

PENGARUH PEMBERIAN MADU SUMBAWA (*Apis dorsatta*) TERHADAP AKTIVITAS PROTEASE DAN KADAR MDA (*Malondialdehyde*) PADA HEPAR TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI DIAZINON

SKRIPSI

Oleh:

**ILHAM MAULANA HABIBILLAH
145130101111050**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR PUSTAKA	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Batasan Masalah	4
1.4. Tujuan	5
1.5. Manfaat	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Diazinon	7
2.2. Mekanisme Kerja Diazinon	8
2.3. Anatomi Hepar	9
2.4. Fisiologi Hepar	11
2.5. Akibat Toksisitas Diazinon	12
2.6. Hubungan MDA (<i>Malondialdehyde</i>) Dengan Residu Diazinon ..	13
2.7. Hubungan Protease Dengan Residu Diazinon	14
2.8. Madu Sumbawa	14
2.9. Hewan Coba Tikus Putih	19
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1. Kerangka Konseptual	20
3.2. Hipotesis Penelitian	23
BAB 4. METODE PENELITIAN	24
4.1. Waktu dan Tempat Penelitian	24
4.2. Rancangan Penelitian	24
4.3. Alat dan Bahan	26
4.4. Tahapan Penelitian	27
4.5. Variabel Penelitian	27
4.6. Prosedur Kerja	27
4.6.1. Persiapan Hewan Coba	28
4.6.2. Induksi Diazinon	28
4.6.3. Terapi Madu Sumbawa	28
4.6.4. Pengambilan Sampel Organ Hepar	29



4.6.6. Isolasi Protease	29
4.6.7. Pengukuran Aktivitas Protease	30
4.6.8. Pengukuran Kadar MDA.....	31
4.6.9. Analisa Data	31
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	32
5.1. Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa terhadap Aktivitas Protease pada Hepar Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi Diazinon.....	32
5.2. Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa terhadap Kadar <i>Mallondialdehyde</i> (MDA) pada Hepar Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi Diazinon	37
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	42
6.1. Kesimpulan.....	42
6.2. Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	49



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Rancangan Penelitian.....	25
5.1. Rata-rata Aktivitas Protease Hepar Tikus Putih.....	32
5.2. Rata-rata Aktivitas MDA Hepar Tikus Putih.....	38



DAFTAR GAMBAR

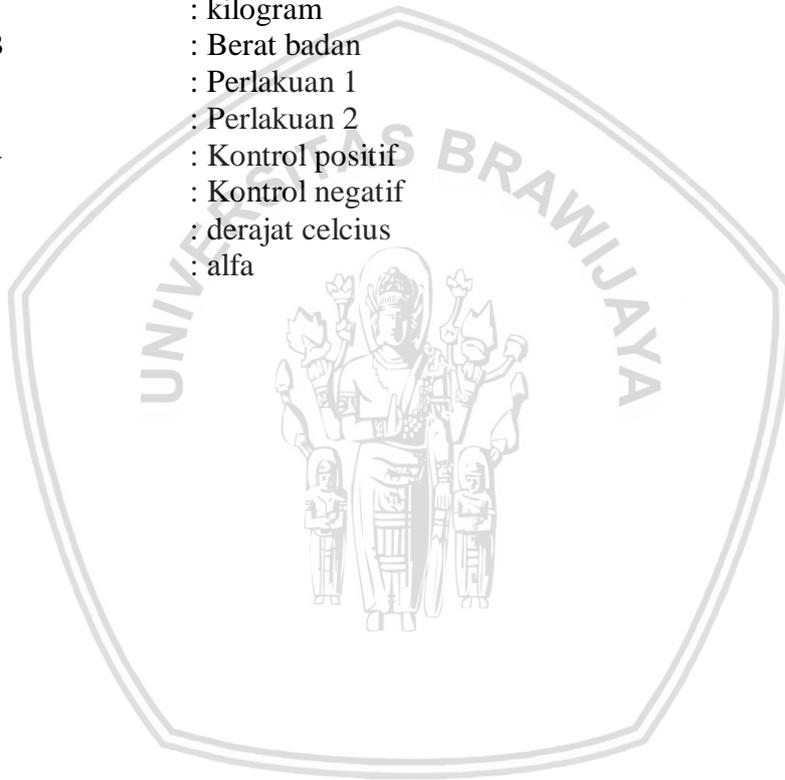
Gambar Halaman

2.1 Struktur Diazinon	7
2.2. Metabolisme Diazinon	9
2.3. Anatomi Hepar Tikus.....	10



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
BNJ	: Beda Nyata Jujur
p	: panjang
l	: lebar
t	: tinggi
cm	: sentimeter
mL	: mililiter
μ L	: mikroliter
mg	: miligram
kg	: kilogram
BB	: Berat badan
P1	: Perlakuan 1
P2	: Perlakuan 2
K+	: Kontrol positif
K-	: Kontrol negatif
$^{\circ}$ C	: derajat celcius
α	: alfa



Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa Terhadap Aktivitas Protease Dan Kadar *Malondialdehyde* (MDA) Pada Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Diazinon

ABSTRAK

Diazinon merupakan salah satu organofosfat yang biasa digunakan oleh petani untuk membasmi hama. Paparan diazinon secara terus-menerus dapat menyebabkan peningkatan ROS dan menyebabkan kerusakan pada sel-sel tubuh termasuk hepar. Madu Sumbawa diketahui mengandung antioksidan seperti flavonoid, polifenol dan vitamin C sehingga dapat digunakan untuk menangkap radikal bebas dan meningkatkan kadar antioksidan yang diperlukan oleh tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian madu Sumbawa pada tikus yang diinduksi diazinon berdasarkan aktivitas protease dan kadar MDA hepar tikus. Tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan dengan berat 130-180 gram. Kelompok kontrol (-) merupakan kelompok yang tidak diinduksi diazinon dan madu sumbawa. Kelompok kontrol (+), kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 merupakan kelompok yang diinduksi diazinon dengan dosis 60 mg/kgBB selama 7 hari. Kelompok kontrol (+) tidak diberikan terapi madu sumbawa. Sedangkan pada kelompok perlakuan 1 diberikan terapi madu Sumbawa dengan konsentrasi 25%, kelompok perlakuan 2 diberikan terapi madu Sumbawa dengan konsentrasi 50% dan kelompok perlakuan 3 diberikan terapi madu Sumbawa dengan konsentrasi 75%. Terapi madu Sumbawa diberikan selama 14 hari sebanyak 1 ml setiap harinya. Hasil dari penelitian ini dihitung dengan pengukuran *one-way* ANOVA. pemberian 1 ml madu Sumbawa dengan konsentrasi 25%, 50% dan 75% mampu menurunkan aktivitas protease dan kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon. Hal tersebut telah ditunjukkan pada kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 yang berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol (+). Kesimpulannya adalah Pemberian terapi madu Sumbawa dengan konsentrasi 25%, 50% dan 75% telah mampu menurunkan aktivitas protease dan kadar MDA pada hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon dibanding kontrol (+) dengan konsentrasi terbaiknya adalah 75% dan konsentrasi efektifnya adalah 25%.

Kata kunci : *diazinon, hepar, madu Sumbawa, protease, MDA.*

The Influence Of Giving Sumbawa Honey Toward Protease Activity and Malondialdehyde (MDA) in Hepar of *Rattus norvegicus* Induced Diazinon

ABSTRACT

Diazinon is one of organophosphate which used to eradicate of pest. Exposure diazinon continuously can increase ROS and cause damage on the cells of body including the hepar. Sumbawa honey is known contains antioxidants like vitamin C, flavonoids and polifenol so it can use to binding the oxidant and increase the levels of antioxidants that are needed by the body. This research aims to know the effectiveness of administering Sumbawa honey in rat that induced diazinon based on the levels of MDA and protease activity of rats hepar. The rats used in the study was a rat (*Rattus norvegicus*) males weighing 130-180 grams. (-) control group is group which is not induced diazinon and Sumbawa honey. (+) control group, treatment group 1, 2, and 3 is group that induced diazinon 60 mg/kgBB. (+) control group not given the therapy Sumbawa honey. Treatment group 1 given Sumbawa honey with concentration 25%, treatment group 2 given Sumbawa honey with concentration 50% and treatment group 3 given sumbawa honey with concentration 75%. Sumbawa honey therapy is given for 14 days as much 1 ml every day. The results of this research were calculated by one-way ANOVA measurements. administration of 1 ml of Sumbawa honey with a concentration of 25%, 50% and 75% was able to reduce protease activity and mallondialdehyde (MDA) levels in the hepar of white rats (*Rattus norvegicus*) that induced by diazinon. That thing was showed in treatment groups 1, 2 and 3 which were significantly different ($p < 0.05$) with the (+) control group. The conclusion is that the treatment of Sumbawa honey with a concentration of 25%, 50% and 75% has been able to reduce protease activity and MDA levels in the hepar of white rats (*Rattus norvegicus*) that induced of diazinone compared (+) control with the best concentration is 75% and the effective concentration is 25 %.

Key word : *diazinon, hepar, Sumbawa honey, protease, MDA.*

PENGARUH PEMBERIAN MADU SUMBAWA (*Apis dorsatta*) TERHADAP AKTIVITAS PROTEASE DAN KADAR MDA (*Malondialdehyde*) PADA HEPAR TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI DIAZINON

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

ILHAM MAULANA HABIBILLAH
145130101111050



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN MADU SUMBAWA (*Apis dorsatta*)
TERHADAP AKTIVITAS PROTEASE DAN KADAR MDA
(*Malondialdehyde*) PADA HEPAR TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI
DIAZINON**

**Oleh:
ILHAM MAULANA HABIBILLAH
145130101111050**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS.
NIP. 19630404 198701 1 001

Drh. Nurina titisari, M.Sc.
NIP. 19860122 201504 2 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

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



LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Ilham Maulana Habibillah
NIM : 145130101111050
Program Studi : Kedokteran Hewan
Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa (*Apis dorsatta*) Terhadap Aktivitas Protease Dan Kadar MDA (*Malondialdehyde*) Pada Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Diazinon.

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 termaksud 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, 10 Januari 2018
Yang menyatakan

Ilham Maulana Habibillah
NIM. 145130101111050

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya penulis dapat menyelesaikan kegiatan serta menyusun skripsi dengan judul **“PENGARUH PEMBERIAN MADU SUMBAWA TERHADAP AKTIVITAS PROTEASE DAN KADAR MDA (*Malondialdehyde*) PADA HEPAR TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI DIAZINON”** dengan lancar.

Skripsi ini disusun berdasarkan literatur yang penulis peroleh dari berbagai referensi. Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada :

1. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS., selaku dosen pembimbing I yang telah bersedia membimbing penulis dalam menyusun skripsi ini.
2. Drh. Nurina Titisari, M.Sc., selaku dosen pembimbing II yang telah bersedia membimbing penulis dalam menyusun skripsi ini.
3. drh. Ajeng Aeka, M.Sc., selaku dosen penguji I yang telah menyisihkan waktu untuk menguji dalam seminar proposal dan hasil skripsi ini.
4. drh. Albiruni Haryo., M.Sc., selaku dosen penguji II yang telah menyisihkan waktu untuk menguji dalam seminar proposal dan hasil skripsi ini
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
6. Keluarga tercinta yang selalu memberi kasih sayang, dukungan dan doa untuk menyelesaikan studi penulis serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.
7. Seluruh dosen dan civitas akademika yang telah membimbing, memberikan ilmu dan mewadahi penulis selama menjalankan studi di Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
8. Kepada sahabat lebah madu Sumbawa yaitu Firdausi, Ilham, Arif dan Aisyah yang selalu memberikan semangat dan dukungan yang selalu diberikan kepada penulis selama penyelesaian skripsi ini.
9. Kepada Syarifah Alawiyah Zasridar yang selalu menjadi penyemangat dalam pengerjaan skripsi.

10. Seluruh kolegium Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya, khususnya teman-teman kelas 2014 C terimakasih atas dukungan, semangat, inspirasi dan keceriaan yang diberikan.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Penulis berharap bahwa skripsi ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Malang, 10 Januari 2018

Penulis



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diazinon merupakan salah satu dari banyak pestisida yang bersifat toksik atau racun. Pada umumnya akan segera diabsorpsi melewati kulit, paru-paru dan saluran cerna. Diazinon merupakan jenis insektisida organofosfat yaitu cairan coklat muda yang berbau menyengat serta dapat larut dalam air. Apabila diazinon sudah masuk ke dalam tubuh dan terjadi kontak maka zat racun ini bekerja cepat dan mudah terabsorpsi dalam tubuh (Isvasta, 1993). Ciri yang mudah dilihat dari orang terkena racun biasanya timbul rasa mual, muntah, nyeri lambung, kejang dan peradangan mulut (Munaf, 1997).

Diazinon 60 EC merupakan salah satu insektisida yang dipakai dalam suatu usaha pertanian untuk memberantas hama pengganggu. Para petani umumnya menggunakan diazinon untuk penyemprotan tanaman kedelai, sayuran seperti kubis, nanas, sawi putih dan sawi hijau. Pemakaian diazinon dilakukan dengan cara penyemprotan. Sisa dari penyemprotan akan menempel pada daun tanaman, biji-bijian dan sebagian ke perairan. Petani sering tidak memperhatikan akibat dari penyemprotan diazinon, saat penyemprotan tanaman dengan arah angin, sehingga diazinon dapat mengenai petani melalui kulit dan pernapasan. Sedangkan, tempat absorpsi racun berlangsung lewat kulit, paru-paru dan saluran pencernaan. Ketiga tempat absorpsi ini saluran cerna merupakan tempat yang paling penting berkaitan dengan kasus keracunan makanan. Hal ini sebagai akibat dari absorpsi racun, karena

sebagian besar peristiwa keracunan diawali dengan tertelannya makanan. Berbagai jenis racun, walaupun hanya sedikit dapat diabsorpsi di saluran cerna (Donatus, 2001). Absorpsi racun pangan di saluran cerna dapat terjadi di lambung dan usus halus (Nahdhinah, 1998).

Menurut Yuningsih (2010), organofosfat telah dilaporkan menyebabkan kematian akut pada beberapa jenis ternak. Diazinon masih banyak digunakan oleh masyarakat dan terdeteksi adanya residu pada pakan ternak. Menurut Yuningsih dan Sri Yuliasuti (1998), telah dilaporkan bahwa organofosfat diazinon telah menyebabkan kematian pada ayam di Sukabumi, Bogor dan Garut pada tahun 1998.

Penelitian yang dilakukan oleh Ngabekti (1998), menunjukkan bahwa masih ditemukannya residu diazinon pada sayuran kubis, selada dan tomat di pasar di Kota Semarang sebesar $6,9 \times 10^{-3}$ – $5,91 \times 10^{-2}$ ppm. Jumlah residu ini masih di bawah batas maksimal residu (BMR) sebesar $7,5 \times 10^{-2}$ ppm (Ngabekti dan Isnaeni, 2000). Namun, paparan residu pestisida dalam produk pertanian tetap harus diwaspadai karena efek negatif yang ditimbulkannya.

Hepar merupakan organ parenkim dalam tubuh manusia yang paling besar dan sangat penting untuk mempertahankan fungsi hidup dan berperan dalam hampir setiap metabolisme tubuh. Diazinon menyebabkan kerusakan sel hepar yang terjadi pada asam lemak tak jenuh fosfolipid membrane sel, sehingga terbentuk peroksida lipid. Pada akhir rangkaian degradasi peroksida lipid akan menghasilkan etana, pentana dan malondialdehid (MDA).

Malondialdehid ini dapat dijadikan indikator peningkatan peroksida lipid yang terbentuk akibat radikal bebas (Cochrane, 1991). Selain itu, Protease juga dapat menjadi indikator peningkatan peroksidasi lipid karena kerusakan sel yang terjadi pada keadaan inflamasi juga diakibatkan oleh pelepasan enzim protease oleh neutrofil yang berfungsi melisiskan sel yang nekrosis (Stephenson, 1992).

Madu merupakan produk asli yang di hasilkan oleh lebah. Pulau Sumbawa dikenal sebagai daerah penghasil madu paling banyak di Indonesia dan banyak terdapat pohon bidara yang kaya akan antioksidan. Madu sering digunakan sebagai sarana pengobatan penyakit degenerative seperti anti inflamasi, antioksidan dan meningkatkan system imun (Ewetu *et al*, 2013). Madu Sumbawa termasuk kedalam golongan madu poliflora yang merupakan golongan madu yang dihasilkan dari berbagai jenis tanaman dari nectar bunga, yang berasal dari anekaragam bunga. Madu poliflora mengandung enzim asam amino bebas yang jumlahnya lebih banyak dibanding dengan madu monoflora (Rosita, 2007).

Madu Sumbawa dihasilkan oleh lebah *Apis dorsatta* (Hadisoesilo, 2001). Sifat antioksidan dalam madu ini disebabkan oleh berbagai macam komponen yang ada di dalam madu, diantaranya adalah komponen flavonoid, fenolat, vitamin C, asam amino, enzim, katalase dan lain-lain (Ensmingerdkk, 1995). Dengan banyaknya komponen dalam madu yang memberikan sifat antioksidan tersebut, flavonoid adalah salah satu yang paling banyak diteliti.

Flavonoid dalam madu sendiri banyak sekali unsurnya dan sangat dipengaruhi oleh geografis, sumber nektar bunga, iklim, proses pengolahan dan lain-lain (Estevinho, dkk. 2008).

Flavonoid sebagai salah satu kelompok senyawa fenolik yang berperan sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidatif flavonoid bersumber pada kemampuan mendonasikan atom hidrogennya sehingga radikal bebas dapat dengan mudah untuk dinetralkan. Berdasarkan hal tersebut pada proposal skripsi ini akan dibahas mengenai pengaruh madu Sumbawa terhadap hepar yang terpapar oleh diazinon.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Apakah pengaruh madu Sumbawa terhadap aktivitas protease hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon?
2. Apakah pengaruh madu Sumbawa terhadap kadar MDA hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan berat badan 130-180 gram. Tikus didapat dari Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan Universitas Bawijaya Malang.

2. Diazinon diinduksikan secara *per-oral* dengan dosis 60 mg/Kg BB tikus per hari selama 7 hari pada hari ke-8.
3. Madu Sumbawa yang digunakan diambil dari hutan Sumbawa, kemudian dideterminasikan di Balai Materia Medica Batu Malang.
4. Madu Sumbawa yang diberikan yaitu konsentrasi 25% dalam 1 mL secara per oral berdasarkan kelompok perlakuan III, 50% dalam 1 mL pada kelompok perlakuan IV dan 75% dalam 1 mL pada kelompok perlakuan V pada hari ke-8 selama 10 hari.
5. Variabel yang diamati adalah aktivitas Protease dengan metode hitung Walter dan kadar *Malondialdehyde* (MDA) dengan uji TBA pada organ hepar.

1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui pengaruh madu Sumbawa terhadap aktivitas protease hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon.
2. Untuk mengetahui pengaruh madu Sumbawa terhadap kadar *Malondialdehyde* (MDA) hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi diazinon.

1.5 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah:

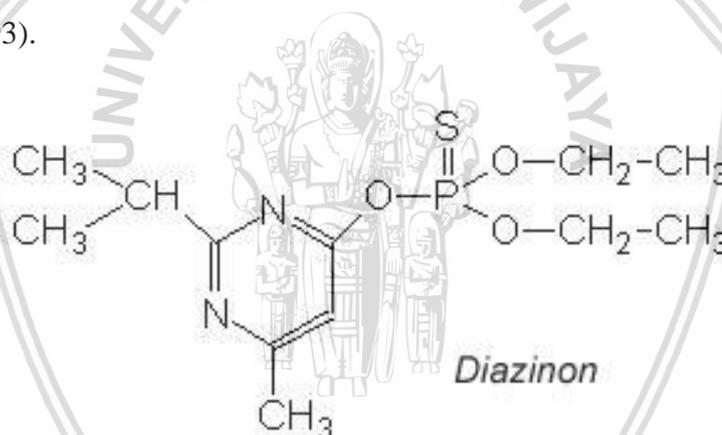
1. Memberikan sarana informasi tambahan tentang manfaat madu Sumbawa bagi masyarakat.
2. Memberikan informasi tentang pengaruh madu Sumbawa sebagai alternatif pengobatan keracunan akibat diazinon.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diazinon

Diazinon merupakan insektisida organofosfat yang banyak digunakan dalam bidang pertanian untuk membasmi hama pengganggu (Himawan, 2012). Diazinon mempunyai nama IUPAC O,O-diethyl-O-(2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinyl) phosphorothioate dengan rumus molekul $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$ (**Gambar 2.1**). Diazinon merupakan salah satu organofosfat insektisida yang bersifat toksik. Diazinon dapat masuk ke dalam tubuh melalui kulit, paru-paru dan saluran cerna (Isvasta, 1993).



Gambar 2.1 Struktur diazinon (Bennet, 2001)

Diazinon dalam bidang pertanian digunakan untuk membasmi serangga. Mekanisme kerja diazinon yaitu dengan cara menghambat enzim kolinesterase secara irreversibel. Enzim kolinesterase ini berfungsi untuk memecah asetilkolin yang merangsang saraf otot (Usman, 2013).

Diazinon memberikan efek terhadap hewan dapat berupa keracunan akut akibat terhambatnya enzim asetilkolinesterase yang berfungsi memecah neurotransmitter asetilkolin (ACh) (Yuningsih,2010). Asetilkolin yang tidak

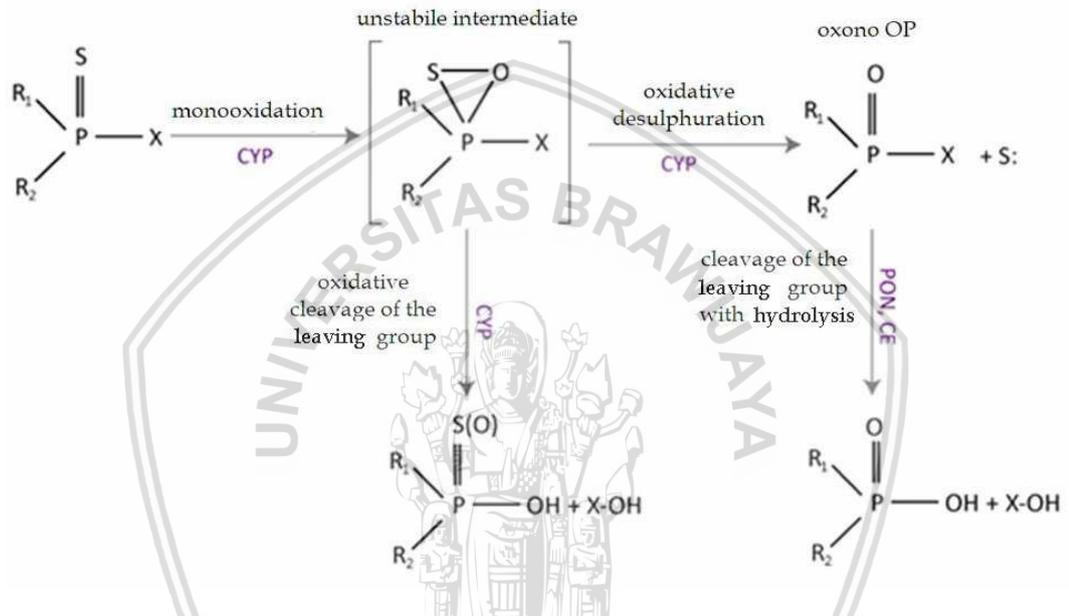
terhidrolisis dapat menyebabkan hantaran impuls yang tertunda sehingga akan mengakibatkan salivasi berlebih, diare, kejang, kelumpuhan dan berakhir kematian (Wulandari, 2006).

2.2 Mekanisme Kerja Diazinon

Diazinon termasuk dalam senyawa xenobiotik karena berupa agen yang tidak diperlukan oleh tubuh (Wulandari, 2006). Metabolisme organofosfat sebagai xenobiotik terdiri dari 2 fase, yaitu fase I dimana enzim metabolik mengaktivasi komponen kimia dengan mengenali gugus fungsi organofosfat dan fase II merupakan proses perubahan struktur organofosfat menjadi molekul hidrofilik seperti asam glukoronat, sulfat, glisin dan asam glutamat dengan bantuan enzim agar mudah diekskresi (Wulandari, 2006).

Metabolisme organofosfat fase I (**Gambar 2.2**) terdiri dari reaksi oksidasi yang merupakan suatu reaksi aktivasi thionoorganofosfat menjadi oxonoorganofosfat dan atom sulfur dengan bantuan enzim *Cytochrome P450* (CYP) sehingga oxonoorganofosfat menjadi molekul aktif yang mampu menghambat fungsi dari AChE. Reaksi hidrolisis termasuk dalam metabolisme fase I, dimana hidrolisis terjadi setelah reaksi oksidasi berlangsung dengan bantuan enzim *paraoxonase* (PON) reaksi ini penting untuk proses detoksifikasi. Detoksifikasi organofosfat terjadi ketika *paraoxonase* memecah organofosfat menjadi dialkylfosfat dan leaving group. Organofosfat juga dihidrolisis oleh *carboxylesterase* (CE) yang mampu melakukan inaktivasi diri pada proses

hidrolisis. Fase II metabolisme diazinon merupakan proses perubahan struktur diazinon menjadi molekul hidrofilik seperti asam glukoronat, sulfat, glisin dan asam glutamat dengan bantuan enzim agar mudah diekskresi (Elersek and Metka, 2011).



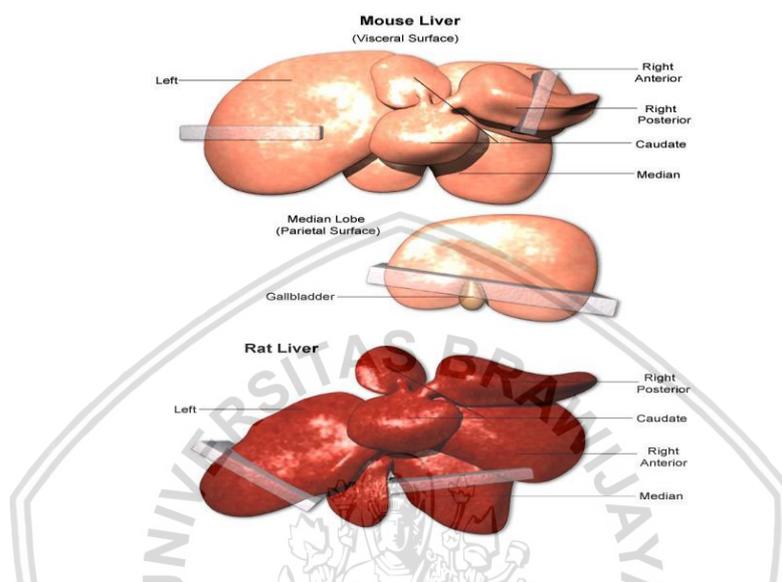
Gambar 2.2 Metabolisme diazinon (Hreljac, 2009)

2.3 Anatomi Hepar

Hepar merupakan organ yang mempunyai berbagai macam aktivitas metabolisme (Salasia dan Hariono, 2010). Hepar dibungkus oleh jaringan ikat tipis (kapsula Glisson) yang menebal dihilum, tempat vena porta dan arteri hepatica memasuki hepar dan duktus hepatikus kiri dan kanan serta tempat keluarnya pembuluh limfe. Hepar terletak dipermukaan caudal dari diafragma dan membentang disisi *medial* dan sisi *dexter* lengkungan *costae sinister*. Bagian



cranial hepar berbentuk cembung yang bersentuhan dengan otot diafragma dan bagian *visceral* berbentuk cekung (Bredo, 2011).



Gambar 2.2 Hepar Tikus (Bredo, 2011).

Hepar tikus terbagi menjadi empat lobus yaitu lobus *sinister*, lobus *medial*, lobus *dexter* dan lobus *caudatus* (**Gambar 2.3**) (Boorman, 2006). Beberapa ligamentum yang merupakan *peritoneum* membantu menyokong hepar. Dalam hepar terdapat tiga jenis jaringan yang penting yaitu sel parenkim hepar, susunan pembuluh darah dan susunan saluran empedu (Darmawan, 2003). Secara mikroskopis, setiap lobus hepar terbagi menjadi struktur-struktur yang disebut sebagai lobulus, yang merupakan unit mikroskopis dan fungsional organ. Setiap lobulus merupakan badan heksagonal yang terdiri atas lempeng-lempeng sel hepar berbentuk kubus, tersusun radial mengelilingi vena *sentralis* yang mengalirkan darah dari lobulus. Hepar memiliki kapiler-kapiler yang disebut sebagai sinusoid. Sinusoid dibatasi oleh sel fagositik atau sel kupffer yang fungsi utamanya adalah menelan bakteri dan benda asing dalam darah. Selain cabang-cabang vena porta

dan arteri hepatica juga terdapat saluran empedu. Saluran empedu interlobular membentuk kapiler empedu yang sangat kecil yang disebut sebagai kanalikuli yang bersatu membentuk saluran empedu yang makin lama makin besar hingga menjadi duktus koledokus (Price *and* Lorraine, 2006).

2.4 Fisiologi Hepar

Hepar adalah organ dalam yang paling besar dan mempunyai peranan utama dalam metabolisme tubuh. Hepar memproduksi empedu yang membantu pencernaan lemak dan hepar sendiri memproses asam amino, glukosa, asam lemak serta gliserol. Hepar juga mempunyai fungsi yang lebih jauh, yaitu menetralkan racun. Hepar melaksanakan fungsi pencernaannya terhadap sebagian besar bahan kimia beracun melalui aktivitas enzim dengan dua cara yaitu degradasi dan konjugasi. Tujuan utama hepar adalah menghasilkan produk sampingan yang larut dalam air yang dapat dipakai sebagai bahan makanan atau bila berupa bahan asing (bukan bahan makanan) membuat bahan tersebut dapat dikeluarkan melalui urin (Jeharatman dan Koh, 2005).

Hepar adalah organ tempat nutrien diserap dari saluran cerna, diolah dan disimpan untuk dipakai oleh bagian tubuh yang lain. Hepar menjadi perantara antara sistem pencernaan dan darah. Hepar memiliki berbagai fungsi dibandingkan organ lain dalam tubuh. Fungsi utama hepar yaitu metabolisme karbohidrat, metabolisme lipid, metabolisme protein, penyimpanan glikogen,

vitamin A, D, B12, zat besi, darah, detoksifikasi dan sekresi empedu (Junqueira, 2000).

2.5 Akibat Toksisitas Diazinon

Hepar yang terpapar diazinon mengalami perubahan struktur mikroanatominya. Perubahan itu meliputi dilatasi sinusoid, konstiksi vena sentralis, degenerasi hidropik, degenerasi lemak, inti piknotik, karyoreksis dan karyolisis (Wulandari dkk, 2006). Dilatasi sinusoid menurut Ressang (1984), dapat terjadi karena adanya desakan pada dindingnya akibat terjadinya pembendungan pada vena oleh zat toksik.

Degenerasi hidropik terjadi karena hidrasi ion natrium akibat permeabilitas dinding sel yang terganggu akibat mekanisme toksisitas senyawa xenobiotik. Selain itu, terjadi gangguan pada metabolisme energi di dalam sel, terutama mekanisme transpor aktif pada $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$. Akibatnya hepatosit tidak mampu memompa ion natrium ke luar dari sel. Jumlah ion natrium dalam sel yang berlebihan menyebabkan influks air yang hebat sehingga sebagian organel sitoplasma seperti RE dapat diubah menjadi kantong-kantong berisi air (Price dan Wilson, 1984).

Degenerasi lemak yang parah akan terbentuk vakuola lemak dalam sel sehingga mendesak inti sel ke arah tepi. Degenerasi lemak dapat terjadi karena terganggunya metabolisme lemak, seperti adanya gangguan terhadap fungsi mitokondria, hipoksia yang menghambat oksidasi asam lemak yang masuk ke

dalam sel atau dapat pula disebabkan malnutrisi protein sehingga mengganggu sintesis lipid acceptor protein yang membawa lipid keluar dari sel. Jika degenerasi lemak terus berlangsung, maka hepatosit dapat mengalami nekrosis (Sudiono dkk., 2003).

Menurut Zimmerman dalam Cassaret dan Doull (1975) zat toksik seperti karbon tetraklorida dan fosfat dapat menyebabkan gangguan pada fungsi beberapa organel sel seperti pada mitokondria, retikulum endoplasma dan lisosom. Fungsi mitokondria dalam mekanisme selular tubuh salah satunya adalah dalam metabolisme lemak. Gangguan pada fungsi mitokondria akan menyebabkan sintesis dan sekresi lemak tidak seimbang akibatnya lemak akan terakumulasi dalam sel parenkim hepar. Diazinon yang termasuk golongan pestisida organofosfat diduga dapat menyebabkan degenerasi lemak dengan cara mengganggu fungsi mitokondria.

2.6 Hubungan Malondialdehyde (MDA) Dengan Residu Diazinon

Kerusakan sel hepar terjadi pada asam lemak tak jenuh fosfolipid membran sel akibat paparan diazinon, sehingga terbentuk peroksida lipid. Pada akhir rangkaian degradasi peroksida lipid akan menghasilkan etana, pentana dan malondialdehid (MDA). Malondialdehid ini dapat dijadikan indikator peningkatan peroksida lipid yang terbentuk akibat radikal bebas (Cochrane, 1991). Stres oksidatif merupakan keadaan ketidakseimbangan antara *reactive oxygen species* (ROS) dengan antioksidan (Wati, 2013). Peroksidasi lipid terjadi saat stres

oksidatif berlangsung. Peroksidasi lipid merupakan bentuk dari *polyunsaturated* asam lemak yang bersifat tidak stabil, sehingga dapat dengan mudah diurai menjadi kompleks senyawa salah satunya *Malondialdehyde* (MDA). MDA bersifat mutagenik, tumorigenik dan bereaksi tinggi saat terjadinya produksi *polyunsaturated* asam lemak dan metabolisme asam arakidonat (Singh, 2014).

2.7 Hubungan Aktivitas Protease dengan Residu Diazinon.

Pemberian diazinon pada tikus akan menimbulkan ROS berlebih pada hepar. ROS berlebih akan memicu stress oksidatif yang dapat mengaktifkan sel-sel sitokin proinflamator seperti TNF- α , IL 4 dan IL 13. TNF- α akan menyebabkan inflamasi dan akan meningkatkan aktivasi neutrofil, sedangkan IL 4 dan IL 13 akan mengaktifkan sel B yang memproduksi IgE untuk mengaktifkan sel mast. Sel mast dan neutrofil yang teraktifasi akan menghasilkan protease sebagai respon adanya inflamasi. Oleh sebab itu, kadar protease dapat digunakan sebagai indikator tingkat keparahan inflamasi, bila semakin tinggi kadar proteasenya maka akan semakin tinggi kadar inflamasinya (Campbell *et al*, 2006).

2.8 Madu Sumbawa

Madu merupakan cairan kental yang dihasilkan oleh lebah. Madu diperoleh dari nektar bunga ataupun dari bagian tanaman hidup lainnya yang

kemudian diolah dengan cara diikat dengan senyawa-senyawa tertentu dan disimpan di sarang lebah (Azrizal, 2017).

Madu Sumbawa dikenal sebagai madu terbaik di Indonesia karena madu diperoleh dari hutan Sumbawa. Madu Sumbawa dihasilkan oleh lebah-lebah hidup di hutan Sumbawa, sehingga memperoleh makanan secara alami dari hutan. Sumbawa juga memiliki letak geografis yang kering dan rendah, sehingga kadar air dalam madu Sumbawa rendah (Zulhawa, 2010). Sumbawa terkenal dengan pohon bidara atau *Ziziphus mauritiana*. Bidara merupakan tumbuhan yang dilaporkan memiliki kandungan flavonoid tinggi sehingga memiliki aktivitas antikanker, antiinflamasi, antifungi dan antioksidan (Haeria, 2016).

Madu Sumbawa termasuk ke dalam golongan madu poliflora yang merupakan golongan madu yang dihasilkan dari berbagai jenis tanaman dari nektar bunga, yang berasal dari aneka ragam bunga. Madu poliflora mengandung enzim asam amino bebas yang jumlahnya lebih banyak dibanding dengan madu monoflora (Rosita, 2007).

Madu mengandung komponen antioksidan diantaranya vitamin C, polifenol, mangan, flavonoid dan beberapa antioksidan lain. Antioksidan akan menurunkan dampak negatif dari oksidan dengan cara memberikan elektronnya sehingga akan mengubah oksidan menjadi molekul yang tidak berbahaya. Antioksidan juga mampu mencegah pembentukan radikal bebas dan memperbaiki kerusakan akibat adanya radikal bebas (As'ari, 2009).

a. Vitamin C

Antioksidan merupakan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein dan lemak. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai peroksidasi lipid dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif. Antioksidan yang dikenal ada 2, yaitu berupa enzim atau golongan antioksidan endogen dan ada yang berupa mikronutrien. Enzim antioksidan dibentuk dalam tubuh, yaitu super oksida dismutase (SOD), glutathion peroksida, katalase dan glutathion reduktase. Sedangkan antioksidan yang berupa mikronutrien dikenal tiga yang utama, yaitu : b-karoten, vitamin C dan vitamin E (Iswara, 2009).

Selain itu vitamin C juga dapat menyumbangkan elektron ke dalam reaksi biokimia intraseluler dan ekstraseluler. Vitamin C adalah 6 atom karbon lakton yang disintesis dari glukosa yang terdapat dalam hepar. Bentuk utama dari vitamin C yang dinamakan adalah *L-ascorbic* dan *dehydroascorbic acid*. Vitamin C mampu menghilangkan senyawa oksigen reaktif di dalam sel hepatosit bahkan neutrofil, monosit, protein serta dapat bereaksi dengan besi-ferritin. Diluar sel, Vitamin C mampu menghilangkan senyawa oksigen reaktif, mencegah *Low Density Lipoprotein* (LDL) teroksidasi, mentransfer elektron ke dalam tokoferol teroksidasi dan mengabsorpsi logam dalam saluran cerna (Adi *et al.* 2009).

Sebagai antioksidan, vitamin C dapat langsung bereaksi dengan anion superoksida, radikal hidroksil, oksigen singlet dan lipid peroksida. Sebagai reduktor menurut Berger (2009) vitamin C akan mendonorkan satu elektron membentuk semidehidroaskorbat yang tidak bersifat reaktif dan selanjutnya mengalami reaksi disproporsionasi membentuk dehidroaskorbat yang bersifat tidak stabil. Dehidroaskorbat akan terdegradasi membentuk asam oksalat dan asam treonat.

b. Polifenol

Senyawa fenol merupakan suatu senyawa yang mengandung gugus hidroksil (-OH) yang terikat langsung pada gugus cincin hidrokarbon aromatik. Klasifikasi senyawa fenol yang terkandung dalam madu yaitu fenol sederhana, benzoquinone, asam fenolat, asetofenon, naftokuinon, xanton, bioflavonoid kumarin, stilben, turunan tirosin, asam hidroksi sinamat, flavonoid, lignan dan tanin (Dhianawaty, 2013).

Senyawa fenol alami yang bersifat antioksidan dapat diklasifikasikan dalam 2 kelompok, yaitu kelompok lipofilik dan hidrofilik (di antaranya senyawa fenol). Aktivitas antioksidan dari senyawa fenol terbentuk karena kemampuan senyawa fenol membentuk ion fenoksida yang dapat memberikan satu elektronnya kepada radikal bebas. Gambaran pada umumnya yaitu, antioksidan senyawa fenol (PhH) dapat bereaksi dengan radikal bebas (ROO•) membentuk ROOH dan sebuah senyawa fenol radikal (Ph•) yang relatif tidak reaktif. Selanjutnya, senyawa fenol radikal (Ph•) dapat bereaksi kembali dengan radikal

bebas ($\text{ROO}\bullet$) membentuk senyawa yang bersifat tidak radikal (Dhianawaty, 2013).

c. **Flavanoid**

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar ditemukan di alam. Senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, dan biru dan sebagian zat warna kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan. Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, dimana dua cincin benzene (C_6) terikat pada suatu rantai propan (C_3) sehingga membentuk suatu susunan $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$. Susunan ini dapat menghasilkan tiga jenis struktur, yakni 1,3-diarilpropan atau neoflavonoid. Senyawa-senyawa flavonoid terdiri dari beberapa jenis tergantung pada tingkat oksidasi dari rantai propane dari sistem 1,3-diarilpropana. Flavon, flavonol dan antosianidin adalah jenis yang banyak ditemukan di alam sehingga sering disebut sebagai flavonoida utama. Banyaknya senyawa flavonoida ini disebabkan oleh berbagai tingkat hidroksilasi, alkoksilasi atau glikosilasi dari struktur tersebut. Penggolongan flavonoid berdasarkan penambahan rantai oksigen dan perbedaan distribusi dari gugus hidroksil (Sjahid, 2008).

Telah banyak penelitian yang menyatakan bahwa senyawa flavonoid memiliki potensi sebagai antioksidan karena memiliki gugus hidroksil yang terikat pada karbon cincin aromatik sehingga dapat menangkap radikal bebas yang dihasilkan dari reaksi peroksidasi lemak. Senyawa flavonoid akan

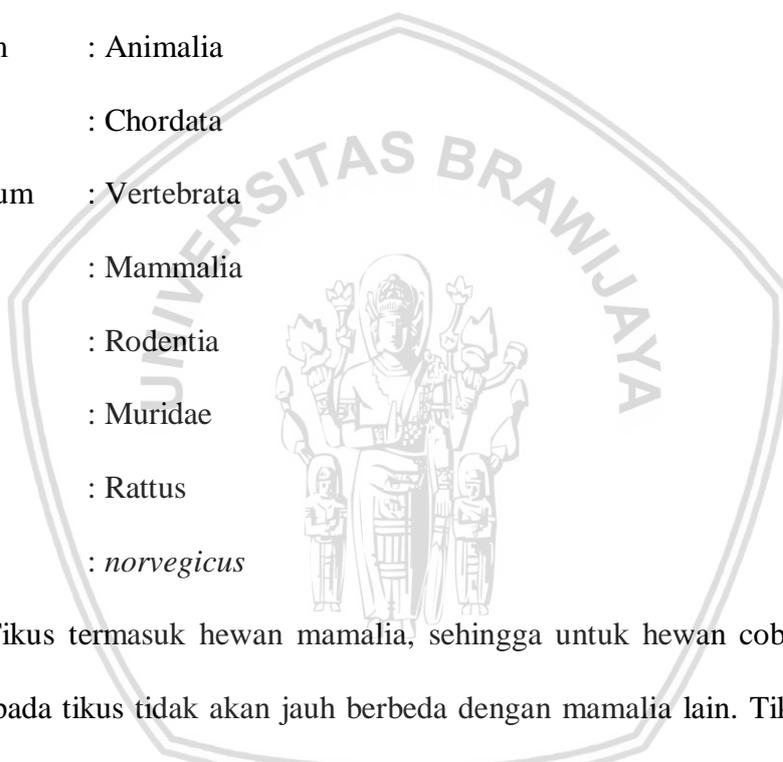
menyumbangkan satu atom hidrogen untuk menstabilkan radikal peroksi lemak (Hamid, 2010).

2.9 Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Menurut Maula (2014), klarifikasi dari tikus putih yaitu sebagai berikut:

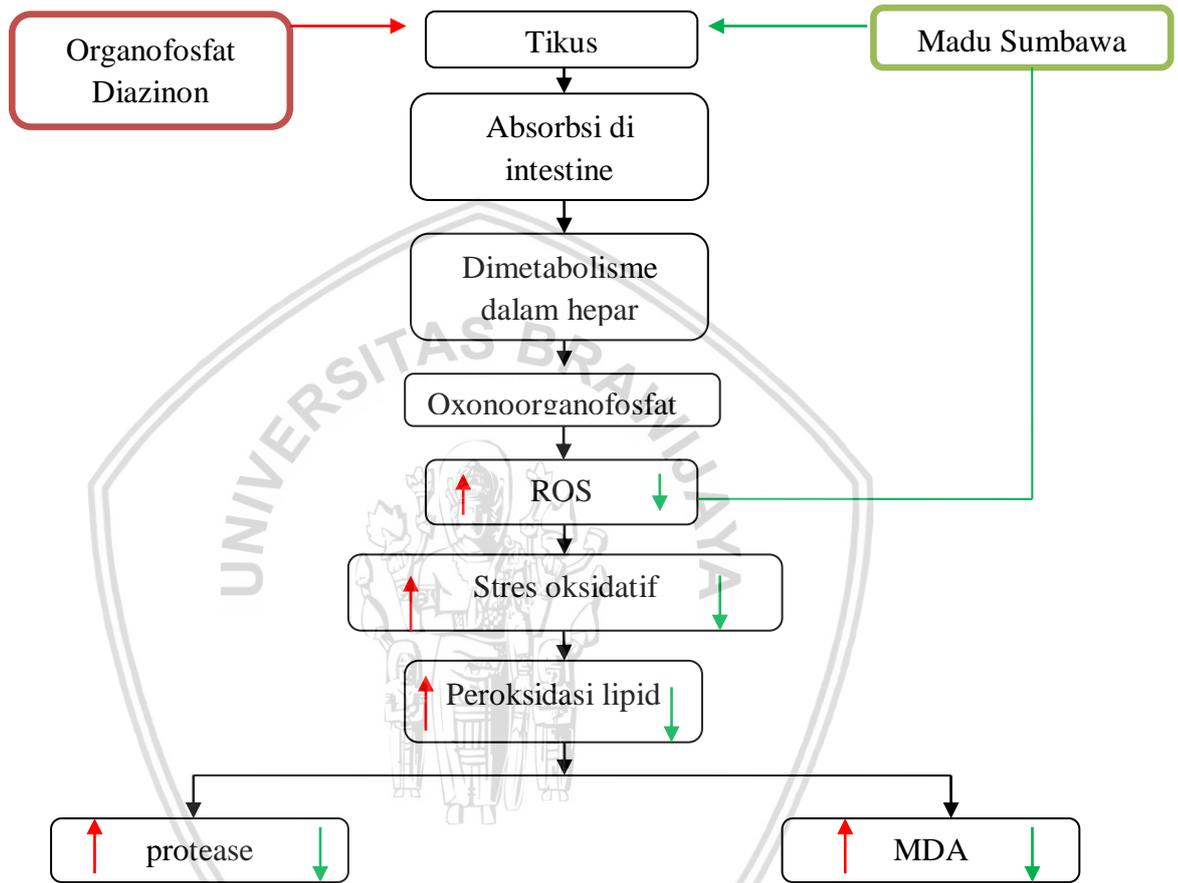
Kingdom : Animalia
Phylum : Chordata
Subphylum : Vertebrata
Class : Mammalia
Ordo : Rodentia
Family : Muridae
Genus : *Rattus*
Species : *norvegicus*

Tikus termasuk hewan mamalia, sehingga untuk hewan coba hasil yang didapat pada tikus tidak akan jauh berbeda dengan mamalia lain. Tikus memiliki lama hidup 2-3 tahun. Berat tikus dewasa 300-400 g untuk jantan dan 250-300 g untuk tikus betina dewasa. Tikus putih memiliki kelebihan dibanding tikus liar yaitu mudah dalam perawatannya, cepat dewasa dan lebih cepat untuk berkembang biak (Maula, 2014).



BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 KERANGKA KONSEPTUAL



Keterangan :

- (red) : diinduksikan
- ← (green) : terapi
- ↑ (red) : meningkat
- ↓ (green) : menurun
- ↓ (black) : mempengaruhi



Pemberian diazinon yang diinduksikan secara per oral akan diserap oleh intestine dan dimetabolisme dalam hepar. Metabolisme diazinon dalam dosis rendah dapat dimetabolisme di dalam intestine dan pulmo. Pemberian diazinon dengan dosis tinggi menyebabkan metabolisme dalam intestine menjadi jenuh, sehingga memungkinkan toksik untuk lolos ke dalam pembuluh vena porta. Diazinon bersifat lipofilik dan dapat berikatan dengan protein plasma sehingga dapat terdistribusikan ke hepar. Diazinon termasuk dalam senyawa xenobiotik karena berupa agen yang tidak diperlukan oleh tubuh. Metabolisme OP sebagai xenobiotik terdiri dari 2 fase, yaitu fase I dimana enzim metabolik mengaktivasi komponen kimia dengan mengenai gugus fungsi OP dan fase II merupakan proses perubahan struktur OP menjadi molekul hidrofilik seperti asam glukoronat, sulfat, glisin, dan asam glutamat dengan bantuan enzim agar mudah diekskresi.

Metabolisme organofosfat fase I terdiri dari reaksi oksidasi yang merupakan suatu reaksi aktivasi thionoorganofosfat menjadi oxonoorganofosfat dan atom sulfur dengan bantuan enzim *Cytochrome P450* (CYP). sehingga oxonoorganofosfat menjadi molekul aktif yang mampu menghambat fungsi dari AChE. Reaksi hidrolisis termasuk dalam metabolisme fase I, dimana hidrolisis terjadi setelah reaksi oksidasi berlangsung dengan bantuan enzim *paraoxonase* (PON) reaksi ini penting untuk proses detoksifikasi. Oxonoorganofosfat yang bersifat aktif akan menyebar ke seluruh tubuh melalui pembuluh darah. Pemaparan organofosfat dapat meningkatkan ACh sehingga keseimbangan ion dalam sel akan terganggu dan akan mempengaruhi produksi ROS. Paparan organofosfat dapat meningkatkan kadar antioksidan endogenus akibat adanya produksi ROS yang

meningkat signifikan sebagai upaya respon oleh tubuh dan antioksidan endogenus akan mengalami penurunan setelah beberapa hari. ROS akan terbentuk secara tidak terkendali akibat penurunan dari antioksidan endogenus dan akhirnya terciptalah keadaan stress oksidatif. Stress oksidatif merupakan keadaan ketidakseimbangan antara ROS dan antioksidan baik enzimatis ataupun non enzimatis.

Proses peroksidasi lipid akan berlangsung bersama dengan peningkatan kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS akan membentuk molekul stabil dengan mengambil elektron dari lipid yaitu atom hidrogen PUFA pada membran sel dan akan menghasilkan molekul *malondialdehyde* (MDA). Sehingga peningkatan ROS dapat meningkatkan kadar MDA.

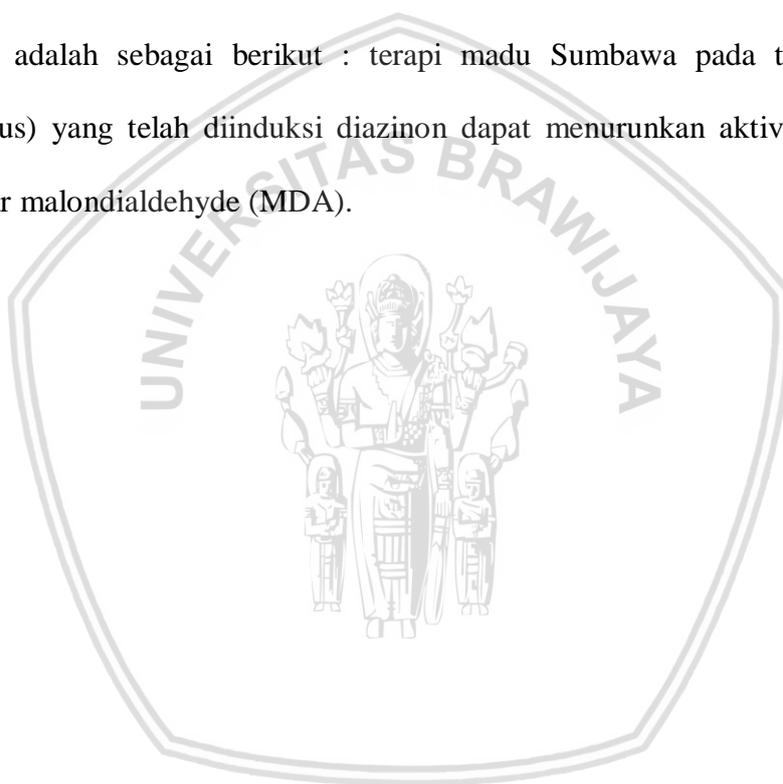
Pemberian diazinon pada tikus akan menyebabkan semua perubahan yang mengarah pada stres oksidatif dan toksisitas. ROS berlebih akan memicu stress oksidatif yang dapat mengaktifkan sel-sel sitokin proinflamator seperti TNF- α , IL 4 dan IL13. TNF- α akan menyebabkan inflamasi dan akan meningkatkan aktivasi neutrofil, sedangkan IL 4 dan IL 13 akan mengaktifkan sel B yang memproduksi IgE untuk mengaktifkan sel mast. Sel mast dan neutrofil yang teraktifasi akan menghasilkan protease sebagai respon adanya inflamasi. Oleh sebab itu, kadar protease dapat digunakan sebagai indikator tingkat keparahan inflamasi, bila semakin tinggi kadar proteasenya maka akan semakin tinggi kadar inflamasinya.

Madu Sumbawa mengandung antioksidan seperti vitamin C, polifenol, flavonoid dan beberapa antioksidan lain. Antioksidan akan menurunkan dampak negatif dari oksidan dengan cara memberikan elektronnya sehingga akan

mengubah oksidan menjadi molekul yang tidak berbahaya. Antioksidan juga mampu mencegah pembentukan radikal bebas dan memperbaiki kerusakan akibat adanya radikal bebas.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut : terapi madu Sumbawa pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang telah diinduksi diazinon dapat menurunkan aktivitas protease dan kadar malondialdehyde (MDA).



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan April 2018 yang bertempat di Laboratorium Epidemiologi, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang. Pembacaan kadar MDA (*Malondyaldehyde*) di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Pembacaan aktivitas protease di Laboratorium Biokimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaaya.

4.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan coba dengan berat badan 130-180 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari, ditempatkan di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya Malang. Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok dan besar sampel ditentukan dengan rumus Federer (Kusrianingrum, 2010) :

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

berdasarkan perhitungan tersebut, maka perlakuan dibagi menjadi 5 kelompok dan tiap kelompok diperlukan jumlah minimal 4 ekor sehingga total

tikus yang diperlukan adalah 20 ekor. Semua kelompok tikus diberi minum dan pakan secara *ed libitum*. Kelompok K- merupakan kelompok kontrol sehat yang tidak diberi induksi diazinon ataupun madu Sumbawa. Kelompok K+ merupakan kelompok kontrol yang diinduksi Diazinon sebanyak 60 mg/kgBB diberikan secara per oral. Kelompok P1 merupakan kelompok yang diinduksi Diazinon sebanyak 60 mg/kgBB dan diterapi dengan madu Sumbawa sebanyak 1 ml dengan konsentrasi 25% yang keduanya diberikan secara per oral. Kelompok P2 merupakan kelompok yang diinduksi Diazinon sebanyak 60 mg/kgBB dan diterapi dengan madu sumbawa sebanyak 1 ml dengan konsentrasi 50% yang keduanya diberikan secara per oral. Kelompok P3 merupakan kelompok yang diinduksi Diazinon sebanyak 60 mg/kgBB dan diterapi dengan madu Sumbawa sebanyak 1 ml dengan konsentrasi 75% yang keduanya diberikan secara per oral. Berikut diperinci pada Tabel 4.1 Rancangan penelitian.

Tabel 4.1 Rancangan penelitian

Kelompok Perlakuan	Perlakuan
Tikus Normal	Tanpa di beri diazinon dan tanpa terapi
Tikus Positif	Diazinon 60 mg/kgBB
Tikus perlakuan (1)	Diazinon 60 mg/kgBB, 1 mL madu Sumbawa 25%
Tikus perlakuan (2)	Diazinon 60 mg/kgBB, 1 mL madu Sumbawa 50%
Tikus perlakuan (3)	Diazinon 60 mg/kg BB, 1 mL madu Sumbawa 75%

4.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam pemeliharaan hewan coba berupa kandang tikus, botol minum, tempat makan tikus, lampu, sonde, spuit, mortir. Pengujian *Malondialdehyde* (MDA) berupa pipet, stir bar, tabung, mikrosentrifugasi poliprolena, gunting, kertas saring, pinset, blender, mikroskop cahaya, semi-mikrokuvet, spektrofotometer, vortex, *magnetic stirrer*, *water bath*.

Pengujian aktivitas protease berupa seperangkat alat bedah, seperangkat alat gelas, mortar, mikro pipet, penangas air, *waterbath*, appendof, lemari pendingin, pH meter digital (Inolab-WTW), seperangkat alat sentrifugasi (tabung sentrifugasi, alat sentrifugasi) Denley tipe BR401), inkubator (memmert), vortex (Guo-Huq), Sonikator (Branson 200), spektrofotometri UV, mikroskop cahaya (nikon BX-53), autoclaf, spuit, *hot plate*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan berat 130-180 gram, organofosfat (diazinon), *aquades*, makanan pellet. Bahan yang digunakan untuk pengujian kadar *Malondialdehyde* (MDA) yaitu organ hepar, *2-thiobarbiturat acid*, asam asetat glacial, natrium hidroksida, malondialdehida bis, PBS. Bahan yang digunakan untuk pengujian aktivitas protease yaitu *Tri Chloro acetic Acid*, tirosin, kasein, HCl, KCl, KH₂PO₄, NaCl, Na₂HPO₄.H₂O, *Tween*, NaN₃ 1% . *Poly Methyl Sulfonyl Fluoride*, etanol absolut, Tris-HCl, KMnO₄.

4.4 Tahapan Penelitian

1. Persiapan hewan coba.
2. Pemberian diazinon pada tikus.
3. Terapi madu Sumbawa.
4. Pengambilan dan pembuatan preparat organ hepar.
5. Pengukuran kadar MDA.
6. Pengukuran aktivitas protease.
7. Analisis data.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dari penelitian ini meliputi:

Variabel bebas : Dosis induksi diazinon dan dosis induksi terapi madu Sumbawa.

Variabel tergantung : Kadar MDA dan aktivitas protease.

Variabel kontrol : Tikus strain wistar.

4.6 Prosedur Kerja

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) sehat dengan berat badan 130-180 gram yang sudah disertifikasi layak etik. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok dengan jumlah ulangan minimal 4

kali setiap kelompok perlakuan. Tikus diberikan pakan basal pada semua tikus selama 7 hari.

Kandang tikus dibuat menggunakan bak plastik dengan ukuran p.l.t=30x45x20 cm yang dilengkapi dengan botol minum tikus dan serbuk gergaji sebagai alas. Kandang ini akan diberi tutup kayu dan kawat strimin agar tikus tidak kabur.

4.6.2 Induksi Diazinon

Dosis diazinon 600 EC yang diberikan pada tikus sebanyak 60 mg/kgBB. Diazinon 1 mL diencerkan dalam akuades sebanyak 100 mL dengan konsentrasi 6 mg/mL. Diberikan secara per oral menggunakan sonde sebanyak 1,5 mL sekali setiap hari pada tikus K+, P1, P2 dan P3. Induksi diazinon dilakukan pada hari ke 8 sampai hari ke 14.

4.6.3 Terapi Madu Sumbawa

Terapi madu Sumbawa diberikan per oral pada hari ke 14 sampai hari ke 28 setiap hari sebanyak 1 kali. Madu Sumbawa diberikan sebanyak 0,25 ml diencerkan hingga mencapai volume 1 mL menggunakan akuades sebagai pengencer diinduksikan pada kelompok P1.

Kelompok P2 diberikan terapi madu Sumbawa diberikan per oral pada hari ke 14 sampai hari ke 28 setiap hari sebanyak 1 kali. Madu Sumbawa diberikan

sebanyak 0,5 ml diencerkan hingga mencapai volume 1 ml menggunakan akuades sebagai pengencer.

Terapi madu Sumbawa pada kelompok P3 diberikan per oral pada hari ke 14 sampai hari ke 28 setiap hari sebanyak 1 kali. Madu Sumbawa diberikan sebanyak 0,75 ml diencerkan hingga mencapai volume 1 ml menggunakan akuades sebagai pengencer.

4.6.4 Pengambilan Sampel Organ Hepar

Pengambilan sampel organ hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke 29. Tikus dieuthanasia dengan cara *dislocatio os cervicalis* dan diletakkan di atas papan bedah secara rebah *dorsal*. Pembedahan dilakukan pada bagian abdomen dilanjutkan dengan pengambilan organ hepar. Hepar dipotong menggunakan gunting bedah dan dimasukkan dalam pot yang berisi larutan PBS.

4.6.5 Isolasi Protease

Organ hepar seberat 0,5 gram dipotong kecil-kecil, lalu ditambah larutan PBS Tween : PMSF (9:1) sebanyak 1 mL, ditambah sedikit pasir kuarsa dan digerus dengan mortar dingin. Setelah itu ditambah dengan larutan PBS-Tween : PSMF (9:1) sebanyak 2 mL dan dipindahkan ke dalam tabung polipropilen. Kemudian dihomogenkan dengan alat getar vorteks selama 10 menit, disonikasi selama 10 menit dan diputar dengan alat sentrifugasi 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 diputar 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 dan dilakukan homogenasi (Aulani'am, 2013).

4.6.6 Pengukuran Aktivitas Protease

Dicampurkan kasein 500 ppm sebanyak 200 μ l, buffer fosfat Ph 7 sebanyak 300 μ L dan enzim protease sebanyak 100 μ L. Kemudian didiamkan selama 60 menit pada suhu 37°C di atas penangas air. Selanjutnya, dilakukan proses sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Ditambahkan TCA 4% (b/c) dan ditunggu selama 30 menit pada suhu 27°. Diambil supernatan sebanyak 100 μ L dan diencerkan 5 kali volume buffer fosfat lalu diukur nilai absorbansi pada λ maks tirosin sebesar 275nm (Wati, 2013).

Perhitungan aktivitas protease menggunakan rumus Walter (1984):

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

v = volume total sampel (mL)

q = waktu inkubasi (menit)

P = Jumlah Enzim (ml)

fp = faktor pengenceran.

4.6.7 Pengukuran Kadar MDA

Pengukuran kadar MDA dilakukan sesuai dengan metode yang digunakan Aulanni'am *et al* (2012). Organ hati dengan berat 1 gram dimasukkan ke dalam mortar dingin dan digerus hingga halus. Kemudian 500 μ l NaCl 0,9% ditambahkan dan dilakukan homogenasi. Homogenat diambil dan dipindahkan ke tabung ependorf. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit dan diambil supernatannya. Supernatan sebanyak 100 μ L dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 550 μ l, 100 μ l TCA, 100 μ L HCL 1 N, 100 μ L Na-Thio 1 % dan dihomogenkan kembali. Setelah itu disentrifugasi 500 rpm selama 10 menit, dipanaskan dalam water bath 100°C selama 30 menit. Sampel kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum (λ maks = 532 nm)

4.6.8 Analisa Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah nilai aktivitas protease dan kadar MDA (*malondialdehyde*) pada organ hepar. Analisa data yang digunakan berupa data kuantitatif untuk mengetahui nilai aktivitas protease dan kadar MDA (*malondialdehyde*) pada organ hepar menggunakan uji ANOVA serta dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha=5\%$, untuk mengetahui perbedaan setiap perlakuan.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa Terhadap Aktivitas Protease Pada Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Diazinon

Enzim protease merupakan enzim yang berfungsi untuk menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Aktivitas protease merupakan kemampuan enzim protease untuk memecah protein. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu μmol produk tirosin per menit pada kondisi pengukuran. Aktivitas protease diukur dengan menggunakan spektrofotometri dengan larutan kasein sebagai substrat didapat hasil sesuai pada (**Lampiran 11**). Hasil pengukuran aktivitas protease kemudian dilanjutkan dengan perhitungan menggunakan *One-Way ANOVA* sesuai dengan (**Tabel 5.1**).

Tabel 5.2 Rata-rata aktivitas protease hepar tikus putih *Rattus norvegicus*

Perlakuan	Rata-rata Aktivitas Protease \pm SD (ng/mL)
Kontrol -	0,945 \pm 0,031 ^a
Kontrol +	1,265 \pm 0,069 ^c
Perlakuan 1	1,052 \pm 0,026 ^b
Perlakuan 2	1,045 \pm 0,012 ^b
Perlakuan 3	0,987 \pm 0,026 ^{ab}

Keterangan : penggunaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan

($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan.

Hasil analisis aktivitas protease diketahui bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan terhadap kelompok kontrol positif (K+). Kelompok kontrol positif diberi perlakuan induksi diazinon dengan dosis 60 mg/kgBB tanpa diberi terapi madu Sumbawa diperoleh hasil rata-rata sebesar 1,265 ng/mL, sehingga diketahui berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok K(-).

Enzim protease yang terdapat pada kelompok kontrol negatif (K-) disebabkan oleh protease secara normal berada di dalam sel yang berfungsi untuk sinyal transduksi dan regulasi sel. Protease memiliki peran dalam sinyal transduksi untuk aktivasi hormon polipeptida, faktor perkembangan dan pertahanan tubuh. Faktor perkembangan yaitu pada perakitan kolagen dan prokolagen, serta berperan pada proliferasi sel yaitu kontrol proteolitik oleh siklin, degradasi serta berperan pada kematian sel yang terprogram (apoptosis) (Hardiany, 2013). Aktivitas protease dalam sel normal sampai saat ini belum didapatkan standar normalnya, sehingga nilai aktivitas protease pada kelompok kontrol negatif (K-) digunakan sebagai standar untuk diketahui adanya peningkatan atau penurunan yang terjadi akibat dilakukannya perlakuan.

Peningkatan yang terjadi pada kelompok kontrol positif (K+) disebabkan oleh adanya induksi diazinon. Diazinon yang masuk didalam tubuh akan diubah oleh enzim *Cytochrome P450* menjadi oxonoorganofosfat yang bersifat radikal bebas. oxonoorganofosfat akan menyebabkan stress oksidatif dan menginduksi peroksidasi lipid (Himah, 2017). *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebih di dalam jaringan tidak ternetralisir oleh antioksidan dapat menyebabkan stres oksidatif. Kondisi stres oksidatif akan menyebabkan kerusakan molekul seperti

DNA, lipid dan protein. Bila kondisi tersebut berlangsung dalam waktu lama dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel (Hussain *et al.*, 2016).

Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada orbit paling luar dan bersifat sangat reaktif. Radikal bebas ini akan merusak membran sel yang mengandung asam lemak jenuh (PUFA) menjadi peroksidasi lipid yang tidak stabil. Proses peroksidasi lipid terdiri dari beberapa tahapan reaksi yaitu inisiasi, propogasi dan terminasi. Tahap inisiasi terjadi saat atom hidrogen pada gugus metilen oleh ROS membentuk radikal karbon ($L\cdot$). Tahapan propagasi terjadi saat radikal karbon akan bereaksi dengan oksigen dimana akan terbentuk radikal peroksil ($LOO\cdot$) dan berlanjut berikatan dengan atom hidrogen lipid lain membentuk hidrogen peroksida ($LOOH$) yang bersifat sitotoksik, sehingga terjadi reaksi berantai. Tahap terminasi akan terjadi saat radikal karbon yang terbentuk saat inisiasi ataupun radikal lain yang terbentuk pada tahap propagasi bereaksi dengan radikal lain membentuk produk non radikal (Setiawan dan Suhartono, 2007).

Kerusakan sel yang terjadi akibat adanya peroksidasi lipid yaitu disebabkan oleh perubahan kandungan cairan membran dan menyebabkan keluarnya enzim dari sel (Surya, 2013). Pada akhir rangkaian dari degradasi peroksidasi lipid akan menghasilkan entana, pentana dan MDA (Cochrane, 1991). Radikal bebas dapat menyebabkan peningkatan infiltrasi sel-sel inflamasi yang dapat melepaskan enzim protease. keadaan inflamasi menyebabkan infiltrasi sel-sel inflamasi seperti neutrofil, monosit dan limfosi. Pada bagian inflamasi, sel-sel inflamasi aktif melepaskan banyak enzim (protease netral, elastase, kolagenase, asam hidrolase, fosfatase, lipase) (Biswas, 2015).

Kelompok perlakuan 1 (P1) yang diinduksi diazinon dan diterapi menggunakan madu Sumbawa konsentrasi 25% diperoleh rata-rata aktivitas protease sebesar 1,052 ng/mL yang berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok K(+) dan berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok K(-). Kelompok perlakuan 2 (P2) yang diinduksi dengan diazinon dan diterapi dengan madu Sumbawa dengan konsentrasi 50% diperoleh rata-rata aktivitas protease sebesar 1,045 ng/mL yang berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok K(+) dan berbeda secara signifikan dengan kelompok K(-). Pada kelompok perlakuan 3 (P3) yang diinduksi dengan diazinon dan diterapi dengan madu Sumbawa 75% diperoleh rata-rata aktivitas protease sebesar 0,987 ng/mL yang berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok K(+), namun tidak berbeda secara signifikan dengan K(-).

Penurunan aktivitas protease pada kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 dapat terjadi akibat adanya antioksidan yang terkandung dalam madu Sumbawa seperti polifenol, flavonoid dan vitamin C. Madu mengandung komponen antioksidan diantaranya vitamin C, polifenol dan flavonoid (As'ari, 2009). Mekanisme kerja antioksidan memiliki dua fungsi. Fungsi pertama merupakan fungsi utama dari antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder antioksidan, yaitu memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme diluar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan perubahan radikal lipid ke bentuk yang lebih stabil (Nofianti *et al*, 2015).

Flavonoid dan polifenol merupakan antioksidan alami yang terdapat pada tumbuhan yang bekerja dengan cara menangkap atau menetralkan radikal bebas

seperti *reactive oxygen species* (ROS) terkait dengan gugus OH fenolik, sehingga dapat memperbaiki keadaan jaringan yang rusak atau terhambatnya proses inflamasi (Asfari *et al*, 2016). Terhambatnya proses inflamasi dapat menurunkan sel-sel inflamasi. Sehingga, aktivitas protease di dalam sel akan menurun. Terhambatnya peroksidasi lipid akan menyebabkan penurunan kerusakan molekul seperti DNA, lipid dan protein. Kerusakan sel yang terjadi akibat adanya peroksidasi lipid yaitu disebabkan oleh perubahan kandungan cairan membran dan memobilisasi enzim sehingga dapat keluar melewati membran yang rusak tersebut (Surya,2013).

Vitamin C sebagai antioksidan sekunder bertugas menangkap radikal bebas dan menghambat reaksi berantai (Sayuti, 2015). Vitamin C (L-Askorbat) bekerja menangkap radikal bebas dengan cara menerima elektron tunggal dari superoksida, hidrogen peroksida, hipoklorit, radikal hidroksil dan peroksil. Seperti polifenol, vitamin C secara tidak langsung dapat menurunkan aktivitas protease dengan cara menurunkan stres oksidatif dan menghambat reaksi berantai pengubahan superoksida menjadi hidrogen superoksida (Marks, 2000).

Madu Sumbawa memiliki nilai IC_{50} sebesar 23293,9 ppm (Sumarlin *et al*, 2014). Hasil tersebut diketahui bahwa madu Sumbawa memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah karena memiliki nilai $IC_{50} > 500$ ppm (Azmi, 2015). Nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*) merupakan besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat menghambat radikal bebas sebanyak 50% (Ridho, 2013). Berdasarkan hasil yang didapat diketahui bahwa madu Sumbawa dengan konsentrasi 25%, 50% dan 75% sebanyak 1 ml memiliki pengaruh dalam menurunkan aktivitas protease, karena nilai yang diperoleh berbeda secara

signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok K(+). Keadaan kelompok K(-) merupakan kelompok yang dianggap sehat karena tidak adanya nilai standar aktivitas protease pada hepar. Pemberian madu Sumbawa dengan konsentrasi 75% merupakan konsentrasi yang efektif dikarenakan dengan konsentrasi tersebut lebih mampu menahan terjadinya peroksidasi lipid sehingga menyebarnya kerusakan sel akibat rantai peroksidasi lipid akan terhambat dan akhirnya aktivitas protease hepar menurun.

5.2 Pengaruh Pemberian Madu Sumbawa terhadap Kadar *Mallondialdehyde* (MDA) Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Diazinon

Pengukuran kadar *Mallondialdehyde* (MDA) hepar tikus putih pada setiap kelompok dilakukan dengan menggunakan metode uji *Thiobarbituric Acid* (TBA). Hasil didapat dari pengukuran nilai absorbansi pada panjang gelombang 532 nm (**Lampiran 10**). Hasil pengukuran kadar *Mallondialdehyde* (MDA) selanjutnya dianalisis menggunakan *One-Way ANOVA* (**Tabel 5.1**)

Tabel 5.1 Rata-rata kadar *Mallondialdehyde* hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Perlakuan	Rata-rata Kadar MDA \pm SD (ng/mL)
Kontrol -	0,231 \pm 0,016 ^a
Kontrol +	0,373 \pm 0,049 ^b
Perlakuan 1	0,285 \pm 0,031 ^a
Perlakuan 2	0,270 \pm 0,029 ^a
Perlakuan 3	0,240 \pm 0,058 ^a

Keterangan : penggunaan notasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan.

Hasil analisa kadar *Mallondialdehyde* (MDA) diperoleh bahwa kadar MDA pada kelompok kontrol negatif K(-) memiliki rata-rata sebesar 0,231 ng/mL. Keberadaan MDA merupakan indikator dimana terjadinya kerusakan sel yang disebabkan oleh peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid terjadi akibat adanya ikatan antara radikal bebas dengan asam lemak jenuh. Radikal bebas terjadi secara terus menerus di dalam tubuh. Radikal bebas yang dihasilkan dari sisa proses metabolisme protein, karbohidrat dan lemak pada mitokondria, proses peradangan dan reaksi fagositosis (Sayuti, 2015). Dalam proses metabolisme sel normal, glukosa akan dioksidasi melalui reaksi yang melibatkan logam menjadi anion enediol, kemudian diubah menjadi ketoaldehid dan O_2^- . O_2^- mengalami dismutasi menjadi H_2O_2 yang tidak bisa didegradasi oleh katalase atau glutathion peroksidase sehingga menghasilkan OH^\bullet yang sangat reaktif. Anion superoksida dapat bereaksi dengan NO membentuk molekul reaktif peroxynitrit ($ONOO^-$) (Berawi, 2017). Sehingga, dapat diketahui bahwa MDA yang dihasilkan oleh kelompok kontrol negatif merupakan hasil dari metabolisme sel yang secara normal berjalan didalam tubuh.

Kelompok kontrol positif (K+) diberi perlakuan induksi diazinon dengan dosis 60 mg/kgBB tanpa diberi terapi madu Sumbawa. Sehingga, diperoleh hasil rata-rata kadar MDA sebesar 0,373 ng/mL dan diketahui berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok K(-). Diazinon termasuk dalam senyawa xenobiotik karena berupa agen yang tidak diperlukan oleh tubuh (Wulandari, 2006). Pemberian diazinon pada tikus dapat menyebabkan terjadinya peningkatan peroksidasi lipid hepar (Shah, 2010). Metabolisme diazinon sama seperti OP lain terjadi di hepar. Metabolisme xenobiotik terdiri dari 2 fase, yaitu fase I dimana

enzim metabolik mengaktivasi komponen kimia dengan mengenai gugus fungsi OP dan fase II merupakan proses perubahan struktur OP menjadi molekul hidrofilik seperti asam glukoronat, sulfat, glisin dan asam glutamat dengan bantuan enzim agar mudah diekskresi (Wulandari,2006).

Pemberian diazinon pada kelompok kontrol positif (K+) menyebabkan diazinon yang masuk didalam tubuh akan diubah menjadi oxonoorganofosfat yang bersifat radikal bebas dalam tubuh. oxonoorganofosfat akan menyebabkan stress oksidatif dan menginduksi peroksidasi lipid (Himah, 2017). Salah satu produk akhir dari proses peroksidasi lipid adalah MDA. Mekanisme pembentukan MDA melalui peroksidasi lipid diawali dengan penghilangan atom hidrogen (H) dari molekul lipid tak jenuh rantai panjang radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$), sehingga lipid bersifat radikal. Radikal lipid ini bereaksi dengan atom oksigen (O_2) membentuk radikal peroksil ($\bullet\text{OO}$), yang selanjutnya menghasilkan MDA (Yustika, 2013).

Kelompok perlakuan 1 (P1) yang diinduksi diazinon dan diterapi menggunakan madu Sumbawa konsentrasi 25% diperoleh rata-rata kadar MDA sebesar 0,285 ng/mL yang berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok K(+). Kelompok perlakuan 2 (P2) yang diinduksi dengan diazinon dan diterapi dengan madu Sumbawa dengan konsentrasi 50% diperoleh rata-rata kadar MDA sebesar 0,270 ng/mL yang berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok K(+). Kelompok perlakuan 3 (P3) yang diinduksi dengan diazinon dan diterapi dengan madu Sumbawa 75% diperoleh rata-rata kadar MDA sebesar 0,240 ng/mL yang berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok K(+).

Penurunan kadar MDA pada kelompok perlakuan P1, P2, dan P3 dapat terjadi akibat adanya antioksidan yang terkandung dalam madu Sumbawa seperti

polifenol, flavonoid dan vitamin C. Flavonoid dan polifenol memiliki mekanisme sebagai antioksidan yang bersifat secara langsung dan tidak. Mekanisme secara langsung yaitu dengan cara mendonorkan ion hidrogen sehingga dapat menetralkan efek radikal bebas dan menghambat rantai peroksidasi lipid. Sedangkan mekanisme tidak langsung yaitu meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen melalui beberapa mekanisme, salah satunya yaitu aktivasi *nuclear factor erythroid 2 related factor 2* (Nrf2) yang merupakan gen yang berperan dalam sintesis enzim antioksidan endogen seperti gen SOD (Kamilatussaniah, dkk., 2015). Peningkatan kadar antioksidan di dalam tubuh secara tidak langsung dapat menurunkan stres oksidatif sehingga proses peroksidasi lipid menurun dan berakhir dengan penurunan kadar MDA. Vitamin C sebagai antioksidan sekunder bertugas menangkap radikal bebas dan menghambat reaksi berantai (Sayuti, 2015). Vitamin C (L-Askorbat) bekerja menangkap radikal bebas dengan cara menerima elektron tunggal dari superoksida, hidrogen peroksida, hipoklorit, radikal hidroksil dan peroksil (Marks, 2000).

Berdasarkan hasil yang didapat diketahui bahwa madu Sumbawa dengan konsentrasi 25%, 50%, dan 75% sebanyak 1 ml memiliki pengaruh dalam menurunkan aktivitas MDA, karena nilai yang diperoleh berbeda secara signifikan ($p < 0,05$) dengan kelompok K(+) dan tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$) dengan kelompok K(-). Pemberian madu Sumbawa dengan konsentrasi 25% merupakan konsentrasi yang efektif dikarenakan dengan konsentrasi tersebut telah mampu menahan terjadinya peroksidasi lipid sehingga menyebarkan kerusakan sel akibat rantai peroksidasi lipid akan terhambat dan akhirnya kadar MDA hepar menurun.

Hasil yang telah didapat antara rata-rata aktivitas protease dan kadar MDA menunjukkan bahwa kadar MDA pada kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 telah mampu turun hingga mendekati rata-rata kadar MDA normal pada kelompok K(-) namun pada hasil rata-rata aktivitas protease hanya kelompok perlakuan 3 yang mampu turun aktivitas proteasenya mendekati rata-rata aktivitas protease normal pada kelompok K(-). Hasil yang seharusnya terjadi yaitu turunnya kadar MDA pada kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 yang mendekati keadaan normal harus berbanding lurus dengan turunnya aktivitas protease. Peneliti berspekulasi bahwa tidak sejalannya hasil antara rata-rata kadar MDA dan aktivitas protease dikarenakan ada faktor yang mempengaruhinya. Faktor yang mempengaruhi tersebut adalah kesalahan pemotongan lobus hepar yg dilakukan secara acak sebelum sampel organ tersebut diujikan ke laboratorium. Pemotongan lobus hepar seharusnya seragam pada semua kelompok supaya hasilnya dapat menjelaskan makna yang sebenarnya.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini dapat ditarik kesimpulan :

1. Pemberian terapi madu Sumbawa dengan konsentrasi 25%, 50% dan 75% telah mampu menurunkan aktivitas protease pada hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) akibat induksi diazinon dibanding kontrol (+) dengan konsentrasi terbaiknya adalah 75%.
2. Pemberian terapi madu Sumbawa dengan konsentrasi 25%, 50% dan 75% telah mampu menurunkan kadar MDA (*Malondialdehyde*) pada hepar tikus putih (*Rattus norvegicus*) akibat induksi diazinon dibanding kontrol (+) dengan konsentrasi terbaiknya adalah 25%.

6.2. Saran

1. Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut mengenai dosis toksisitas madu Sumbawa.

DAFTAR PUSTAKA

- Adi S., Dian R., dan Ika M., 2009. *Vitamin C Sebagai Antioksidan*. Fakultas Pertanian, UNS : Semarang.
- As'ari H., 2009. *Efek Pemberian Madu Terhadap Kerusakan Sel Hepar Mencit (Mus musculus) Akibat Paparan Parasetamol*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Asfari R., Kusmiyati M., 2016. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sirih Merah (Piper crocatum) terhadap Penurunan Kadar Gula Darah Mencit (Mus musculus)*. Jurnal Biologi Tropis, Januari 2016: Volume 16 (1) : 49-55.
- Aulanni'am, A. Roosdiana, N. L. Rahmah. 2011. *Potency of Brown Seaweed (Sargassum duplicatum Bory) Ethanol and Ethyl Acetic Fraction to Malondialdehyde Concentration Decreasing and Histological Retrieval of IBD (Inflammatory Bowel Disease) Rat Small Intestinal Jejunum*. Jurnal Ilmiah Kedokteran Hewan Vol. 4, No. 1.
- Aulani'am, 2013. *Aktivitas Protease dan profil Protein Pada Hepar Tikus Putih Pasca Induksi Cylosporine-A*. Kimia. Student Journal, Vol. 1, No. 1, pp. 105-111. Universitas Brawijaya, Malang.
- Azmi A. N., Yunianta, 2015. *Ekstraksi Antosianin dari Buah Murbei (Morus alba. L) Metode Microwave Assisted Extraction (Kajian Waktu Ekstraksi dan Rasio Bahan : Pelarut)*. FTP. Universitas Brawijaya. Malang
- Azrizal M. T., 2015. *Perbandingan Pemberian Madu Hutan Dan Madu Budidaya Pada Menit Ke-30 Terhadap Glukosa Darah Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung*. Fakultas Kedokteran. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Bennet, 2001. *Diazinon*. [Online]. Tersedia : [http://www.thepiedpiper.co.uk/th13\(e\).htm](http://www.thepiedpiper.co.uk/th13(e).htm). Diakses tanggal 24 April 2018.
- Berawi K. N., Theodora A., 2017. *Efek Aktivitas Fisik pada Proses Pembentukan Radikal Bebas sebagai Faktor Risiko Aterosklerosis*. Majority. Vol. 6 No. 2.
- Berger M. M., 2007. *Vitamin C Requirements in Parenteral Nutrition*. Service of Adult Intensive Care Medicine and Burns Centre, University Hospital (CHUV), Lausanne:Swiss.



- Biswas S. K., 2015. *Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox*. Hindawi Publishing Corporation. Oxidative Medicine and Cellular Longevity Vol. 2016. Article ID 5698931.
- Bredo R. M., 2011. *Anatomy of the Liver In Wistar Rat (Rattus norvegicus)*. Jurnal International J. Morphol. Hal 77.
- Boorman G. A., 2006. *Pathology of the Fischer Rat:Reference and Atlas*. California:Academics Press.
- Campbell, 2006. *Regulation of NF-Kb Fuction*. Biochem Soc Symp, 73:165-180.
- Cassaret L. J. and Doull J., 1975. *Toxicology:The Basic Science of Poisons*. MacMillan Publishing Co. Inc. New York.
- Cochrane G. C., 1991. *Cellular injury by oxydant*, Am.J.Med.
- Darmawan S., 2003. *Hati dan Saluran Empedu*. Jakarta:Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Dhianawaty dan Ruslin, 2013. *Kandungan Total Polifenol dan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Metanol Akar Imperata cylindria (L) Beauv. (Alang-alang)*. Departemen Biokimi dan Biomolekuler Fakultas Kedokteran Univ. Padjajaran:Bandung.
- Djumadi, 2008. *Pengaruh Pemberian Insektisida Diazinon Dan Kurkumin Kunyit (Curcuma Domestica) Per-Oral Terhadap Perubahan Struktur Histologis Duodenum Mencit (Mus Musculus)*. Jurusan Pendidikan Biologi FKIP. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Donatus, A. I., 2002. *Toksikologi Dasar*. Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi. Fakultas Farmasi. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Elersek T., and F. Metka. 2011. *Organophosphorus Pesticides- Mechanisms of Their Toxicity*. National Institute of Biology. Slovenia.
- Ensminger A. H., M. E. Ensminger, J. E Konlande, J. R. K. Robson, 1995. *The Concise Encyclopedia of Foods and Nutrition*. CRC Press. Florida.
- Estevinh, 2008. *Antioxidant and Antimicrobial Effects of Phenolic Compounds Extracts of Northeast Portugal Honey*. Food and Chemical Toxicology Volume 46, Issue 12 : 3774 - 3779.

- Ewantu, Yalemwork, Lemma, Wossenseged and Birhane, Nega, 2013. *Antibacterial effect of Apis mellifera and stingless bees honeys on susceptible and resistant strains of Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Klebsiela pneumonia in Gondar*. Northwest Ethiopia.
- Haeria dan H. A. T. Ugi, 2016. *Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Bidara (Ziziphus spina-christi L.)*. Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences 2016 1(2) : PP 57-61.
- Hamid, A. A. Aiyelaagbe, O. O. Usman, L. A, Ameen, O. M Lawal, 2010. *Antioxidant : its Medidal and Pharmacological Applications*. African Journal of pure and applied chemistry vol.4(8), pp. 142-151.
- Hardiany N. S., 2013. *Cathepsin dan Calpain : Enzim Pemecah Protein dalam Sel*. Depertemen Biokimia & Biologi Molekuler. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Himah S., 2017. *Aktivitas Hepatoprotektor Tepung Kedelai (Glycine max L.) terhadap Peningkatan Kadar MDA Hati Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Diazinon*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Jember. Jember.
- Himawan H., 2012. *Penetapan Kadar Residu Diazinon Pada Buah Stoberi (Fragaria Sp.) Setelah Pencucian Dengan Menggunakan Metode GC-MS*. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Hreljac I., 2009. *Organophosphorus Pesticides Enhance The Genotoxicity of Benzo(a)pyrene by Modulating its Metabolism*. Mut Res 671: 84-92.
- Hussain, T. Ble, T. Yulong, Y. Francois, 2016. *Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us*. Hindawi Publishing Corporation. Oxidative Medicine and Celllular Longevity. Volume 2016, Article ID 7432797.
- Isvasta, 1993. *Dilema Pestisida Tragedi Revolusi Hijau*. Yogyakarta: Kanisius.
- Iswara, 2009. *Pengaruh Pemberian Antioksidan Vitamin C dan E terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Putih Terpapar Allethrin*. Universitas Negeri Semarang. Semarang.
- Jeharatnam, David koh. 2005. *Bahan Ajar Praktik Kedokteran Kerja ed 1*. Jakarta: EGC
- Junqueira, 2000. *Histologi Dasar*. Jakarta. EGC.

- Kamilatussaniah A., Yuniastuti, R. S. Iswari, 2015. *Pengaruh Suplementasi Madu Kelengkeng terhadap Kadar TSA dan MDA Tikus Putih yang Diinduksi Timbal*. Jurnal MIPA 38 (2) (2015) : 108-114.
- Kusrianingrum, R. S., 2010. *Perancangan Percobaan*. Edisi ke-2. Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair (AUP). Surabaya.
- Marks, 2000. *Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*. Biokimia Kedokteran Dasar : Sebuah Pendekatan Klinis. Jakarta : EGC, ISBN: 979-448-483-0.
- Maula I. F., 2014. *Uji Antifertilitas Ekstrak N-Heksana Biji Jarak Pagar (Jatropha Curcas L.) Pada Tikus Putih Jantan (Rattus Norvegicus) Galur Sprague Dawley Secara In Vivo*. [SKRIPSI]. UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Munaf, 1997. *Keracunan Akut Pestisida*. Jakarta: Widya Medika.
- Nahdhinah, Durrotun. 1998. *Uji Keteratogenika Kurkuminoid Pada Tikus Bunting*. Skripsi Fakultas Farmasi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Ngabekti S., 1998. *Residu pestisida pada sayuran yang dipasarkan di Kodya Semarang*. Laporan Penelitian. IKIP Semarang.
- Ngabekti S., dan Isnaeni W., 2000. *Pemanfaatan kurkumin untuk mengeliminir pengaruh diazinon terhadap kerusakan hati mencit (Mus musculus L.)*. Jurnal Manusia dan Lingkungan. 1(7):24-34.
- Nofianti T., Windiarti., D. Prasetyo, 2015. *Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Krop Kubis Putih (Brassica oleracea L. var capitata) terhadap kadar Kolesterol Total dan Trigliserida Serum Darah Tikus Putih Jantan Galur Wistar*. Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada. Volume 14 Nomer 1.
- Pertiwi H. O. M., Aulanni'am., Herawati, 2012. *Aktivitas Protease dan Gamabran Histopatologi Epitel Bronkus Akibat Pengaruh Terapi Ekstrak Daun Putri Malu (Minosa pudica Linn.) terhadap Hewan Tikus (Rattus norvegicus) Model Asma*. Universitas Brawijaya. Malang.
- Price S. A., dan Wilson L. M., 1984. *Patofisiologi Konsep Klinik Proses-Proses Penyakit Bagian I*. (diterjemakan oleh Adji Dharmawan). EGC. Jakarta.
- Price S. A., Lorraine M. W., 2006. *Patofisiologi Konsep Klinik Proses-Proses Penyakit*. Jakarta: EGC.

- Ressang A. A., 1984. *Patologi Khusus Veteriner Edisi 2*. Bali.
- Ridho E. A., 2013. *Uji Antioksidan Ekstrak Metanol Buah Lakum (Cayratia trifolia) dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil)*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Tanjungpura. Pontianak.
- Rosita, 2007. *Berkat Madu Sehat, Cantik, dan Penuh Vitalitas*. Cet I. Bandung. PT. Mizan Pustaka.
- Salasia dan Bambang Hariono, 2010. *Patologi Klinik Veteriner*. Yogyakarta. Samudra Biru
- Sayuti, 2015. *Antioksidan, Alami dan Sintetik*. Andalas University Press. Padang.
- Setiawan dan Suhartono, 2007. *Peroksidasi Lipid dan Penyakit Terkait Stres Oksidatif pada Bayi Prematur*. Majalah Kedokteran Indonesia 57 (1):10-14.
- Shah M. D., Iqbal M., 2010. *Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats*. Universiti Malaysia Sabah. Malaysia.
- Sjahid R., dan Landyyun., 2008. *Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Daun Dewandaru (Eugenia uniflora L.)*. Skripsi. Tersedia dalam <http://www.pdfport.com/view/638561-isolasi-dan-identifikasi-flavonoid-dari-daun-dewandaru-eugenia.html> (diakses tanggal 23 April 2018).
- Singh, 2014. *Use of Malondialdehyde as a Biomarker for Assessing Oxidative Stress in Different Disease Pathologies : a Review*. Iranian J Publ Health, Vol. 43, pp 7-16.
- Stephenson, 1992. *Inflammation. General and Systemic Pathology*. Underwood JCE, editor. Edinburg: Churchill Livingstone. Pp: 177- 200.
- Sudionon J. B., Kurniadi, Hendrawan A., dan Djinantoro B., 2003. Ilmu Patologi. Penerbit EGC. Jakarta.
- Surya I. G. P., 2013. *Kadar Malondialdehyde (MDA) pada Abortus Inkomplit Lebih Tinggi Dibandingkan dengan Kehamilan Normal*. Fakultas Kedokteran. Universitas Udayana. Denpasar.
- Usman M.R., 2013. *kinetika fotokatalisis diazinon dengan titanium dioksida (tIO_2)*. [SKRIPSI]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Jember.

- Wati I. P., Aulanni'am, Mahdi C., 2013. *Aktivitas Protease Dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih (Rattus Norvegicus) Pasca Induksi Cyclosporine-A*. Universitas Brawijaya. Malang.
- Wulandari, 2006. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sambiloto (Andrographis Paniculata Ness.) Terhadap Struktur Mikroanatomi Hepar Dan Kadar Glutamat Piruvat Transaminase Serum Mencit (Mus Musculus L.) Yang Terpapar Diazinon*. [SKRIPSI]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Yuningsih, 2010. *Penggunaan Asetonitril, $MGSO_4$ dan NaCl untuk Analisa Residu Pestisida DDE (Insektisida Organoklorin), Diazinon dan Fention (Insektisida Organofosfat) Dalam Pakan Ternak Dengan Cara Khromatografi Lapis Tipis*. Balai Besar Veteriner. Bogor.
- Yustika A. R., Aulanni'am, Prasetya S., 2013. *Kadar Malondialdehid (Mda) Dan Gambaran Histopatologi Pada Ginjal Tikus Putih (Rattus Norvegicus) Pasca Induksi Cyclosporine-A*. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
- Zulhawa, 2010. *Daya Hambat Madu Sumbawa Terhadap Pertumbuhan Kuman Staphylococcus Aureus Isolat Infeksi Luka Operasi Rs Islam Amal Sehat Sragen*. [SKRIPSI]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.