

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Perasan Bawang Putih (*Allium sativum*) Terhadap Aktivitas Protease pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Rhodamin B melalui Pakan.

Aktivitas enzim protease pada duodenum masing-masing kelompok hewan coba (**Lampiran 5**) menunjukkan hasil perbedaan nyata antar perlakuan ($p < 0,01$) setelah dianalisa menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Tukey seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Peningkatan Aktivitas Protease pada Kelompok Perlakuan terhadap Kontrol negatif

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata Aktivitas Protease (nmol.mL/menit)	Aktivitas Protease (%)	
		Peningkatan Terhadap Negatif	Penurunan Terhadap Positif
Kelompok A (negatif)	0,101 ± 0,008 ^a		
Kelompok B (positif)	0,200 ± 0,007 ^c	98%	
Kelompok C (0,5ml)	0,114 ± 0,013 ^a		43%
Kelompok D (1ml)	0,172 ± 0,008 ^b		11 %
Kelompok E (1,5ml)	0,180 ± 0,008 ^b		10%

Keterangan: Notasi (^a, ^b, dan ^c,) yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$) antara kelompok perlakuan.

Kelompok A (kontrol negatif) menunjukkan nilai aktivitas protease yang terendah yaitu sebesar 0,101 ± 0,008 nmol.mL/menit. Protease adalah enzim yang mengkatalisasi pemecahan ikatan peptida dalam peptida, polipeptida, dan protein dengan menggunakan reaksi menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana

seperti peptida rantai pendek, dan asam amino (Motyan, 2013). Menurut Saptono (2014) enzim proteolitik yang dihasilkan oleh duodenum dalam keadaan normal berfungsi untuk memecah protein makanan menjadi asam amino dan mencerna sel-sel epitel yang secara teratur lepas ke dalam lumen untuk diganti dengan sel yang baru (regenerasi lumen). Enzim protease yang ada pada saluran pencernaan adalah pepsin, tripsin, kimotripsin, dan elastase. Protease yang berada di saluran pencernaan disintesis dalam bentuk besar yang inaktif dan dikenal sebagai zimogen. Setelah disekresikan ke dalam saluran cerna, zimogen tersebut mengalami suatu reaksi untuk menghasilkan protease yang aktif. Nilai aktivitas protease pada kontrol negatif digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan yang terjadi karena adanya pengaruh perlakuan.

Hasil uji statistik *One-Way ANOVA* menggunakan *statistical package for the social science (SPSS) version 16.0 for windows* dengan tingkat kepercayaan 95% menunjukkan signifikansi sebesar 0,000 yang berarti terdapat perbedaan yang sangat nyata pada kelima perlakuan tersebut. Hasil uji lanjutan *Tukey test* menunjukkan adanya perbedaan notasi yang berarti terdapat pengaruh perlakuan terhadap masing-masing kelompok (**Lampiran 5**).

Berdasarkan uji lanjutan *Tukey test*, kelompok 2 (kontrol positif) memiliki notasi yang berbeda dengan kelompok A (kontrol negatif) (**Tabel 5.1**). Notasi tersebut menunjukkan bahwa aktivitas protease pada kelompok B (positif) dan kelompok A (negatif) berbeda sangat nyata karena adanya pengaruh perlakuan pemberian rhodamin B yang dicampur pakan pada kontrol positif. Peningkatan pada kontrol positif adalah peningkatan yang tertinggi yaitu sebesar 98 %. Hasil

statistik ini membuktikan bahwa induksi rhodamin B secara peroral dapat meningkatkan aktivitas enzim protease. Peningkatan aktivitas protease dapat terjadi karena pengaruh rhodamin B yang memicu terjadinya reaksi inflamasi pada saluran pencernaan karena ion Cl^- akan meningkatkan kadar ROS (Xiong, 2001). ROS akan mengaktivasi NF- κ B yang kemudian memproduksi TNF- α yang mengaktifkan neutrofil dan makrofag untuk mensintesis enzim protease (Abbas dkk., 2015).

Hasil uji statistik kelompok C (0,5 ml) memiliki notasi yang sama dengan kelompok A (negatif). Pemberian volume 0,5 ml perasan bawang putih (*Allium sativum*) mengalami penurunan kadar protease sebesar 40% terhadap kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian volume 0,5 ml/200 gram BB perasan bawang putih efektif menurunkan aktivitas protease. Menurut Lawrence (2011) terdapat senyawa utama pada bawang putih yaitu allisin yang berperan sebagai antioksidan dengan aktivitas penghambat reaksi hidroksil dan peroksidasi lipid, serta ditemukan bahwa senyawa tersebut aktif terhadap kerusakan radikal bebas, karena radikal bebas (ROS) berkurang maka aktivitas enzim protease menurun.

Antioksidan allisin juga berperan sebagai penghambat *chain reaction* oleh radikal bebas sehingga menurunkan sekresi dan aktivitas protease hingga kadar yang masih seimbang dengan antiprotease. Dugaan ini diperkuat oleh Pratiwi dkk., (2006) yang menyatakan bahwa antioksidan memecah ROS dalam tubuh dengan cara menangkap radikal bebas, mereduksi, mendonorkan atom hidrogen dan mengikat oksigen singlet. Keadaan ini menyebabkan *chain reaction* terhenti

sehingga oksidan dan antioksidan kembali menjadi stabil. Keseimbangan tersebut menurunkan sekresi neutrofil protease hingga mencapai kestabilan dengan antiprotease dan mengurangi aktivitas protease. Pemberian volume 0,5 ml perasan bawang putih (*Allium sativum*) menunjukkan kadar protease yang mendekati kadar protease kelompok A (negatif) hewan sehat, sehingga volume 0,5 ml merupakan volume terbaik dalam penelitian ini karena pemberian berlebih perasan bawang putih mengakibatkan peningkatan aktivitas protease.

Kelompok D (1 ml), dan kelompok E (1,5 ml) masing-masing memiliki notasi yang berbeda dengan kelompok A (Positif) dan B (negatif). Pemberian volume 1 ml perasan bawang putih (*Allium sativum*) menurunkan kadar protease sebesar 11% terhadap kontrol positif. Pemberian volume 1,5 ml perasan bawang putih (*Allium sativum*) mengalami penurunan kadar protease sebesar 10% terhadap kontrol positif. Hal ini disebabkan oleh ion sulfur (S) pada allisin yang berikatan dengan ion Cl^- pada rhodamin B namun, diduga Kelompok D (1 ml) dan kelompok E (1,5 ml) berlebihan ion sulfur (S) yang tidak berikatan dengan Cl^- . Berdasarkan nomor atomnya (16) diketahui bahwa sulfur tidak stabil didalam tubuh sehingga menjadi radikal bebas dan berusaha untuk melengkapi lapisan terluar tersebut agar lebih stabil dengan cara mengikat molekul-molekul lain (Hidayat dkk., 2013),(Ambarsani dkk, 2013).

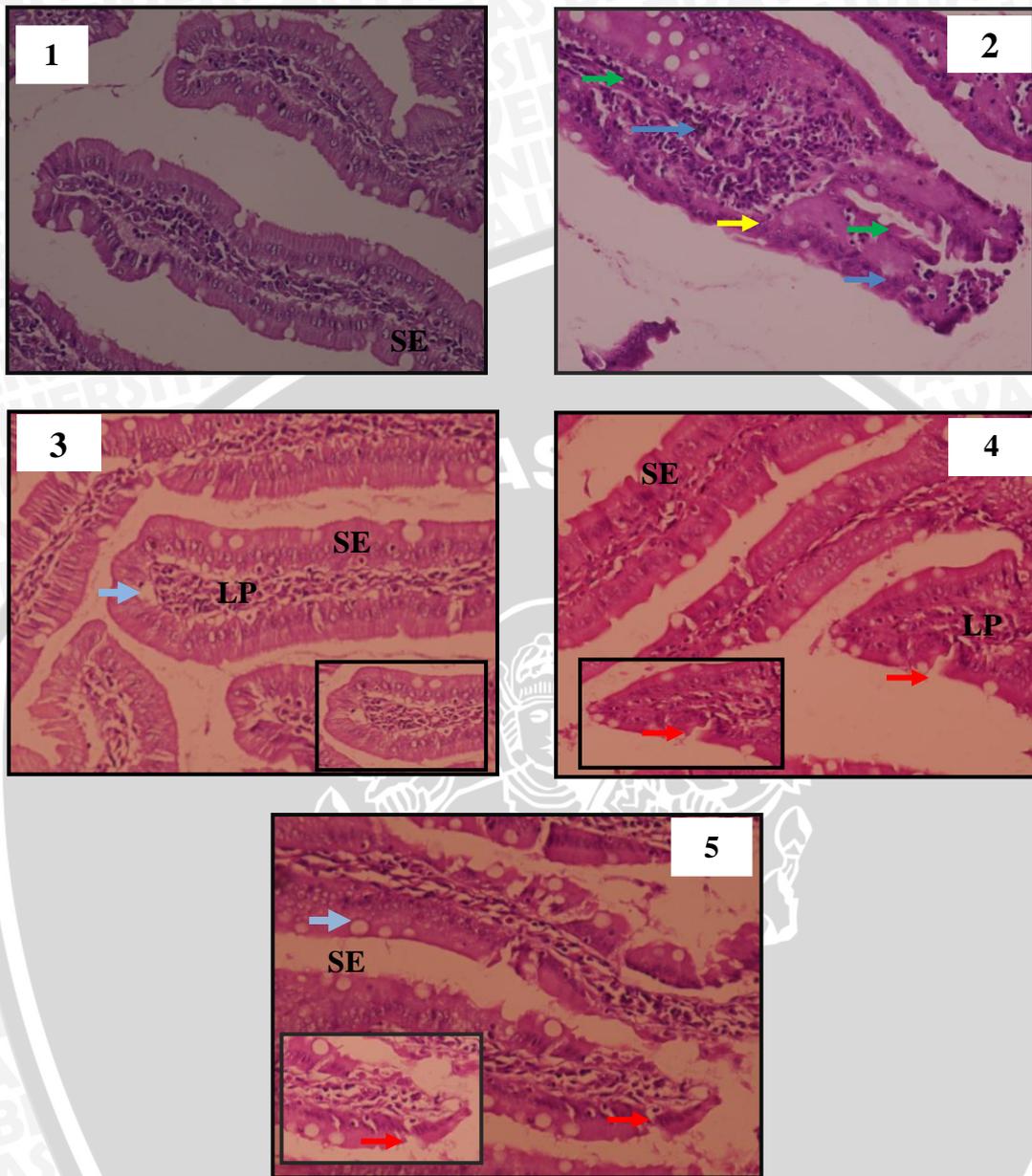
Allisin ($C_6H_{10}S_2O$) merupakan anti-oksidan utama dalam bawang putih. Senyawa ini mampu menekan produksi nitrat oksida (NO) melalui 2 jalur, yakni pada konsentrasi rendah ($10 \mu M$), menghambat kerja enzim cytokine-induced NO

synthase (iNOS) melalui pengendalian iNOS mRNA, sedangkan pada konsentrasi tinggi H₁ (40 μ M) menghambat transport arginin melalui mekanisme pengendalian CAT-2 mRNA (cationic amino acid transporter-2 mRNA). Akumulasi NO akan menginduksi pembentukan oksidator kuat, peroksinitrit. (Hernawan dan Setyawan, 2003).

5.2 Pengaruh Pemberian Perasan Bawang Putih (*Allium sativum*) Sebagai Antioksidan Terhadap Histopatologi Duodenum pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang di induksi Rhodamin B

Duodenum merupakan organ bagian dari usus halus yang berhubungan langsung dengan lambung. Sebagian besar penyerapan karbohidrat dan lipid terjadi di duodenum dan jejunum bagian atas (Abdi, 2012). Struktur duodenum secara mikroskopis dari dalam ke luar tersusun atas tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis (interna dan eksterna), dan tunika serosa. Tunika mukosa merupakan lamina propria yang menonjol ke lumen seperti jari-jari (vili) yang dibatasi oleh jaringan epitel (Junquiera dan Carneiro, 2005).

Kerusakan yang terjadi pada duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) induksi rhodamin B dan pengaruh tindakan preventif pemberian perasan bawang putih (*Allium sativum*) dapat dilihat melalui pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE). Hasil pewarnaan HE akan menunjukkan adanya perbedaan gambaran histopatologi sel epitel, permukaan tunika mukosa, dan adanya sel goblet (**Gambar 5.1**).



Gambar 5.1 Histopatologi duodenum tikus putih dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE), perbesaran 400x.

Keterangan:

- (1) Tikus kontrol negatif; (2) tikus kontrol positif; (3) perasan bawang putih 0,5 ml; (4) perasan bawang putih 0,5 ml; (5) perasan bawang putih 1,5 ml;. SE menunjukkan jaringan epitel dan LP menunjukkan lamina propria. Tanda panah merah (→) menunjukkan erosi (ruptur) epital, tanda panah biru (→) menunjukkan adanya sel goblet mengalami hipertofi, tanda parah kuning (→) menunjukkan adanya infiltrasi sel radang ,tanda panah hijau (→) menunjukkan eksudat fibrinosa.

Dalam proses pencernaan, vili usus halus memiliki peranan penting dalam proses absorpsi nutrisi dan air karena tersusun atas sel absorptif yang berupa epitel selapis silindris dengan *striated border* di vili tunika mukosa. Salah satu segmen usus halus tempat berlangsungnya absorpsi paling besar adalah duodenum. Ingesti bahan aktif rhodamin B (Cl) ke dalam sistem pencernaan akan terabsorpsi oleh vili usus dan mengakibatkan ulserasi gastrointestinal yang dapat berdampak pada pemendekan bahkan kehilangan vili duodenum, jejunum, maupun ileum (Purnama, dkk., 2013). Secara anatomis, letak duodenum yang berdekatan dengan lambung menyebabkan duodenum lebih sering mengalami *ulcer* diantara bagian usus halus lainnya. Derajat kerusakan yang terjadi pada duodenum tergantung pada dosis, konsentrasi, dan lama paparan rhodamin B (Pongsavee, 2009). Pada penelitian ini digunakan dosis paparan 600 ppm yang diberikan secara per oral dicampur pakan selama 14 hari.

Gambaran histologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok A (K-) (**Gambar 5.2A**) menunjukkan bahwa tunika mukosa duodenum dalam kondisi normal dan tidak ditemukan adanya kerusakan. Hal tersebut ditandai dengan sel epitel kolumnar berbentuk utuh dan tersusun secara teratur sebaris. Diantara sel-sel epitel terdapat Sel goblet berfungsi untuk melindungi dan melumasi lapisan usus dengan cara menghasilkan mucin glikoprotein (Mescher, 2010). Menurut Abdi (2012), sel-sel epitel duodenum normal berbentuk kolumnar selapis dan terlihat utuh. Sedangkan, gambaran histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok B (K+) (**Gambar 5.2B**) ditemukan adanya kerusakan tunika mukosa yang ditandai permukaan vili menjadi kasar, terdapat banyak erosi

epitel (ruptur), inti sel mengalami piknotik, infiltrasi sel radang, eksudat fibrinosa (kematian sel) dan ditemukan sel-sel goblet yang lebih banyak dibandingkan kelompok kontrol negatif (K-), hal ini dikarenakan sel goblet berusaha melindungi vili duodenum dari Cl⁻ dengan menghasilkan mucin glikoprotein. Eksudat fibrinosa yang terbentuk jika protein yang dikeluarkan dari pembuluh dan terkumpul pada daerah peradangan yang mengandung banyak fibrinogen, eksudat fibrinosa sering dijumpai diatas permukaan serosa yang meradang dan berakhir pada kematian sel.

Kerusakan terjadi karena pengaruh rhodamin B secara ekstensif diabsorpsi oleh traktus gastrointestinal dan dimetabolisme pada anjing, kucing, dan tikus dengan hanya 3-5% dari dosis rhodamin B yang dimasukkan dapat ditemukan dalam bentuk aslinya atau tanpa perubahan di urin dan feces (Kirana, 2009). Senyawa klorin (Cl⁻) yang tidak stabil dalam rhodamin B tersebut menginduksi pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS tersebut menyebabkan terjadinya stres oksidatif diberbagai tipe sel dan jaringan (Pratiwi dkk, 2013). Stres oksidatif mengakibatkan kerusakan komponen-komponen tubuh termasuk struktur lipid. Membran sel tersusun atas karbohidrat, protein, dan lipid yang tersusun secara bilayer (Isnaeni, 2006). Menurut Abdi (2012), inflamasi pada duodenum ditandai dengan adanya infiltrasi sel-sel radang seperti limfosit, neutrofil, tunika mukosa mengalami edema, kerusakan sel epitel silindris, serta hipertrofi sel goblet. Menurut Robbins *et al* (2007) hipertrofi merupakan kelainan progresif berupa bertambahnya isi atau volume suatu jaringan atau alat tubuh yang terjadi pada sel-sel yang tidak dapat memperbanyak diri sehingga sel-sel

yang menyusun jaringan tersebut membesar. Pada kondisi tersebut membesarnya jaringan disebabkan sel-sel yang menyusunnya membesar, bukan karena bertambahnya jumlah sel.

Gambaran histopatologi duodenum kelompok tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok C (0,5 ml) terdapat pencegahan kerusakan vili duodenum dan lebih mendekati gambaran histopatologi kelompok A (K-) (**Gambar 5.2**). Banyak sel-sel epitel yang terlindungi, namun masih terdapat kerusakan. Jumlah sel goblet yang muncul pada gambaran histopatologi duodenum kelompok A (0,5 ml) lebih sedikit mendekati normal dibandingkan kelompok kontrol positif (K+). Pencegahan terjadi karena kandungan allisin dalam bawang putih (*Allium sativum*). Allisin merupakan anti-oksidan utama dalam bawang putih. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Ambarsani dkk, 2013). Atom sulfur (S) pada allisin akan berikatan dengan Cl^- dalam rhodamin B sehingga meminimalkan pembentukan ROS karena akan membentuk SCl_2 yang stabil. Keadaan tersebut menghambat reaksi berantai dari pembentukan ROS sehingga peroksidasi lipid pada membran sel epitel tidak terjadi dan menghambat adanya kerusakan pada vili duodenum.

Peroksidasi lipid menyebabkan membran sel mengalami kerusakan dan dapat menyebabkan sel kehilangan fungsi selulernya hingga secara total. Menurut Winarsi (2007), terdapat 3 mekanisme kerusakan membran sel, yaitu (1) Terjadinya ikatan kovalen antara radikal bebas dengan komponen penyusun membran mengakibatkan perubahan struktur dan fungsi reseptor; (2) Oksidasi

gugus *thiol* pada komponen membran oleh radikal bebas sehingga menyebabkan proses transpor yang terjadi pada membran terganggu; (3) Reaksi peroksidasi lipid membran yang mengandung PUFA. Target dari ROS yaitu lipoprotein, protein, asam lemak tak jenuh, unsur RNA dan DNA termasuk karbohidrat. Pada duodenum, peroksidasi lipid tersebut mengakibatkan kerusakan membran sel epitel, permukaan tunika mukosa menjadi kasar dan *irregular*.

Gambaran histopatologi duodenum pada kelompok D (1 ml) dan E (1,5 ml) sangat buruk dibandingkan kontrol negatif. Hal tersebut dikarenakan pada pemberian volume 1 ml dan 1,5 ml justru dapat meningkatkan produksi ROS akibat kelebihan atom sulfur (S) pada allisin yang sudah tidak berikatan lagi dengan radikal bebas. Jumlah antioksidan yang berlebihan tidak dapat dinetralisir di dalam tubuh sehingga merusak vili pada duodenum karena diketahui sifat sulfur (S) menurut Ambarsani dkk (2013) memiliki sifat panas bila terkena mukosa dan juga reaktif terhadap sel epitel pada vili duodenum. Jumlah atom sulfur (S) yang berlebih dapat memicu peningkatan produksi ROS yang menyebabkan peroksidasi lipid yang berujung pada kerusakan sel.