

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Studi Pengaruh Terapi Air Alkali Terhadap Aktivitas Enzim Protease Hepar Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) Hasil Induksi Indometasin

Aktivitas protease yang diukur dengan alat spektrofotometry dan didapatkan data seperti tertera pada **Tabel 5.1**, protease merupakan enzim yang digunakan untuk menghidrolisis ikatan peptide pada protein. Unit aktivitas protease dari organ hepar tikus (*Rattus norvegicus*) didefinisikan sebagai banyaknya mikromol (μmol) tirosin yang dihasilkan dari hidrolisa ikatan peptida pada protein oleh protease hasil isolasi dari hepar tikus (*Rattus norvegicus*) pada kondisi optimum yaitu pH 6,5, suhu 37°C dengan waktu inkubasi 60 menit (Ranuh *et al.*, 2008).

Tabel 5.1 Rata-rata aktivitas protease pada hepar tikus yang dipapar indometasin dan pasca diterapi dengan air alkali

Kelompok	Rata-rata Aktivitas Protease ($\mu\text{mol/ml.menit}$)	Peningkatan Aktivitas Protease terhadap kontrol negatif (%)	Penurunan Aktivitas Protease terhadap kontrol positif (%)
Kontrol Negatif	$0,016 \pm 0,001^a$	-	-
Kontrol Positif	$0,056 \pm 0,003^d$	250	-
Terapi 1 ml/ekor	$0,045 \pm 0,002^c$	-	19,64
Terapi 2 ml/ekor	$0,023 \pm 0,003^b$	-	59,35

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

Hasil analisa secara statistik menggunakan *One-Way Analysis of Variant* (ANOVA) menggunakan software SPSS.21 menunjukkan bahwa pemberian air alkali secara signifikan ($p < 0,05$) mampu menurunkan aktivitas protease pada hewan model yang terpapar IBD sebagaimana ditunjukkan pada **Tabel 5.1**. dan

perhitungan statistika secara lengkap dapat dilihat di **lampiran 5**. Hasil lanjutan menggunakan *Tukey/Beda Nyata Jujur (BNJ)* yang menunjukkan bahwa aktivitas protease berbeda signifikan ($p < 0,05$) antar perlakuan. Namun, penurunan aktivitas protease tertinggi didapatkan pada kelompok terapi 2 ml/ekor, sehingga volume pemberian 2 ml/ekor merupakan volume terapi terbaik.

Aktivitas protease pada kelompok kontrol negatif yaitu $0,016 \pm 0,001$ $\mu\text{mol/ml.menit}$ merupakan standar yang dipergunakan untuk menentukan adanya peningkatan atau penurunan yang terjadi karena pengaruh perlakuan. Aktivitas protease merupakan indikator terdapatnya radikal bebas yang disebabkan oleh keluarnya enzim protease. Secara normal, radikal bebas yang diproduksi oleh tubuh yakni dalam jumlah kecil sebagai akibat dari proses metabolisme yang ada di dalam tubuh. Menurut Astuti (2008), sel memproduksi radikal bebas sebagai konsekuensi akibat dari biokimia proses metabolisme sel atau metabolisme xenobiotik. Radikal bebas yang diproduksi merupakan hasil samping dari proses metabolisme sel atau metabolisme xenobiotik berlangsung. Sehingga, rata-rata aktivitas protease kelompok kontrol negatif merupakan kelompok keadaan normal karena tikus pada kelompok kontrol negatif tidak mendapatkan perlakuan apapun dan rata-rata aktivitas protease yang terbentuk merupakan hasil dari proses metabolisme dalam tubuh.

Aktivitas protease pada kelompok positif (IBD) yaitu $0,056 \pm 0,003$ $\mu\text{mol/ml.menit}$. Hasil analisa dengan menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa aktivitas protease pada kelompok positif (IBD) berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok kontrol negatif dengan peningkatan sebesar 250%. Peningkatan

aktivitas protease tersebut dikarenakan adanya peningkatan ROS yang disebabkan oleh induksi indometasin serta menyebabkan terjadinya proses inflamasi pada hepar tikus dengan mengaktifkan sel-sel inflamasi serta pelepasan enzim protease. Mekanisme kerja indometasin dengan menghambat aktivitas enzim siklooksigenase 1 (COX-1) dan enzim siklooksigenase 2 (COX-2). Penghambatan pada COX-2 akan berfungsi terhadap pengurangan nyeri, namun penghambatan terhadap COX-1 akan menghambat sintesis *Prostaglandin E2* (PGE2) yang berfungsi pada sekresi mukus untuk melindungi mukosa usus sehingga menyebabkan melemahnya sistem pertahanan tubuh pada daerah mukosa dan bakteri lebih mudah menginfeksi (Tanaka *et al.*, 2013). Adanya infeksi inilah yang menyebabkan aktivasi makrofag, pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang memicu aktivasi NF- κ B dan pelepasan sitokin pro-inflamasi (IL-1, TNF- α dan IFN- γ) sehingga mengakibatkan inflamasi lokal pada jaringan, dari usus halus indometasin akan diserap oleh sel-sel enterocyte yang ada di mukosa usus setelah diserap akan masuk ke dalam hepar melalui vena porta, kemudian terjadi proses kerusakan hepar dan meningkatkan produksi neutrofil dapat melepaskan enzim protease. Oleh karena itu, pelepasan enzim protease dalam keadaan jaringan rusak dapat menyebabkan aktivitas protease meningkat. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa terjadi peningkatan pada aktivitas protease sebesar 250% pada kelompok kontrol positif.

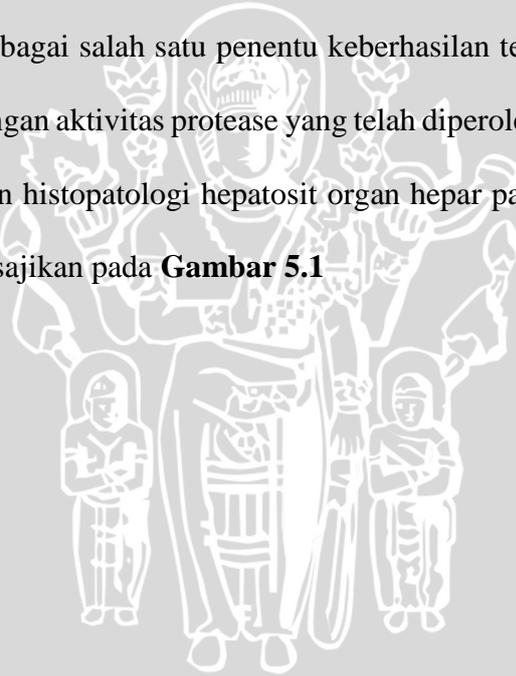
Hasil analisa statistika menunjukkan aktivitas protease pada kelompok terapi 1 ml/ekor dan kelompok Terapi 2 ml/ekor berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kelompok positif (IBD). Hal ini ditunjukkan adanya penurunan aktivitas protease

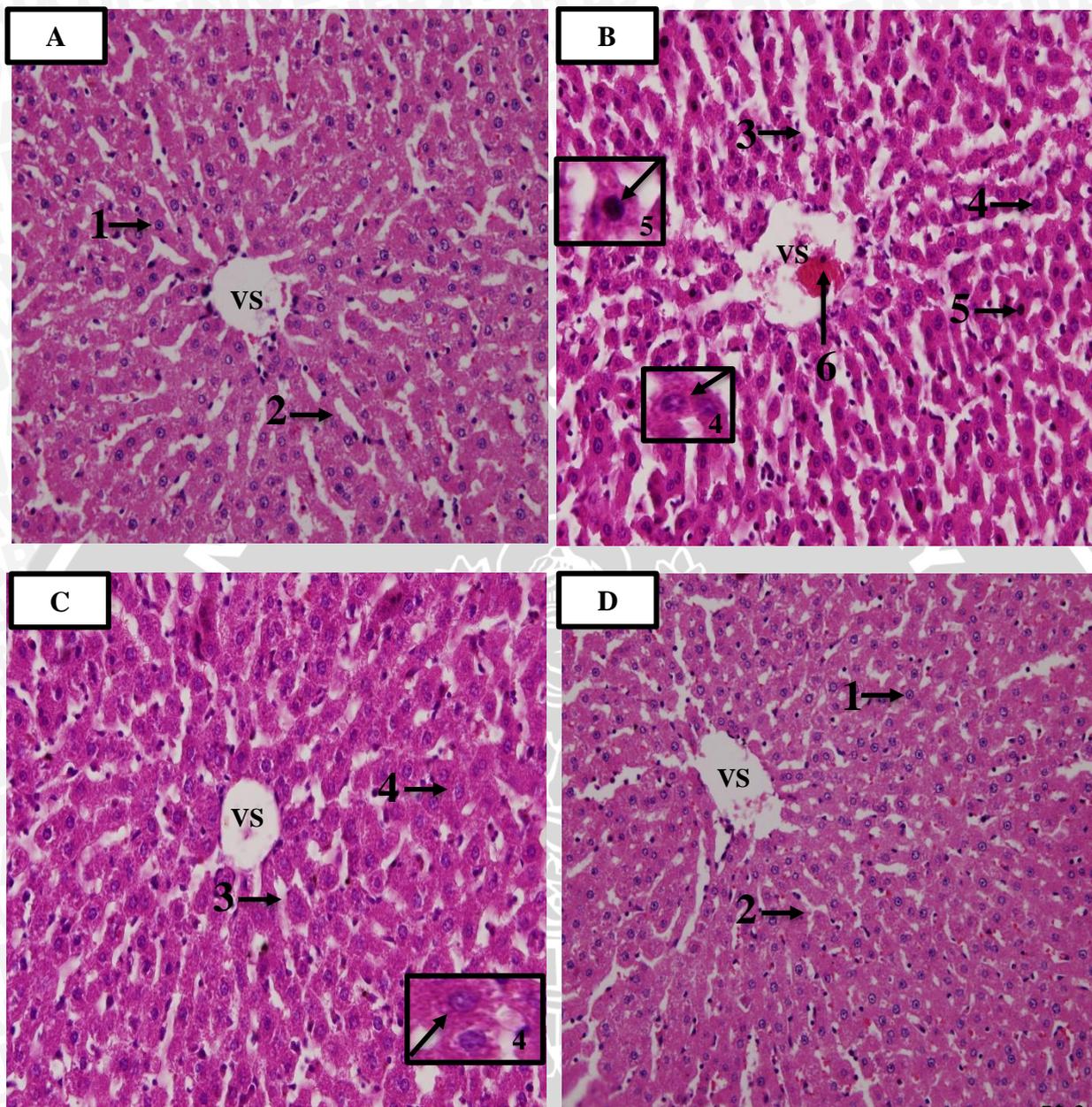
pada kelompok terapi 1 ml/ekor sebesar 19,64% ($0,045 \pm 0,002$) dan pada kelompok terapi 2 ml/ekor sebesar 59,35% ($0,023 \pm 0,003$) terhadap kelompok positif (IBD). Hal ini menunjukkan bahwa terapi 2 ml/ekor adalah volume pemberian terbaik dalam penurunan kejadian *Inflammatory Bowel Disease* (IBD). Berdasarkan hasil uji lanjutan BNJ, terdapat 4 notasi yang ditandai dengan a, b, c dan d. Notasi a merupakan kontrol negatif, notasi b adalah terapi air alkali 2 ml/ekor, notasi c adalah terapi air alkali 1 ml/ekor serta notasi d merupakan kontrol positif, sehingga dapat dikatakan terdapat perbedaan nyata pada setiap perlakuan ($p < 0,05$). Hal ini membuktikan bahwa terapi air alkali 2 ml/ekor (notasi b) memberikan hasil penurunan aktivitas protease yang mendekati pada kelompok kontrol negatif (notasi a), penurunan aktivitas protease dalam penelitian ini diduga karena kandungan air alkali. Air alkali memiliki kandungan molekul air mikro kluster sehingga mudah diserap oleh tubuh, nilai ORP negatif dimana semakin negatif nilai ORP suatu cairan maka semakin besar pula ia menyumbangkan elektron ke sel yang kehilangan elektron akibat dicuri atau diambil oleh radikal bebas, serta memiliki kandungan antioksidan tinggi yang diperoleh dari proses elektrolisis air yang menghasilkan molekul hidrogen aktif sebagai reduktor kuat, yang berfungsi sebagai H-donor. Kandungan hidrogen terlarut yang sangat tinggi dalam air alkali yang berperan sebagai antioksidan dengan menyumbangkan elektronnya pada sel yang kehilangan elektron akibat diambil oleh radikal bebas, sehingga diharapkan dapat menetralkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Shirahata *et al.*, 2012). Antioksidan merupakan senyawa aktif yang berperan untuk

menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif sehingga kerusakan sel dapat dihambat (Andayani *et al.*, 2008).

5.2 Studi Pengaruh Terapi Air Alkali Terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) Hasil Induksi Indometasin

Pada penelitian ini indikator keberhasilan pemberian terapi air alkali pada *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) selain diamati dari penurunan aktivitas enzim protease yang merupakan biomarker kerusakan jaringan, juga dapat diketahui melalui pengamatan histopatologi hepar dengan pewarnaan *Hematoksilin Eosin* (HE) yang berfungsi sebagai salah satu penentu keberhasilan terapi dan sekaligus untuk dibandingkan dengan aktivitas protease yang telah diperoleh. Hasil penelitian menggunakan gambaran histopatologi hepatosit organ hepar pada masing-masing kelompok perlakuan disajikan pada **Gambar 5.1**





Gambar 5.1 Gambaran Histopatologi hepar tikus (*Rattus norvegicus*) *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dengan pewarnaan HE perbesaran 400 x; [A] Tikus kontrol negatif [B] Tikus kontrol positif [C] Tikus terapi 1 ml/ekor [D] Tikus terapi 2 ml/ekor.

Keterangan : 1 = sel hepatosit normal, 2 = sinusoid normal, 3 = dilatasi sinusoid, 4 = karioreksis, 5 = piknotik, 6 = hiperemia, VS: vena sentralis, huruf i (insert) menunjukkan sel hepatosit yang diperbesar

Gambaran histopatologi kondisi normal organ hepar tikus (**Gambar 5.1A**) dapat digunakan sebagai acuan dalam membandingkan adanya kerusakan maupun perbaikan yang terjadi pada kelompok perlakuan lain. Berdasarkan penelitian Utomo dkk. (2012) yang menyatakan bahwa gambaran histologi organ hepar ditunjukkan dengan adanya susunan sel secara radier terhadap vena sentralis, sel hepatosit berbentuk bulat dan oval serta sel hepatosit memiliki satu nukleus atau dua nukleus (binukleat). Hal ini sesuai dengan penelitian Lumongga (2008) bahwa dalam keadaan normal dapat dijumpai sel hepatosit yang memiliki inti lebih dari satu. Dalam penelitian ini, hepar terlihat normal yang ditunjukkan tidak adanya inflamasi, hal ini sesuai dengan penelitian Adeyi *et al.*, (2013) bahwa pada kondisi sehat secara mikroskopis organ hepar terlihat sinusoid memancar secara sentrifugal dari vena centralis dan inti sel hepar berwarna basofilik, sedangkan sitoplasma berwarna asidofilik. Pada keadaan normal, vena sentralis merupakan sebuah pembuluh vena yang dikelilingi oleh sel endotelium yang tersusun rapat dan terletak pada pusat lobulus dengan hepatosit tersusun secara radier ke arah vena sentralis (Arifin dkk., 2007).

Gambaran histopatologi hepar pada kelompok positif (IBD) (**Gambar 5.1B**) menunjukkan adanya dilatasi sinusoid, dilatasi sinusoid merupakan suatu perubahan yang terjadi pada celah antar sel hepatosit yang mengalami pelebaran. Dilatasi sinusoid disebabkan aktifitas inflamasi oleh mediator inflamasi yang dimulai dengan dilatasi pembuluh darah yang selanjutnya akan mengalami kontraksi endotel dinding kapiler yang dapat meningkatkan permeabilitas pembuluh darah. Selain itu, tampak nekrosis sel hepatosit yang ditandai dengan

karioreksis, karioreksis merupakan kerusakan pada inti sel yang ditandai dengan inti sel mulai hancur, inti sel tidak jelas dan batas sel hepatosit juga tidak jelas serta sel hepatosit yang ditandai dengan inti sel yang piknotik sehingga tampak gelap, terlihat pula kerusakan pada vena sentralis berupa lisisnya sel endotelium sehingga lingkaran menjadi tidak utuh dan akhirnya lingkaran menjadi tidak jelas. Kerusakan pada vena ini berkaitan dengan perannya pada sirkulasi, dimana vena sentralis menerima darah dari sinusoid–sinusoid sebanyak 25% dari darah yang mengalir pada sinusoid berasal dari arteri hepatica, sedangkan 75% berasal dari vena porta yang mengalirkan darah dari saluran cerna hasil absorpsi usus. Jadi, vena sentralis akan banyak menampung nutrient–nutrient dan zat–zat lain hasil metabolisme yang dapat bersifat nontoksik ataupun toksik. Banyaknya darah yang ditampung oleh vena sentralis akan menyebabkan konsentrasi zat yang bersifat toksik jauh lebih besar sehingga hal inilah yang memperjelas kerusakan vena sentralis (Arifin dkk., 2007). Selain itu, terlihat pula adanya hiperemia pada vena sentralis berupa terlihat gambaran berwarna merah pada vena sentralis. Hiperemia ini dapat terjadi karena degenrasi sel hepar (hepatosit) yang menyebabkan darah terkumpul didalamnya dan tidak bisa mengalir, hal ini disebabkan gangguan ion Na^+ dan K^+ yang mengakibatkan gangguan pada aliran darah sehingga sel darah merah terjebak dalam kapiler darah. Terganggunya sirkulasi dalam kapiler darah, akan menyebabkan darah terkumpul dalam kapiler sehingga mengakibatkan tekanan dinding kapiler naik. Jika keadaan ini berlangsung secara terus-menerus, maka dinding kapiler darah akan pecah sehingga sel darah seperti eritrosit akan memasuki jaringan (Junqueira *et al.*, 1998). Kerusakan organ hepar yang terjadi membuktikan

bahwa induksi indometasin dosis 15 mg/kg BB dapat menyebabkan kerusakan organ hepar.

Hasil pengamatan gambaran histopatologi hepar tikus IBD yang mendapat terapi air alkali dengan volume pemberian 1 ml/ekor (**Gambar 5.1C**) menunjukkan sel hepatosit tampak masih mengalami nekrosis yaitu adanya inti sel yang karioreksis berupa kerusakan pada inti sel yang ditandai dengan inti sel mulai hancur, inti sel tidak jelas dan batas sel hepatosit juga tidak jelas serta masih terlihat adanya dilatasi sinusoid yang disebabkan sinusoid menerima darah dari vena porta dan arteri hepatica, lalu menyalurkannya ke vena sentralis. Banyaknya konsentrasi toksikan dalam darah yang disalurkan sinusoid ini akan mengakibatkan kerusakan pada sinusoid, dimana dinding sinusoid ini terdiri dari sel-sel endotel yang membentuk lapisan tidak utuh yang membatasi hepatosit dan sinusoid adalah celah subendotel yang mengandung mikrovili dari hepatosit. Hal ini memudahkan terjadinya kontak langsung antara permukaan hepatosit dan sinusoid sehingga memudahkan terjadinya pertukaran makromolekul termasuk toksikan. Toksikan pada hepatosit yang rusak akan mudah berkontak dengan sinusoid, dan apabila konsentrasi toksikan tinggi maka hal ini akan menyebabkan kerusakan pada sinusoid (Arifin dkk., 2007). Sedangkan, pada pengamatan pada vena sentralis terlihat sudah tidak ada kerusakan pada vena sentralis berupa vena sentralis terlihat berbentuk utuh dan sudah tidak terjadi hiperemia. Hal ini menunjukkan bahwa volume pemberian terapi 1 ml/ekor masih belum bisa memberikan perbaikan yang maksimal pada organ hepar.

Gambaran histopatologi hepar tikus IBD yang diberikan terapi air alkali dengan volume pemberian 2 ml/ekor (**Gambar 5.1D**) menunjukkan gambaran histopatologi menyerupai kelompok kontrol negatif, sel hepatosit terlihat normal dengan inti sel di tengah serta sinusoid tampak mulai normal memancar secara sentrifugal dari vena sentralis, selain itu sudah tidak terlihat kerusakan pada vena sentralis berupa bentuk vena sentralis terlihat normal dan tidak mengalami hiperemia. Berdasarkan perbandingan gambaran histopatologi pada pemberian terapi air alkali dengan volume pemberian 1 ml/ekor dan 2 ml/ekor, maka volume pemberian 2 ml/ekor menunjukkan volume pemberian terbaik yang mampu memberikan perbaikan yang maksimal. Perbaikan pada organ hepar ini dikarenakan pengaruh kandungan molekul air mikro kluster, nilai *Oxidation Reductional Product* (ORP) negatif dan hidrogen yang sangat tinggi sebagai antioksidan yang terkandung dalam air alkali.

Terapi air alkali yang mengandung hidrogen yang tinggi sebagai antioksidan bekerja dengan menyumbangkan elektronnya pada sel yang kehilangan elektron akibat diambil oleh radikal bebas yang digunakan untuk menetralkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Shirahata *et al.*, 2012), sehingga mempengaruhi penurunan ekspresi sitokin pro-inflamasi. Sitokin pro-inflamasi yang tidak teraktivasi maka dapat menghambat produksi neutrofil sehingga produksinya menurun (Tanaka *et al.*, 2013). Menurut Dorland dalam Purwanti (2015), Penghambatan pada produksi neutrofil dapat membantu dalam menurunkan pelepasan enzim protease sehingga enzim proteolitik terhambat dan dapat menurunkan tingkat kerusakan pada hepar melalui proses regenerasi sel. Regenerasi sel diperlukan oleh organ atau jaringan

untuk memperbaiki sel yang mengalami kerusakan. Proses perbaikan diawali dengan terjadi proses inflamasi. Jaringan yang mengalami inflamasi akan beradaptasi, namun saat jaringan tersebut sudah tidak dapat melakukan adaptasi maka jaringan akan menjadi nekrosis. Jaringan nekrosis akan difagosit oleh makrofag dan neutrofil dengan tujuan untuk mengawali proses perbaikan jaringan. Inflamasi merupakan respon jaringan protektif terhadap kerusakan jaringan, yang bertujuan untuk menghancurkan, mengurangi jaringan nekrotik. Respon inflamasi bertujuan untuk membersihkan debris atau mempersiapkan jaringan untuk proses penyembuhan. Proses selanjutnya adalah proliferasi, proliferasi merupakan tahap pembelahan sel sehingga akan terbentuk jaringan yang baru yang akan menggantikan jaringan yang mengalami nekrosis. Jaringan baru yang terbentuk akan berdiferensiasi menjadi sel-sel hepatosit.

