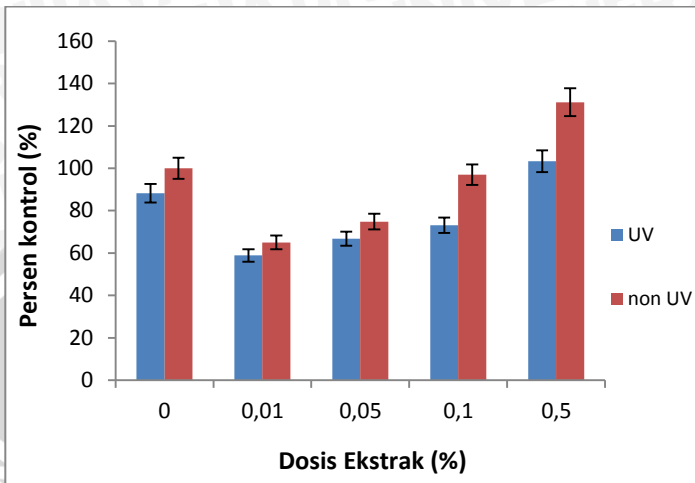


BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

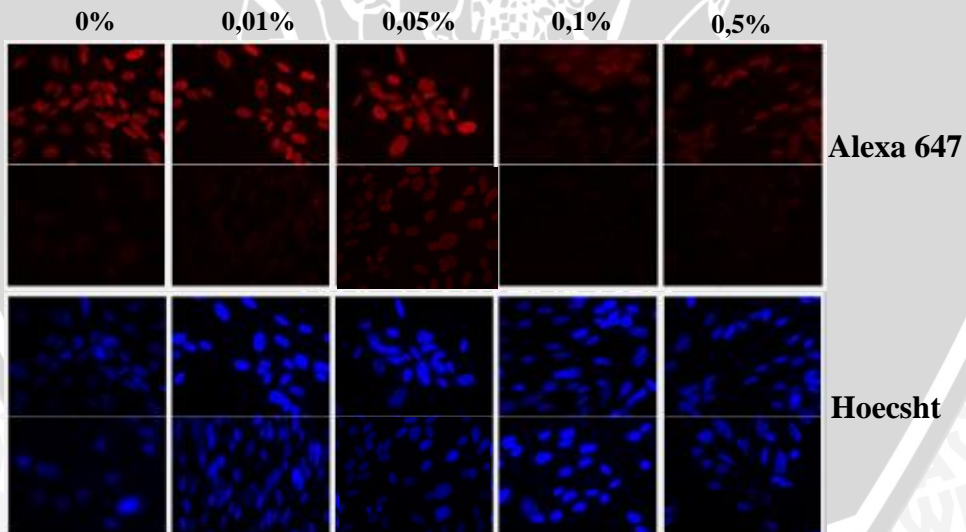
Juwet merupakan tumbuhan yang dikenal memiliki banyak manfaat mulai dari daun, buah, biji, batang, beserta bagian tubuh juwet lainnya (Chaudhary & Mukhopadhyay, 2012). Biji juwet telah diketahui memiliki banyak kegunaan karena kandungan senyawa aktif antioksidan di dalamnya (Ayyanar, dkk., 2012). Salah satu senyawa antioksidan yang khas ditemui pada biji juwet adalah *jambosin* (Swami, dkk., 2012). Asam elagat, quercetin, flavonoid merupakan senyawa aktif lain yang dapat ditemui pada biji juwet (Staneley, dkk., 2003; Kumar, dkk., 2008). Asam elagat dan quercetin merupakan senyawa yang diketahui memiliki sifat elektrofil atau mampu menyumbangkan sebuah elektron sehingga dapat menyebabkan adanya aktivasi Nrf-2 di dalam sel sehingga protein antioksidan dapat teraktivasi dan menetralkan adanya radikal bebas. Kedua senyawa tersebut dapat meningkatkan viabilitas sel setelah adanya paparan sinar UV (Hseu, dkk., 2012).

Kemampuan ekstrak biji juwet untuk mempertahankan viabilitas sel setelah paparan sinar UV diuji dengan metode *MTT assay*. Nilai absorbansi setelah dilakukan metode *MTT assay* berbanding lurus dengan viabilitas sel. Semakin tinggi nilai absorbansinya maka viabilitas selnya semakin tinggi pula (Munadzirah, 2004). Nilai absorbansi yang diperoleh dari *MTT assay* adalah menunjukkan aktifitas enzim reduktase yang dihasilkan oleh mitokondria, hanya sel yang hidup yang mampu menghasilkan enzim tersebut (Khoswanto, 2008; Rosa, 1995). Enzim mitokondria suksinat dehidrogenase akan mereduksi warna kuning molekul 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromida (*MTT*) menghasilkan formazan yang berwarna ungu (Sadikin, 2002).

Paparan sinar UV menyebabkan adanya penurunan viabilitas sel serta adanya ekspresi γ -H2AX pada kultur sel TIG-3. Viabilitas sel menurun setelah adanya paparan sinar UV terlihat pada penurunan nilai absorbansi sebesar 12% pada kontrol UV. Ekspresi γ -H2AX akan terjadi ketika sel terpapar sinar UV yang terlihat pada terwarnainya inti sel oleh Alexa 647 pada kultur kontrol UV. Ekspresi γ -H2AX pada nukleus sel menunjukkan adanya pembentukan DSB (*double strand break*) setelah adanya paparan sinar UV (Tu, dkk., 2013; Halicka, dkk., 2005). Pembentukan DSB disebabkan oleh terlepasnya γ -H2AX sehingga menghambat siklus sel (Li, dkk., 2005).



Gambar 7. Viabilitas sel setelah mengalami peningkatan setelah paparan sinar UV pada dosis ekstrak biji juwet. Viabilitas sel mengalami penurunan setelah diberi paparan sinar UV. Ekstrak biji juwet mampu meningkatkan viabilitas sel pada dosis 0,5% dan pada dosis rendah 0,01%; 0,005%; dan 0,1% viabilitas sel mengalami penurunan.



Gambar 8. Paparan sinar UV menyebabkan adanya ekspresi γ -H2AX pada kultur sel TIG-3 terlihat pada kontrol UV. Pemberian ekstrak biji juwet mampu menurunkan ekspresi γ -H2AX.

Penurunan viabilitas sel juga terlihat pada kultur sel TIG-3 pada dosis 0,01%; 0,05% baik pada perlakuan UV dan non UV. Hal tersebut dikarenakan adanya kerusakan DNA yang terlihat pada ekspresi γ -H2AX kultur sel TIG-3 dosis 0,01% dan 0,05%. Ekspresi γ -H2AX tersebut lebih rendah jika dibandingkan dengan kultur pada dosis 0,01% dan 0,05% pada perlakuan UV sehingga dapat diduga bahwa kerusakan DNA yang terjadi lebih sedikit dibandingkan dengan perlakuan UV. Perbedaan pola viabilitas terjadi pada dosis ekstrak 0,01% yaitu terjadi penurunan nilai absorbansi pada perlakuan UV baik dibandingkan dengan kontrol UV dan non UV akan tetapi mengalami peningkatan pada perlakuan non UV dibandingkan kontrol UV serta memiliki kesamaan dengan kontrol non UV.

Ekspresi γ -H2AX pada kultur sel TIG-3 perlakuan UV dosis 0,1% dan 0,5% memiliki kesamaan dengan kontrol non UV, menunjukkan bahwa ekstrak biji juwet mampu menghambat adanya ekspresi γ -H2AX pada kultur sel setelah paparan sinar UV pada dosis tersebut. Dengan terhambatnya ekspresi γ -H2AX pada kultur sel maka siklus sel akan terus berlanjut yang ditunjukkan dengan meningkatnya viabilitas sel. Nilai absorbansi sel yang diberi ekstrak biji juwet dosis 0,5% perlakuan UV mengalami peningkatan sebesar 15% dibanding dengan kontrol UV serta memiliki viabilitas yang sama dengan kontrol non UV.

Kemampuan ekstrak biji juwet untuk menghambat ekspresi γ -H2AX pada kultur sel TIG-3 menunjukkan bahwa ekstrak biji juwet memiliki sifat elektrofил. Suatu substansi elektrofил akan menstimulasi pembentukan radikal bebas dengan mendonorkan satu elektron bebasnya pada protein sel sehingga terjadi ketidakstabilan reaksi redoks di dalam sitoplasma sel (Herrling, 2007). Adanya ketidakstabilan menyebabkan Keap-1 terlepas dari Nrf-2 di dalam sitoplasma masuk ke dalam inti sel (Mao, dkk., 2010). Nrf-2 akan mengaktifkan beberapa protein antioksidan sehingga radikal bebas yang terbentuk akan ternetralisir (Hseu, dkk., 2012). Menurunnya kadar radikal bebas di dalam sel akan menghambat terjadinya pembentukan DSB atau kerusakan DNA sehingga γ -H2AX tidak terlepas dan terdeteksi pada saat deteksi menggunakan metode imunofluoresensi yang terlihat pada dosis ekstrak 0,5%. Ekspresi γ -H2AX pada sel yang diberi ekstrak dosis 0,01% dan 0,01% perlakuan UV menyebabkan siklus sel terhambat. Penghambatan siklus sel dikarenakan ekspresi γ -H2AX akan menyebabkan aktivasi protein p53 yang merupakan faktor transkripsi protein p21 yang menyebabkan siklus sel akan terhenti pada fase G1 (Widodo, dkk., 2010).

Sinar UV merupakan sinar yang bersifat *genotoxic* karena dapat menginduksi adanya stress oksidatif pada sel. Penyerapan sinar UV oleh sel akan menyebabkan protein-protein sel menjadi labil dan sel mulai memproduksi ROS (*reactive oxygen species*) (Svobodova, dkk., 2003; Hseu, dkk., 2012). Pelepasan protein γ -H2AX akan mengaktifasi protein p53 yang merupakan faktor transkripsi dari beberapa protein lain yang terlibat dalam proses *DNA repair mechanism*, salah satunya protein p21 (Widodo, dkk., 2010). Akumulasi protein p21 dan protein p53 akan menyebabkan sel terinduksi untuk mengalami *senescence* (kehilangan kemampuan untuk proliferasi) (Widodo, dkk., 2008).

Materi genetik berupa DNA di dalam sel akan diikat oleh protein histon sehingga terlihat sebagai nukleus. H2AX merupakan salah satu sub tipe histon H2A yang akan terfosforilasi ketika terdapat gangguan seperti adanya radiasi (Halicka, dkk., 2005). Hasil fosforilasi protein histon adalah γ -H2AX yang akan terlepas di dalam nukleus sehingga untai ganda DNA menjadi terbuka. Pelepasan γ -H2AX di dalam sel dapat dideteksi dengan metode *immunoassay* atau *immunofluorescence*. Akumulasi γ -H2AX di dalam sel akan mengaktifasi protein p53 yang memiliki peran dalam proses *DNA repair* (Rothkamm & Horn, 2009). Ketika terdapat suatu gangguan, salah satunya radiasi UV yang menyebabkan terfosforilasinya protein H2AX menjadi γ -H2AX yang akan terlepas dan mengaktifasi protein p53 sehingga mampu menuju inti sel (Kastan, dkk., 2001). Dalam keadaan normal, protein p53 akan mengalami inaktivasi di dalam sel dan diikat oleh inhibitorynya (Adimoolam & Ford, 2003). Translokasi protein p53 ke dalam inti sel akan menyebabkan beberapa protein yang terlibat dalam proses *DNA repair* akan teraktivasi dan menyebabkan ekspresi p21 (Ohshima, 2012; Kastan, dkk., 2001). Upregulasi protein p21 akan menyebabkan sel tidak dapat memasuki sistem *check point* untuk memasuki fase S, dengan demikian maka proses *DNA repair* akan berjalan dengan baik tanpa adanya risiko tereplikasinya DNA mutan (Waga, dkk., 1994). Terhentinya siklus sel akan menyebabkan proliferasi sel menjadi terhambat (Li, dkk., 2005).

Kandungan antioksidan dalam ekstrak biji juwet, diantaranya asam elagat dan quercetin mampu menetralkan radikal bebas yang dihasilkan setelah pemaparan sinar UV sehingga fosforilasi histon H2AX dapat dicegah (Hseu, dkk., 2012; Ayyanar, dkk., 2012; Chaudhary dan Mukhopadhyay, 2012, Swami, dkk., 2012). Asam elagat dan quercetin memiliki sifat elektrofil. Suatu substansi disebut dengan elektrofil jika mampu mendonorkan elektronnya pada substansi lain (Herrling, dkk.,

2007). Kandungan asam elagat dan quercetin dalam ekstrak biji juwet merupakan elektrofili sehingga mampu menetralkan radikal bebas dan juga mampu mengaktifkan Nrf-2 sebagai faktor transkripsi dari beberapa protein antioksidan sehingga radikal bebas dapat dinetralkan sebelum menyebabkan kerusakan DNA (Hseu, dkk., 2012; Hirota dkk., 2005; Kimura, dkk., 2009). Selain kedua senyawa tersebut, antioksidan-antioksidan lain seperti fenol, flavonoid, jambosin, dan vitamin C yang terdapat dalam biji juwet secara bersama akan mampu menetralkan radikal bebas secara optimal (Svobodova, dkk., 2003; Gowri & Vashanta, 2010; Ayyanar, dkk., 2012; Chaudhary dan Mukhopadhyay, 2012; Swami, dkk., 2012).

Antioksidan merupakan substansi yang mampu mencegah terjadinya apoptosis sel dengan mengaktifkan faktor-faktor inhibitor pada proses apoptosis (Bai & Meng, 2005). Sel dapat memperoleh antioksidan dari luar sel (eksogen) ataupun dari dalam sel sendiri (endogen) (Hseu, dkk., 2012). Aktivitas antioksidan endogen seperti protein HO-1, SOD, NQO-1, GSTA2, γ -GCLC and γ -GCLM dipengaruhi oleh faktor transkripsi Nrf-2 (Surh, 2003). Nrf-2 merupakan protein yang dinonaktifkan oleh protein Keap-1 di dalam sitoplasma. Ketika terdapat gangguan salah satunya stress oksidatif karena adanya paparan sinar UV, Keap-1 akan terlepas sehingga Nrf-2 akan mengalami translokasi menuju inti dan mengaktifkan protein-protein antioksidan (Nakazato, dkk., 2005; Kimura, dkk., 2006; Liu, dkk., 2011).

