences	Absolute	.289
	Positive	.289
	Negative	-.160
Kolmogorov-Smirnov Z		1.292
Asymp. Sig. (2-tailed)		.071

a. Test distribution is Normal.

Tabel L. 13. 2 Uji Homogenitas

KadarProtease

Test of Homogeneity of Variances

Protease

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.903	3	16	.461

*P > 0,05 tidak berbeda

Tabel L.13.3 Uji Statistika ANOVA

Kadar Protease

ANOVA

Protease	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.070	3	.023	899.104	.000
Within Groups	.000	16	.000		
Total	.070	19			

*P <0,05 terdapat perbedaan antar perlakuan

Tabel L. 13.4 Uji Lanjutan BNJ (Beda Nyata Jujur)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar Protease

Multiple Comparisons							
Dependent Variable: Protease							
	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Sehat	Sakit	-.13894*	.00322	.000	-.1482	-.1297
		Terapi 10	-.08665*	.00322	.000	-.0959	-.0774
		Terapi 20	-.00080	.00322	.994	-.0100	.0084
	Sakit	Sehat	.13894*	.00322	.000	.1297	.1482
		Terapi 10	.05228*	.00322	.000	.0431	.0615
		Terapi 20	.13814*	.00322	.000	.1289	.1474
	Terapi 10	Sehat	.08665*	.00322	.000	.0774	.0959
		Sakit	-.05228*	.00322	.000	-.0615	-.0431
		Terapi 20	.08585*	.00322	.000	.0766	.0951
	Terapi 20	Sehat	.00080	.00322	.994	-.0084	.0100
		Sakit	-.13814*	.00322	.000	-.1474	-.1289
		Terapi 10	-.08585*	.00322	.000	-.0951	-.0766
LSD	Sehat	Sakit	-.13894*	.00322	.000	-.1458	-.1321
		Terapi 10	-.08665*	.00322	.000	-.0935	-.0798
		Terapi 20	-.00080	.00322	.808	-.0076	.0060
	Sakit	Sehat	.13894*	.00322	.000	.1321	.1458
		Terapi 10	.05228*	.00322	.000	.0455	.0591
		Terapi 20	.13814*	.00322	.000	.1313	.1450
	Terapi 10	Sehat	.08665*	.00322	.000	.0798	.0935

	Sakit	-.05228*	.00322	.000	-.0591	-.0455
	Terapi 20	.08585*	.00322	.000	.0790	.0927
Terapi 20	Sehat	.00080	.00322	.808	-.0060	.0076
	Sakit	-.13814*	.00322	.000	-.1450	-.1313
	Terapi 10	-.08585*	.00322	.000	-.0927	-.0790

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabel L.13.5 Pemberian Notasi pada Uji BNJ

Kadar Protease

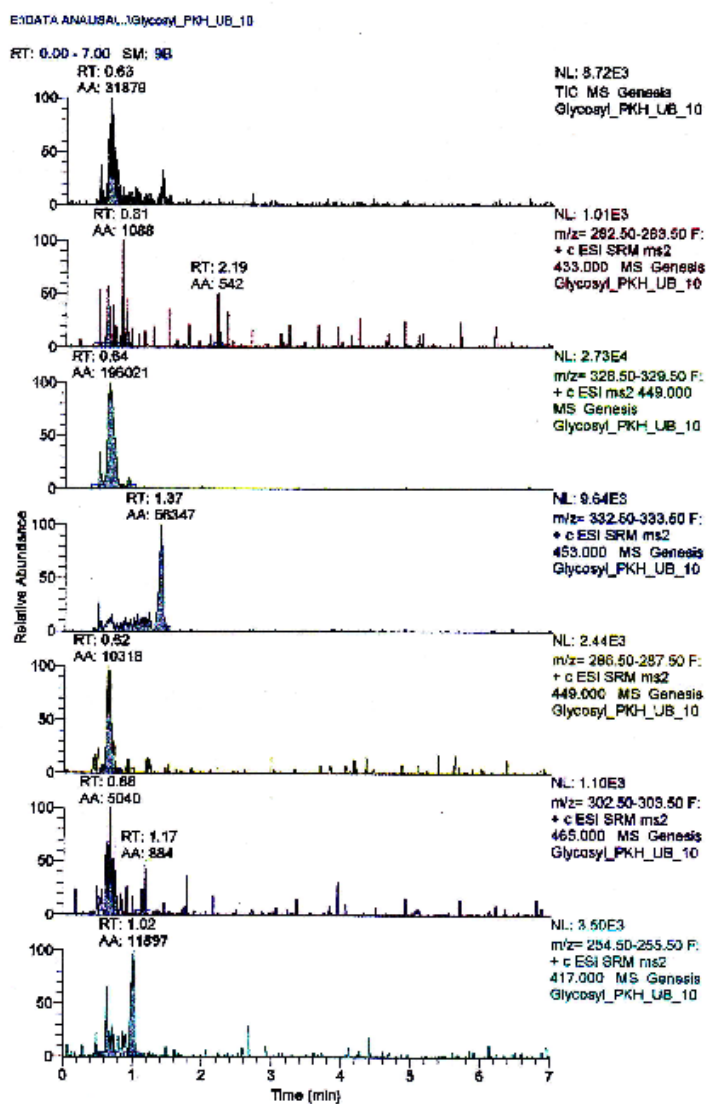
Homogeneous Subsets

Protease					
		N	Subset for alpha = 0.05		
			a	b	c
Tukey HSD ^a	Sehat	5	.0454		
	Terapi 20	5	.0462		
	Terapi 10	5		.1320	
	Sakit	5			.1843
	Sig.		.994	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

LAMPIRAN 14. HASIL UJI LCMS



LABORATORIUM KIMIA ANALISIS DAN INSTRUMENTASI
 JURUSAN TEKNIK KIMIA POLITEKNIK NEGERI MALANG
 JL. SOEKARNO-HATTA NO. 9 PO. BOX 04 MALANG 65141

REKAPITULASI HASIL ANALISIS KUALITATIF TYPE GLYCOSIL FLAVONOID

No	Nama Senyawa	Type Glycosil Flavonoid	Ion Precursor (m/z)	Ion Produk (m/z)	Hasil
1	Isovitexin	Flavone 6-C-glycoside	433	283	Tidak Ada
2	Orientin	Flavone 8-C-glycoside	449	329	Ada
3	Aspalathin	Dihydrochalcone 30-C-glycoside	453	333	Ada
4	Luteolin-7-O-glucoside	Flavone O-glycoside	449	287	Ada
5	Isoquercitrin	Flavonol O-glycoside	465	303	Ada*
6	Daidzin	Isoflavone O-glycoside	417	255	Ada*

Keterangan

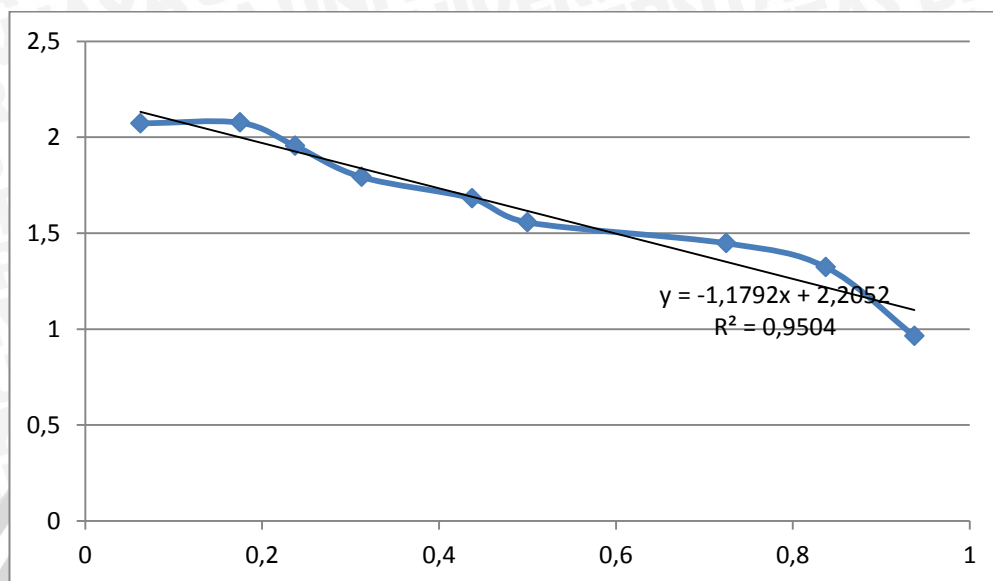
* Kemungkinan sangat kecil

Malang, 15 April 2014
 Pelaksana

 Kallawan



LAMPIRAN 15. KURVA STANDAR MARKER SDS PAGE



Kurva Standar Marker				
BM (kDa)	LogBM (y)	A (cm)	B (cm)	Rf (x)
118	2.071882	0.5	8	0.0625
119	2.075547	1.4	8	0.175
90	1.954243	1.9	8	0.2375
61	1.792392	2.5	8	0.3125
48	1.681241	3.5	8	0.4375
36	1.556303	4	8	0.5
28	1.447158	5.8	8	0.725
21	1.322219	6.7	8	0.8375
9.2	0.963788	7.5	8	0.9375

Keterangan:

A = Jarak batas atas gel hingga pita (cm)

b = Jarak batas atas gel hingga batas bawah gel (cm)

R_f = Reterdation factor

BM = Berat molekul marker

log BM = Logaritma berat molekul marker

PERHITUNGAN BERAT MOLEKUL HASIL SDS-PAGE.

Sampel	a	b	R _f	log BM	BM (kDa)
Sehat	0,7	8	0.0875	2.10202	126.4794592
	1,5	8	0.1875	1.9841	96.4050979
	2,8	8	0,35	1.79248	62.01260851
	6,8	8	0.571429	1.502029	15.9543825
Tikus IBD	0,7	8	0.0875	2.10202	126.4794592
	1,5	8	0.1875	1.9841	96.4050979
	2,8	8	0.35	1.79248	62.01260851
	6,8	8	0.571429	1.502029	15.9543825
	1.3	8	0.1625	2.01358	103.731612
	3.5	8	0.4375	1.6893	48.8990025
	5	8	0.625	1.4682	29.39002801
Terapi 10 g/ekor	0,7	8	0.0875	2.10202	126.4794592
	1,5	8	0.1875	1.9841	96.4050979
	2,8	8	0.35	1.79248	62.01260851
	6,8	8	0.571429	1.502029	15.9543825
Terapi 20 g/ekor	0,7	8	0.0875	2.10202	126.4794592
	1,5	8	0.1875	1.9841	96.4050979
	2,8	8	0.35	1.79248	15.9543825
	6,8	8	0.571429	1.502029	15.9543825