

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Air Minum dari Pipa *Polyvinyl Chloride* (PVC) yang Terlapis Pb terhadap Aktivitas Protease Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*).

Aktivitas protease yang diukur dengan alat spektrofotometri dan didapatkan data seperti tertera pada **Tabel 5.1**, protease merupakan enzim yang digunakan untuk menghidrolisis ikatan peptida pada protein.

Tabel 5.1 Aktivitas Protease pada Hepar Tikus Putih yang Terpapar Pb

Kelompok	Rata-Rata Aktivitas Protease ($\mu\text{mol/mL.menit}$)	Peningkatan Aktivitas Protease Terhadap Kontrol Negatif (%)
Kelompok 1 (Kontrol Negatif)	$0,0502 \pm 0,0086^a$	-
Kelompok 2 (Kontrol Positif)	$0,1252 \pm 0,0143^c$	149,4
Kelompok 3 (Pipa PVC "A")	$0,0505 \pm 0,0078^a$	0,6
Kelompok 4 (Pipa PVC "B")	$0,0867 \pm 0,0033^b$	72,7
Kelompok 5 (Pipa PVC "C")	$0,0967 \pm 0,0033^b$	92,6

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

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).

Hasil uji statistik *One-Way ANOVA* menggunakan aplikasi *statistical package for the social science* (SPSS) for Windows 16 nilai *p-value* ($p < 0,01$)

dengan tingkat kepercayaan 99% menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada masing-masing kelompok, maka diperlukan uji lanjut yaitu *Tukey test* 5%. Hasil *Tukey test* 5% menunjukkan adanya perbedaan notasi yang berarti terdapat pengaruh perlakuan terhadap masing-masing kelompok (**Lampiran 13**).

Pemberian air rendaman pipa PVC “B” dan “C” secara signifikan ($p < 0,05$) meningkatkan aktivitas protease pada hewan coba sebagaimana ditunjukkan pada (**Tabel 5.1**) dan perhitungan statistika secara lengkap dapat dilihat di (**Lampiran 11**). Sedangkan, pipa PVC “A” menunjukkan aktivitas protease terendah dan memiliki perbedaan yang tidak signifikan dengan kontrol negatif yaitu $0,0505 \pm 0,0078 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$. Hasil ini sesuai dengan hasil analisis laboratorium bahwa air yang menggunakan pipa PVC “A” tidak terdeteksi adanya kandungan timbal (**Lampiran 3**).

Hasil analisa dengan menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa aktivitas protease pada kelompok kontrol negatif yaitu $0,0502 \pm 0,0086 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$ merupakan standar yang dipergunakan untuk menentukan adanya peningkatan atau penurunan yang terjadi karena pengaruh perlakuan. Aktivitas protease pada kelompok kontrol positif yaitu $0,1252 \pm 0,0143 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$. Aktivitas protease pada kelompok kontrol positif berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kontrol negatif dengan peningkatan sebesar 149,4% (**Lampiran 12**). Hasil uji statistik pada kelompok pipa PVC “A”, “B”, dan “C” masing-masing memiliki penurunan aktivitas yang berbeda terhadap kontrol positif ($p < 0,05$). Aktivitas protease pada kelompok pipa PVC “A” yaitu $0,0505 \pm 0,0078 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$,

kelompok pipa PVC “B” yaitu $0,0867 \pm 0,0033 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$ dan kelompok pipa PVC “C” yaitu $0,0967 \pm 0,0033 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$ (**Tabel 5.1**).

Aktivitas protease merupakan indikator adanya 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.

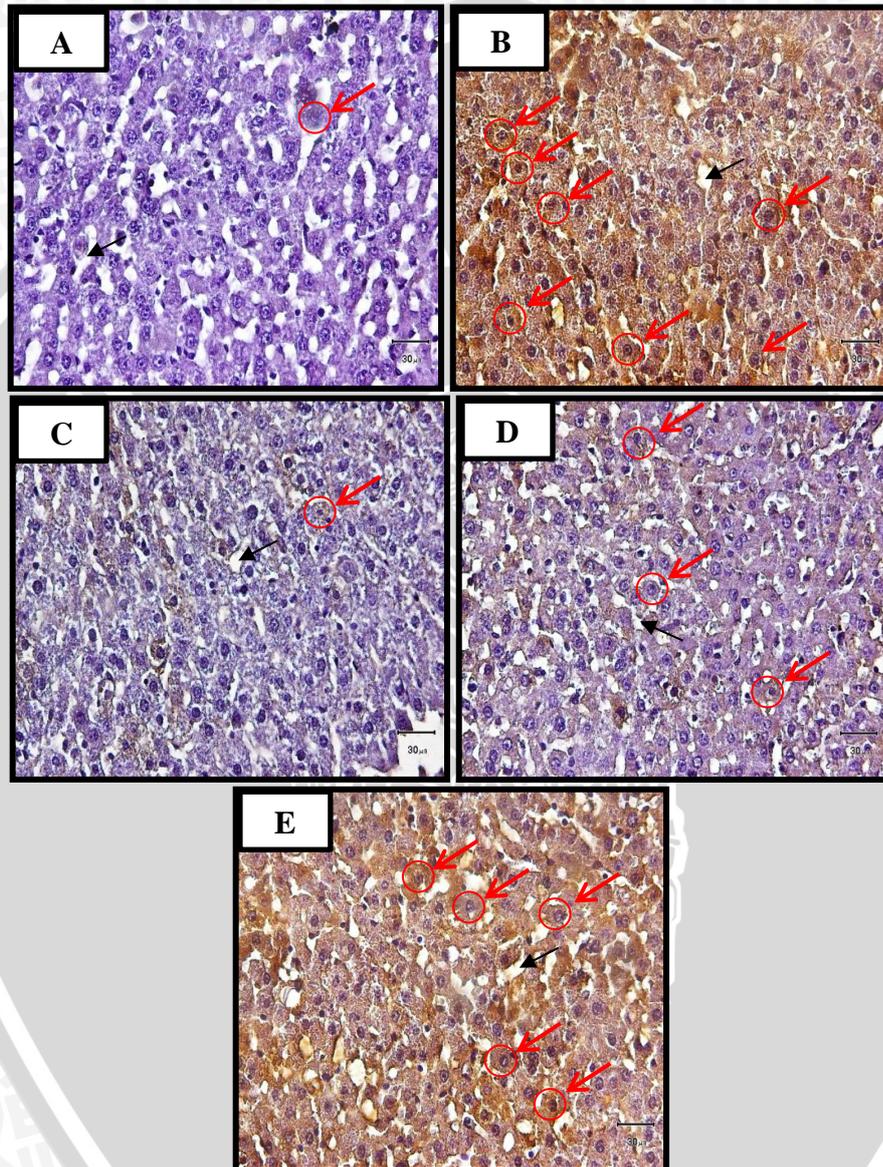
Peningkatan aktivitas protease pada kontrol positif dikarenakan adanya peningkatan ROS yang disebabkan oleh induksi Pb serta menyebabkan terjadinya proses inflamasi pada hepar tikus dengan mengaktifkan sel-sel inflamasi serta pelepasan enzim protease. Induksi Pb secara peroral dapat meningkatkan aktivitas enzim protease. Peningkatan aktivitas protease dapat terjadi karena pengaruh Pb yang memicu terjadinya reaksi inflamasi pada hepar karena Pb akan meningkatkan kadar ROS (Aziz, 2014). *Reactive Oxygen Species* akan mengaktifasi NF- κ B, kemudian memproduksi TNF- α yang mengaktifkan neutrofil dan makrofag untuk mensintesis enzim protease (Abbas dkk., 2015).

Aktivitas protease pada penggunaan pipa PVC menunjukkan bahwa Pb yang terlapis pada pipa PVC dapat terlarut pada air rendaman pipa PVC tersebut, kemudian Pb akan diabsorpsi oleh organ pencernaan kemudian dimetabolisme dan berubah menjadi Pb^{2+} yang memiliki atom bebas pada lapisan luarnya. Atom bebas ini mengakibatkan Pb menjadi radikal bebas dan berusaha untuk melengkapi lapisan terluar tersebut agar lebih stabil dengan cara mengikat molekul-molekul lain (Hidayat dkk., 2013).

Keadaan ini akan mengakibatkan terbentuknya ROS. Produksi ROS yang berlebihan akan mengaktivasi NF- κ B dengan cara fosforilasi secara cepat dan degradasi sebagian proteasomal dari I κ B α (protein inhibitor dari NF- κ B). Selanjutnya, NF- κ B akan bertranslokasi di nukleus untuk meregulasi ekspresi sitokin pro-inflamasi, salah satunya adalah TNF- α (Rosanna, 2012). *Tumor Necrosis Factor α* akan mengaktifkan neutrofil beserta makrofag. Neutrofil yang telah aktif akan memproduksi enzim protease. Adanya paparan plumbum dari pipa PVC dapat mengakibatkan terbentuknya radikal bebas yang berlebih memicu pengaktifan neutrofil yang merupakan sistem imun pertama, sehingga adanya reaksi tersebut menyebabkan peningkatan aktivitas protease (Abbas dkk., 2015).

Hal tersebut sesuai dengan nilai aktivitas protease yang meningkat pada kelompok pipa PVC "B", tipe "C" serta kelompok kontrol positif sedangkan aktivitas protease pada kelompok pipa PVC "A" menunjukkan peningkatan aktivitas protease paling rendah dan mendekati kadar protease kelompok kontrol negatif, sehingga kelompok pipa PVC "A" tidak memberikan pengaruh terhadap peningkatan aktivitas protease pada hepar.

5.2 Pengaruh Pemberian Air Minum dari Pipa *Polyvinyl Chloride* (PVC) yang Terlapis Pb terhadap Ekspresi TNF- α Hepar pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*).



Gambar 5.2 Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada Gambaran Immunohistokimia Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) Perbersaran 400x

Keterangan gambar 5.2 : (A) tikus kontrol negatif, (B) tikus kontrol positif, (C) tikus induksi air pipa tipe “A”, (D) tikus induksi air pipa tipe “B”, (E) tikus induksi air pipa tipe “C”. Tanda panah (\blacktriangleleft) menunjukkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) dan tanda panah (\blacktriangleright) menunjukkan sinusoid.

Tabel 5.2 Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) Hepar pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Air Minum dari Pipa PVC yang Terlapis Pb

Kelompok	Rata-Rata Persentase Ekspresi TNF- α	Peningkatan Ekspresi TNF- α Terhadap Kontrol Negatif (%)
Kelompok 1 (Kontrol Negatif)	0,9200 \pm 0,0828 ^a	-
Kelompok 2 (Kontrol Positif)	10,9475 \pm 0,1867 ^d	1089,9
Kelompok 3 (Pipa PVC "A")	1,1925 \pm 0,1014 ^a	29,6
Kelompok 4 (Pipa PVC "B")	5,9475 \pm 0,2114 ^b	546,4
Kelompok 5 (Pipa PVC "C")	8,7575 \pm 0,2843 ^c	851,9

Keterangan: notasi a,b,c,d menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan tiap kelompok ($p < 0,05$)

Analisis ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) (**Tabel 5.2**) pada penelitian ini dilakukan dengan melakukan rata-rata lima lapang pandang persentase ekspresi TNF- α pada hepar perbersaran 400x yang diproses melalui aplikasi *Immunoratio* pada setiap tikus pada semua ulangan tiap perlakuan, kemudian dilakukan analisis statistika menggunakan *One Way ANOVA* dengan aplikasi *SPSS for Windows 16* dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan taraf kepercayaan $\alpha = 5\%$ (**Lampiran 15**).

Ekspresi TNF- α terlihat pada semua kelompok dan tersebar pada sel hepatosit yang ditunjukkan dengan tanda panah merah (**Gambar 5.2**). Pada (**Gambar 5.2 A**) merupakan gambaran immunohistokimia (IHK) hepar kontrol negatif, terdapat ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada kelompok kontrol negatif (**Tabel 5.2**) yaitu 0,9200 \pm 0,0828. Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada kelompok kontrol positif (**Gambar 5.2 B**) mengalami peningkatan yang sangat tinggi yaitu 1089,9% lebih banyak dari kontrol negatif.

Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) pada kelompok pipa PVC “A” (**Gambar 5.2 C**) menunjukkan ekspresi TNF- α yang paling rendah dengan penurunan ekspresi TNF- α sebesar 89,1 % terhadap kelompok kontrol positif yaitu $1,1925 \pm 0,1014$ (**Tabel 5.2**). Kelompok pipa PVC “B” (**Gambar 5.2 D**) menunjukkan penurunan ekspresi TNF- α sebesar 45,7 % terhadap kontrol positif. Kelompok pipa PVC “C” (**Gambar 5.2 E**) menunjukkan penurunan ekspresi TNF- α sebesar 20 % terhadap kontrol positif.

Ekspresi TNF- α sebagai salah satu sitokin proinflamasi pada organ hepar yang ditunjukkan oleh gambaran jaringan hepar (**Gambar 5.2**). Ekspresi TNF- α dengan teknik imunohistokimia ditunjukkan spot warna kecoklatan. Akumulasi bercak warna coklat menunjukkan adanya interaksi antara TNF- α pada jaringan hepar dengan antibodi yang ditambahkan (antibodi primer anti TNF- α dan anti rabbit labeled biotin). Menurut Duerr (2006) antibodi primer berikatan dengan antigen pada jaringan dan antibodi sekunder berlabel biotin. Pemberian antibodi sekunder diikuti penambahan Streptavidin-Horseradish Peroxidase (SA-HRP) dan substratnya berupa Diaminobenzidine (DAB). Diaminobenzidine (DAB) merupakan substrat dari peroksidase yang menghasilkan warna kecoklatan pada jaringan.

Adanya ekspresi TNF- α pada kelompok kontrol negatif karena TNF- α secara normal terdapat pada hepar dalam jumlah relatif sedikit sebagai komponen imunitas. *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) merupakan suatu sitokin yang dihasilkan oleh leukosit yang berfungsi untuk merangsang dan mengaktifkan sistem imun terhadap respon inflamasi, dimana dalam keadaan normal, antigen

yang masuk memicu reaktivitas imun pada imunitas nonspesifik maupun spesifik (Baratawidjaja, 2004).

Peningkatan ekspresi TNF- α kelompok kontrol positif berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kontrol negatif. Peningkatan produksi TNF- α pada tikus kontrol positif diakibatkan oleh adanya peningkatan ROS yang disebabkan oleh induksi Pb sehingga terjadi proses inflamasi pada hepar tikus dengan teraktivasinya sitokin proinflamasi TNF- α .

Induksi Pb secara peroral dapat meningkatkan TNF- α . Peningkatan TNF- α dapat terjadi karena pengaruh Pb yang memicu terjadinya reaksi inflamasi pada hepar karena Pb akan meningkatkan kadar ROS (Aziz, 2014). *Reactive Oxygen Species* akan mengaktivasi NF- κ B, kemudian memproduksi TNF- α yang mengaktifkan neutrofil dan makrofag (Abbas dkk., 2015).

Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) mengubah distribusi reseptor adhesi pada perlekatan antar sel yang mengakibatkan perubahan struktur *intercellular junction* sehingga terjadi peningkatan permeabilitas pada endothel. *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) juga secara langsung dapat menginduksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) salah satunya pada sel hepatosit. Pengikatan TNF- α pada reseptor permukaan sel menyebabkan terjadinya perubahan metabolik intraselular yang dapat memediasi apoptosis dan nekrosis sel hepar (Navarro-Gonzales and Mora-Fernandez, 2008).

Hal tersebut sesuai dengan ekspresi TNF- α kelompok pipa PVC “B”, “C” dan kontrol positif yang mengalami peningkatan sedangkan kelompok pipa PVC “A” menunjukkan ekspresi TNF- α yang paling rendah dan mendekati ekspresi

TNF- α kelompok kontrol negatif, sehingga kelompok pipa PVC “A” tidak memberikan pengaruh terhadap peningkatan ekspresi TNF- α pada hepar. Hal ini sesuai dengan laporan hasil analisa air menggunakan metode spektrofotometri serapan atom (**Lampiran 3**) yang menunjukkan bahwa pipa PVC “A” tidak terdapat adanya paparan timbal.

