

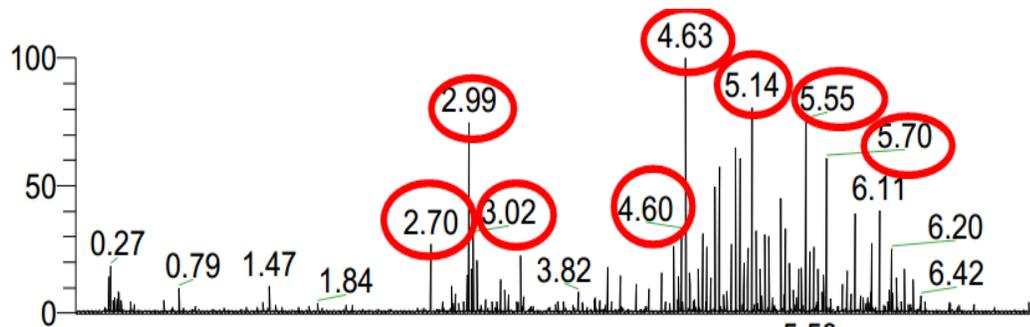
BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Struktur Antosianin Ekstrak Ubi Jalar Ungu (*Ipomeo batatas*) Hasil LC-MS

Antosianin memiliki efek antioksidan yang dimanfaatkan untuk menekan produksi radikal bebas atau kerusakan yang ditimbulkannya. Struktur antosianin yang terkandung di dalam ubi jalar ungu berbeda tergantung pada spesies ubi jalar. Struktur antosianin dipengaruhi oleh posisi dan jumlah gugus hidroksil, serta jenis asam alifatik yang terikat pada gula tersebut. Berdasarkan hasil pengamatan menggunakan LC-MS, struktur antosianin yang terkandung dalam produk minuman ubi jalar ungu yang diteliti merupakan struktur dari turunan senyawa sianidin, petunidin, malvidin, sianidin, peonidin dan delpinidin. Struktur ini mirip dengan struktur antosianin yang berasal dari spesies Ayamurasaki yaitu struktur dari sianidin-3-O-glukosida dan peonidin-3-O-glukosida.

Identifikasi struktur antosianin pada ubi jalar ungu didasarkan pada perbedaan berat molekul senyawa yang diperoleh. Struktur senyawa yang didapatkan dari produk ubi jalar ungu dibandingkan dengan literatur yang ada. **Gambar 5.1** memperlihatkan gambaran spektra ubi jalar ungu yang dianalisis menggunakan LC-MS:



Gambar 5.1 Spektra struktur antosianin ubi jalar ungu hasil identifikasi menggunakan LC-MS

Struktur antosianin ubi jalar ungu diperlihatkan oleh puncak-puncak tertinggi pada spectra. Terdapat banyak puncak pada **Gambar 5.1** namun dari hasil identifikasi struktur antosianin ubi jalar ungu ada lima puncak tertinggi utama dimana perkiraan struktur antosianin ubi jalar ungu dapat dilihat pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Hasil Identifikasi Struktur Antosianin Ubi Jalar Ungu

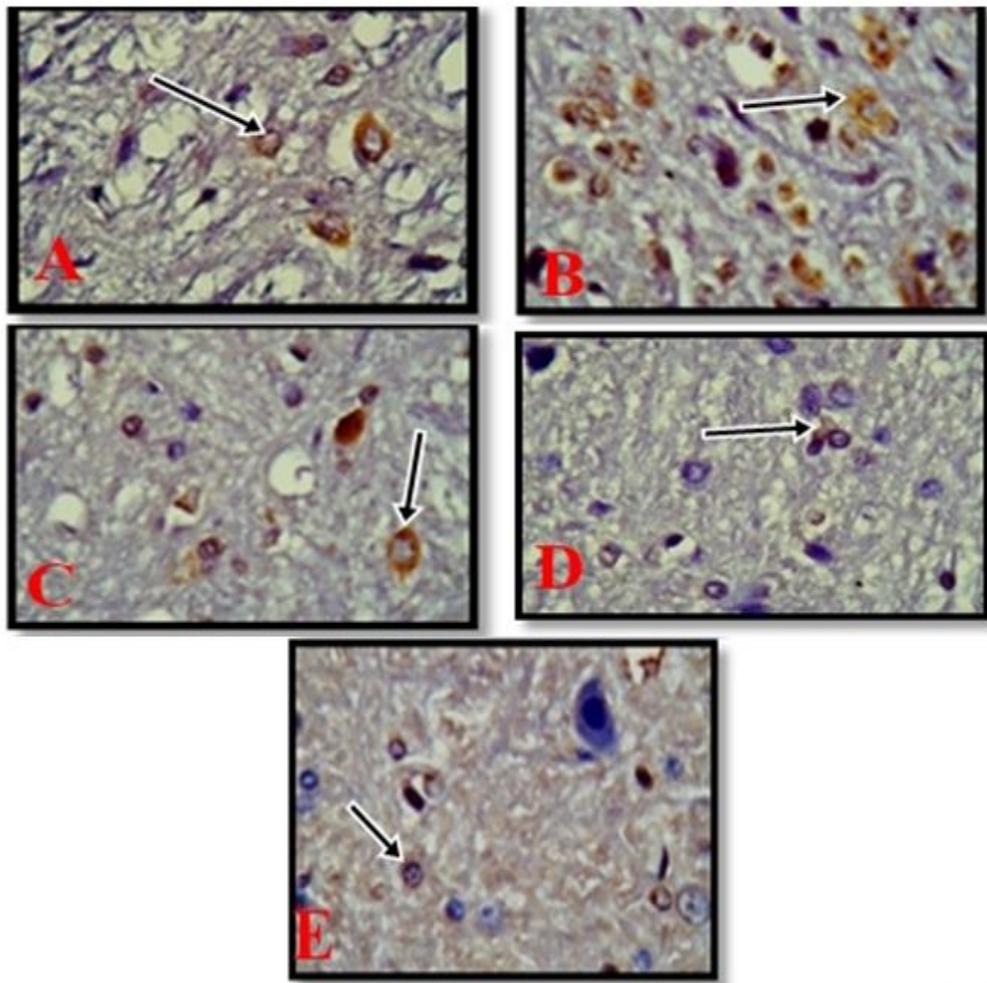
Perkiraan Struktur Antosianin	RT (min)	[M] ⁺ (m/z)	Fragmen ion (m/z)
Petunidin-3-O-(6''-O-coumaroyl)-glucoside	2,99	625	316,50-317,5
Peonidin-3-O-glucoside	4,63	463	300,5-301,5
Malvidin-3-O-glucoside	5,14	493	330,5-331,5
Delphinidin-3-O-glucoside	6,11	465	302,5-303,5
Cyanidin-3-O-glucoside	6,20	595	286,5-287,5

Teridentifikasinya struktur antosianin pada ubi jalar ungu membuktikan adanya aktivitas biologis antosianin pada produk minuman yang diamati.

Kemampuan antosianin untuk melewati sawar darah otak dapat meningkatkan kognisi dan memori spasial. Antosianin bekerja dengan cara memodulasi jalur sinyal pada sistem saraf pusat. Contoh antosianin yang terglukosilasi adalah sianidin-3-O-beta glukosida dan delphinidin-3-O-beta galaktosida dimana kedua jenis antosianin ini dapat menurunkan peroksidasi lipid, meningkatkan kadar glutathione yang berkurang serta menginduksi antioksidan enzimatis [53]. Struktur antosianin yang terdapat dalam ubi jalar ungu diharapkan memiliki aktivitas biologis sebagaimana turunan antosianin yang lain. Dengan demikian diasumsikan bahwa teridentifikasinya struktur antosianin pada produk minuman ubi jalar ungu dapat dijadikan sebagai bahan terapi terhadap penyakit stroke iskemik.

5.2 Potensi Ekstrak Antosianin Ubi Jalar Ungu Terhadap Ekspresi Beta Amyloid

Iskemik reperfusi mempengaruhi stabilitas seluler jaringan otak. Pembentukan radikal bebas yang berlebihan pasca iskemik reperfusi merangsang pemecahan precursor protein amyloid pada daerah otak dimana produk proteolisisnya akan membentuk plak amyloid. **Gambar 5.2** memperlihatkan gambaran ekspresi Beta Amyloid di bawah pengamatan mikroskop. Ekspresi Beta Amyloid ditunjukkan dengan pembentukan warna coklat pada neuron. Berdasarkan pemeriksaan gambaran immunohistokimia dapat disimpulkan bahwa terjadi pembentukan ekspresi Beta Amyloid pada kelompok perlakuan. Dari intensitas pewarnaan yang dihasilkan, ekspresi Beta Amyloid meningkat tajam pada 1 jam pertama pasca iskemik reperfusi. Lalu, mengalami penurunan setelah diterapi antosianin ubi jalar ungu.



Gambar 5.2 Gambaran imunohistokimia Beta Amyloid otak kecil model stroke iskemik pada perbesaran 400x

- A = Ekspresi Beta Amyloid otak kecil kelompok kontrol negatif
- B = Ekspresi Beta Amyloid otak kecil kelompok kontrol positif iskemik reperfusi 1 jam
- C = Ekspresi Beta Amyloid otak kecil kelompok kontrol positif iskemik reperfusi 72 jam
- D = Ekspresi Beta Amyloid otak kecil kelompok terapi antosianin iskemik reperfusi 24 jam
- E = Ekspresi Beta Amyloid otak kecil kelompok terapi antosianin iskemik reperfusi 72 Jam

Pengukuran jumlah persentase ekspresi Beta Amyloid secara imunohistokimia dilakukan menggunakan immunorasio ImageJ. Pengukuran dilakukan pada perbesaran 400 kali yang dilakukan sebanyak 5 kali ulangan. Hasil

yang diperoleh diuji signifikansinya menggunakan one way anova dengan taraf signifikansi $<0,05$.

Tabel 5.2 Persentase Jumlah Ekspresi Beta Amyloid Pada Otak Kecil

Kelompok perlakuan	Rata-rata ekspresi Beta Amyloid (%)	Kenaikan ekspresi (%)	Penurunan ekspresi (%)
KN	$16,92 \pm 2,17^a$	-	-
K1	$32,82 \pm 3,66^b$	93,97	-
K2	$35,78 \pm 1,83^b$	111,47	-
T1	$20,68 \pm 1,32^a$	-	36,99
T2	$17,00 \pm 1,57^a$	-	48,20

Ket: notasi statistik yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan pada kelompok perlakuan ($p < 0,05$)

KN = Ekspresi Beta Amyloid otak kecil kelompok kontrol negatif

K1 = Ekspresi Beta Amyloid otak kecil kelompok kontrol positif iskemik reperfusi 1 jam

K2 = Ekspresi Beta Amyloid otak kecil kelompok kontrol positif iskemik reperfusi 72 jam

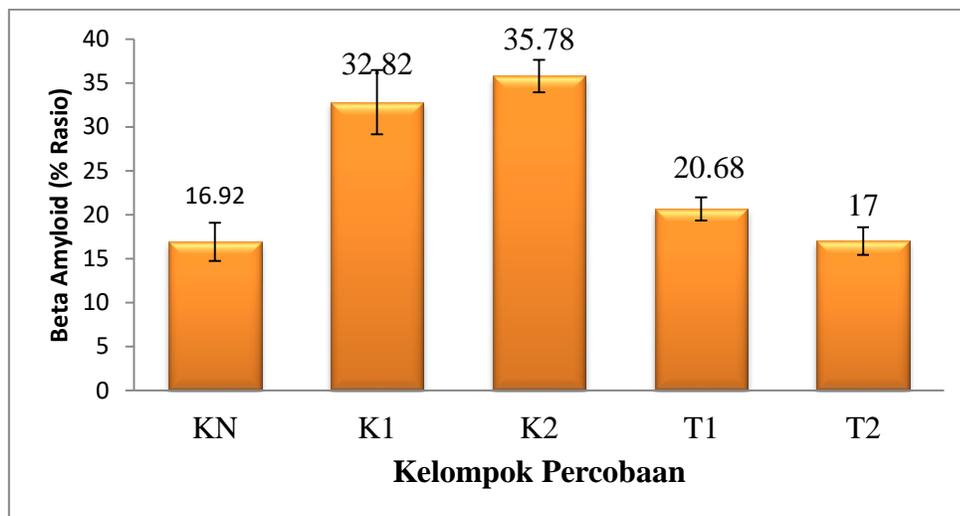
T1 = Ekspresi Beta Amyloid otak kecil kelompok terapi antosianin iskemik reperfusi 24 jam

T2 = Ekspresi Beta Amyloid otak kecil kelompok terapi antosianin iskemik reperfusi 72 Jam

Tabel 5.2 memperlihatkan jumlah persentase ekspresi Beta Amyloid pada kelompok perlakuan. Kelompok kontrol menunjukkan jumlah ekspresi rata-rata beta amyloid sebesar $16,92 \pm 2,17$. Dari data yang diperoleh menunjukkan bahwa pembentukan Beta Amyloid merupakan proses alami sel yang terjadi di dalam otak. Pada kondisi normal Beta Amyloid ini akan dihancurkan sehingga pembentukannya tidak mengakibatkan gangguan pada neuron. Adanya stres oksidatif yang dipicu oleh

iskemik reperfusi mengakibatkan enzim endogen tidak mampu menghancurkan hasil pembentukan Beta Amyloid dari protein precursor amyloid secara maksimal. Ketidakmampuan ini dapat mengakibatkan terakumulasinya Beta Amyloid yang dapat mengakibatkan kerusakan neuron. Hal ini dibuktikan dengan jumlah ekspresi Beta Amyloid pada 1 jam pertama dan 72 jam tanpa perlakuan apapun pasca reperfusi berturut-turut sebesar $32,82 \pm 3,66$ dan $35,78 \pm 1,83$. Kenaikan ekspresi Beta Amyloid pada 1 jam pertama mencapai 93,97% yang tidak berbeda secara signifikan terhadap kenaikan ekspresi Beta Amyloid pada 72 jam iskemik reperfusi. Namun, adanya peningkatan ini membuktikan bahwa radikal bebas yang terbentuk akibat iskemik reperfusi dapat meningkatkan ekspresi beta amyloid pada otak kecil tikus model stroke iskemik.

Pemberian antosianin ubi jalar ungu pada tikus terapi 24 jam dan 72 jam memperlihatkan adanya aktivitas antioksidan yang bekerja di dalamnya. A adanya aktivitas antioksidan dibuktikan dengan penurunan ekspresi Beta Amyloid yang cukup signifikan terhadap kelompok T1 dan T2. Pada kedua kelompok tersebut terjadi penurunan ekspresi Beta Amyloid sebesar 36,99% dan 48,20% dengan jumlah rata-rata persentase ekspresi Beta Amyloid berturut-turut sebesar $20,68 \pm 1,32$ dan $17,00 \pm 1,57$. Persentase jumlah rata-rata Beta Amyloid pada T1 dan T2 mendekati nilai pada kelompok kontrol. Dengan demikian, pemberian antosianin ubi jalar ungu mampu menurunkan pembentukan Beta Amyloid pada otak kecil tikus model stroke iskemik. **Gambar 5.3** memperlihatkan grafik penurunan ekspresi Beta Amyloid pada kelompok percobaan.



Gambar 5.3 Grafik Ekspresi Beta Amyloid pada otak kecil tikus stroke iskemik

KN = Kontrol Kontrol

K1 = Kelompok Kontrol Positif Iskemik Reperfusi 1 Jam

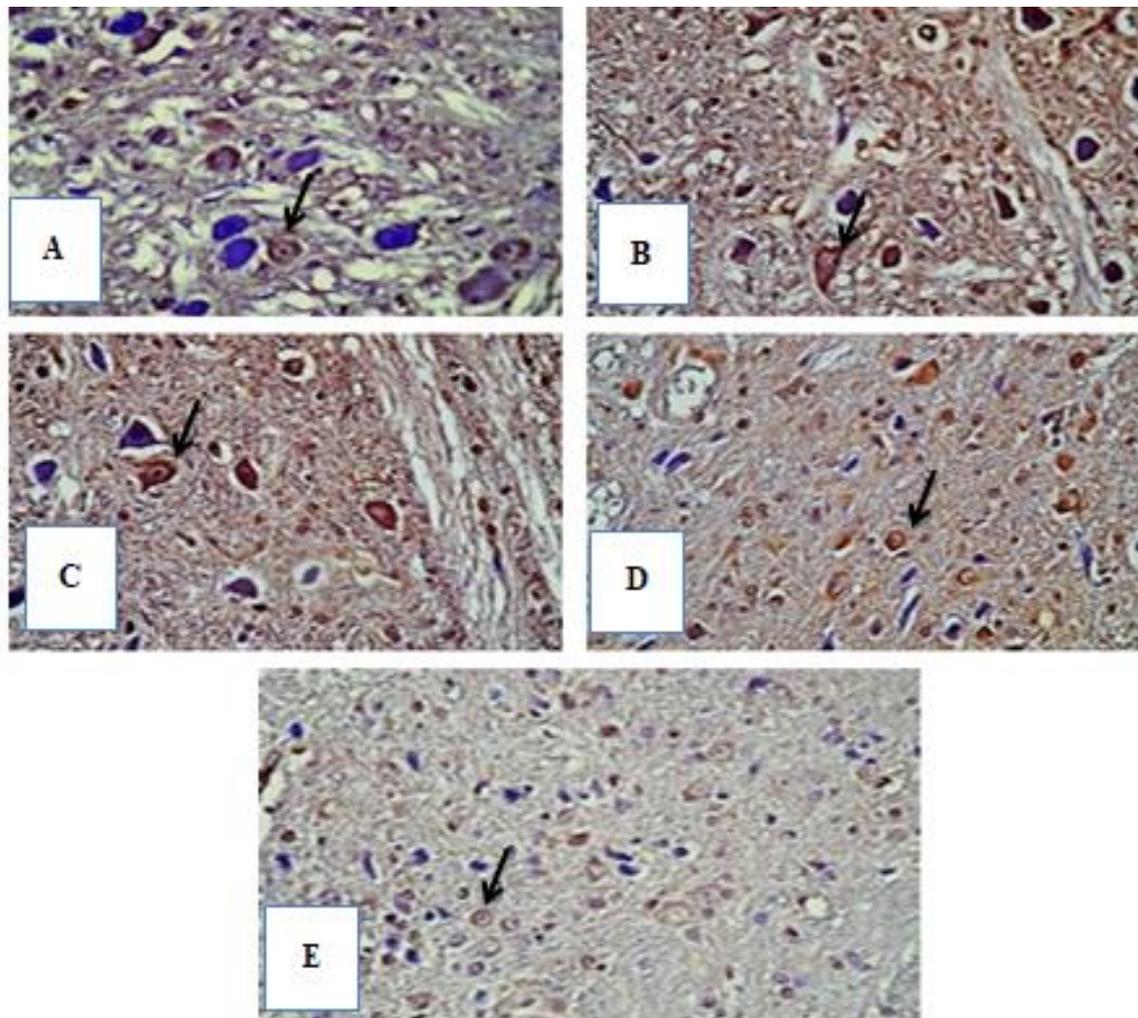
K2 = Kelompok Kontrol Positif Iskemik Reperfusi 24 Jam

T1 = Kelompok Terapi Iskemik Reperfusi 24 Jam

T2 = Kelompok Terapi Iskemik Reperfusi 72 Jam

5.3 Ekspresi VEGF pada Otak kecil Tikus Model Stroke Iskemik

Selama iskemik reperfusi berlangsung terjadi perubahan seluler yang signifikan pada sel. Suplai oksigen yang berkurang secara drastis mengakibatkan terekspresinya HIF-1 α yang berfungsi sebagai regulator homeostasis oksigen. Terekspresinya protein ini menginduksi pembentukan VEGF sebagai basis pertahanan terhadap kekurangan oksigen yang terjadi. VEGF yang terikat dengan reseptor VEGFR akan melakukan proliferasi, migrasi, dan pembentukan kapiler baru dari kapiler yang telah ada sebelumnya melalui aktivasi berbagai jalur sinyal seperti PI3K/Akt.



Gambar 5.4 Gambaran imunohistokimia VEGF pada otak kecil model stroke iskemik pada perbesaran 400x

Ket: Neuron yang berwarna coklat positif mengekspresikan VEGF

A = Ekspresi VEGF pada otak kecil kelompok kontrol negatif

B = Ekspresi VEGF pada otak kecil kelompok kontrol positif iskemik reperfusi 1 jam

C = Ekspresi VEGF pada otak kecil kelompok kontrol positif iskemik reperfusi 72 jam

D = Ekspresi VEGF pada otak kecil kelompok terapi antosianin iskemik reperfusi 24 jam

E = Ekspresi VEGF pada otak kecil kelompok terapi antosianin iskemik reperfusi 72 Jam

Pemeriksaan ekspresi VEGF dilakukan menggunakan teknik imunohistokimia yang didasarkan pada interaksi antigen-antibodi. **Gambar 5.4** memperlihatkan ekspresi VEGF yang terbentuk pada semua kelompok perlakuan. Ekspresi VEGF

pada otak kecil tikus stroke ditandai dengan pembentukan warna cokelat pada neuron. Warna cokelat dihasilkan dari kromogen DAB yang berfungsi untuk memvisualisasikan reaksi kompleks antigen dengan antibodi. Reaksi antigen antibodi bersifat sangat spesifik sehingga terjadinya reaksi silang dengan antigen yang lain dimungkinkan tidak akan terjadi. Oleh karena itu, berdasarkan hasil pengamatan menggunakan immunohistokimia menunjukkan terbentuknya ekspresi VEGF pada kelompok perlakuan yang diujikan.

Tabel 5.3 Persentase Jumlah ekspresi VEGF otak kecil pada kelompok perlakuan

Kelompok perlakuan	Rata-rata ekspresi VEGF (%)	Kenaikan ekspresi (%)	Penurunan ekspresi (%)
KN	26,6 ± 1.6 ^a	-	-
K1	43,9 ± 2.6 ^b	65,04	-
K2	44,8 ± 2.7 ^b	2,05	-
T1	70,2 ± 2.6 ^c	59,91	-
T2	53,5 ± 3.6 ^d	21,87	-

Ket: notasi statistik yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan pada kelompok perlakuan ($p < 0,05$)

KN = Ekspresi VEGF pada otak kecil kelompok kontrol negatif

K1 = Ekspresi VEGF pada otak kecil kelompok kontrol positif iskemik reperfusi 1 jam

K2 = Ekspresi VEGF pada otak kecil kelompok kontrol positif iskemik reperfusi 72 jam

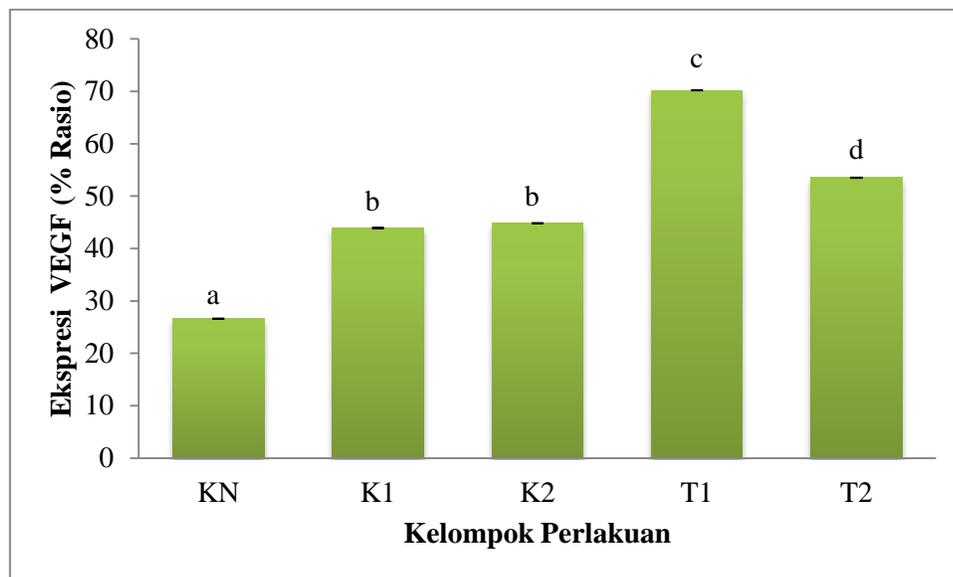
T1 = Ekspresi VEGF pada otak kecil kelompok terapi antosianin iskemik reperfusi 24 jam

T2 = Ekspresi VEGF pada otak kecil kelompok terapi antosianin iskemik reperfusi 72 Jam

Tabel 5.3 menunjukkan persentase perubahan ekspresi VEGF otak kecil pada kelompok perlakuan. Kelompok kontrol memperlihatkan adanya ekspresi VEGF pada

otak kecil dengan jumlah persentase sebesar $26,6 \pm 1,6$ dan pada 1 jam setelah iskemik reperfusi terjadi peningkatan ekspresi VEGF yang cukup signifikan sebesar 65,04% dibandingkan dengan kelompok kontrol negative. Peningkatan ekspresi VEGF dipicu oleh peningkatan HIF-1 α yang dirangsang oleh gangguan homeostasis oksigen. Data ini diperkuat dengan persentase ekspresi VEGF pada kelompok positif 72 jam sebesar $44,8 \pm 2,7$ meskipun mengalami peningkatan yang tidak signifikan yaitu sebesar 2,05%.

Ekspresi VEGF yang dibandingkan dengan kelompok kontrol positif memperlihatkan peningkatan ekspresi VEGF yang cukup signifikan pada kelompok terapi 24 jam sebesar 59,91 %. Pada kelompok terapi antosianin 72 jam menunjukkan peningkatan sebesar 21,87% dibandingkan dengan kontrol positif 1 jam. Namun, nilai ini mengalami penurunan dibandingkan dengan kelompok terapi 24 jam. Meskipun antosianin mampu meningkatkan ekspresi VEGF pada kelompok terapi 24 jam, namun ekspresi VEGF akan menurun pada 72 jam berikutnya. Ini menunjukkan bahwa antosianin ubi jalar ungu efektif pada 24 jam pasca iskemik reperfusi. **Gambar 5.5** memperlihatkan gambaran perubahan ekspresi VEGF otak kecil yang mengalami stroke iskemik.



Gambar 5.5 Grafik Ekspresi VEGF pada otak kecil tikus model stroke iskemik

KN = Kontrol Kontrol

K1 = Kelompok Kontrol Positif Iskemik Reperfusi 1 Jam

K2 = Kelompok Kontrol Positif Iskemik Reperfusi 24 Jam

T1 = Kelompok Terapi Iskemik Reperfusi 24 Jam

T2 = Kelompok Terapi Iskemik Reperfusi 72 Jam

5.4 Potensi Ekstrak Antosianin Terhadap Kadar BDNF Pada Otak kecil Tikus

Model Stroke Iskemik

BDNF merupakan neurotropin penting terhadap neurogenerasi otak seperti proliferasi, migrasi dan diferensiasi. Adanya protein ini memungkinkan otak tetap terjaga fungsi dan stabilitasnya. **Tabel 5.4** menunjukkan persentase perubahan kadar BDNF otak kecil yang dialami tikus stroke iskemik. Seperti yang diperlihatkan **Tabel 5.4** bahwa tikus kelompok normal (KN) menunjukkan adanya produksi BDNF pada otak kecil. Pemeriksaan menggunakan ELISA menunjukkan kadar BDNF otak kecil pada kelompok normal sebesar $402,04 \text{ pg/ml} \pm 31,36$. Namun, kelompok kontrol

positif 1 jam memperlihatkan penurunan kadar BDNF yang cukup signifikan sebesar 23,80%. Kadar BDNF pada kelompok ini sebesar 306.36 ± 41.01 . Ketika iskemik reperfusi berlangsung, terjadi peningkatan radikal bebas dan pelepasan glutamat yang berlebihan pada celah sinaps neuron. Pasca 1 jam iskemik reperfusi, kejadian yang terjadi di dalam sel lebih banyak berperan adalah protein proapoptotik yang dipicu oleh ledakan oksigen yang berakibat pada stres oksidatif sel. Akibatnya, kadar BDNF pada kelompok kontrol positif 1 jam menurun tajam. Namun, pada kelompok tikus kontrol positif 72 jam memperlihatkan peningkatan kadar BDNF yang cukup signifikan sebesar 30,98% dengan kadar sebesar $526,59 \text{ pg/mg} \pm 43.93$. Peningkatan kadar BDNF pada kelompok ini menunjukkan bahwa pasca iskemik reperfusi 72 jam otak secara alami akan menginduksi perbaikan jaringan otak. Selain itu, secara umum teknik MCAO yang dilakukan pada tikus mengakibatkan kerusakan pada area otak besar. Oleh karena otak kecil bukan merupakan daerah inti kerusakan, justru iskemik reperfusi merangsang terjadinya kenaikan BDNF pada otak kecil. Peningkatan BDNF juga diindikasikan karena BDNF tidak hanya dihasilkan oleh sel neuron tapi juga oleh sel non neuron seperti endotelial, mikroglia dan astrosit sehingga peningkatan BDNF sangat dimungkinkan untuk terjadi.

Tabel 5.4 Persentase Perubahan Kadar BDNF Otak Kecil

Kelompok perlakuan	Rata-rata kadar BDNF (pg/mg)	Kenaikan Kadar (%)	Penurunan Kadar (%)
KN	402,04 ± 31,36 ^a	-	-
K1	306,36 ± 41,01 ^b	-	23,80
K2	526,60 ± 43,93 ^a	30,98	-
T1	881,82 ± 51,76 ^c	187,84	-
T2	1029,54 ± 5,58 ^d	326,05	-

Ket: notasi statistik yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan pada kelompok perlakuan ($p < 0,05$)

KN = Ekspresi BDNF otak kecil kelompok kontrol negatif

K1 = Ekspresi BDNF otak kecil kelompok kontrol positif iskemik reperfusi 1 jam

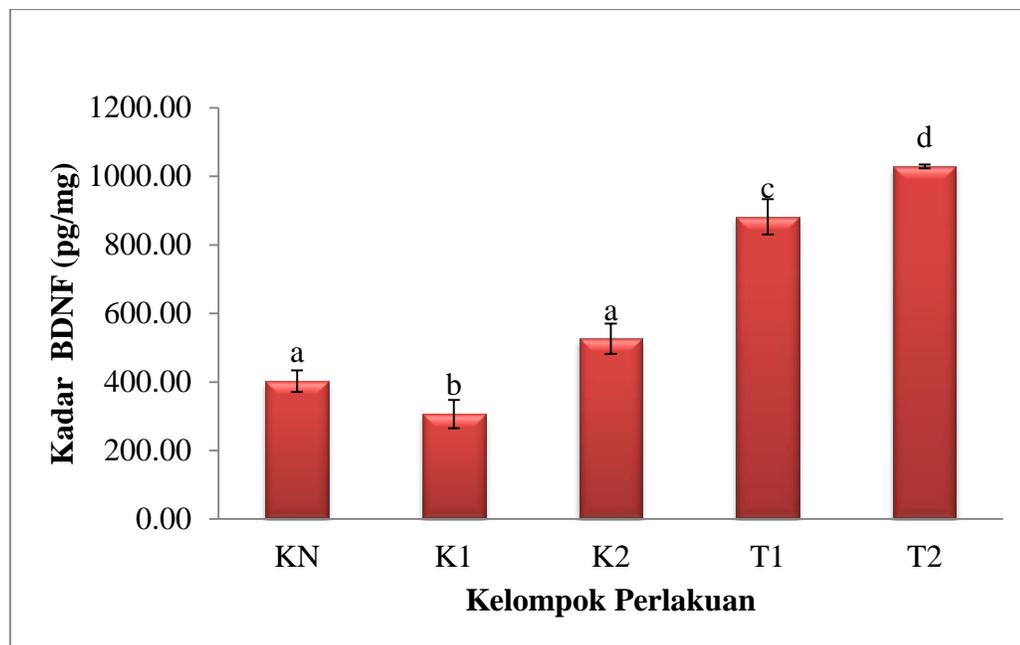
K2 = Ekspresi BDNF otak kecil kelompok kontrol positif iskemik reperfusi 72 jam

T1 = Ekspresi BDNF otak kecil kelompok terapi antosianin iskemik reperfusi 24 jam

T2 = Ekspresi BDNF otak kecil kelompok terapi antosianin iskemik reperfusi 72 Jam

Kelompok T1 merupakan kelompok yang mendapatkan terapi selama 24 jam. Bahan terapi yang diberikan berupa ekstrak antosianin ubi jalar ungu. Kelompok terapi 24 jam menunjukkan peningkatan kadar BDNF yang cukup signifikan sebesar 187,84% dibandingkan dengan kelompok terapi kontrol positif 72 jam yang dipicu oleh perbaikan otak secara alami. Dari hasil perolehan kadar BDNF sebesar 881,81 pg/mg ± 51,76 pada kelompok T1 diketahui bahwa pemberian ekstrak antosianin mampu meningkatkan produksi BDNF pada otak kecil. Antosianin memiliki aktivitas antioksidan yang dapat menekan efek peningkatan radikal bebas berlebih pada awal iskemik reperfusi. Antosianin memiliki ikatan rangkap terkonjugasi dan gugus fenolik yang membuat antosianin mampu menetralkan

reaktivitas radikal bebas. Selain itu, antosianin mampu memperbaiki kerusakan sel melalui modifikasi jalur signaling yaitu pada proses fosforilasi protein.. Hal ini diperkuat oleh kadar BDNF pada kelompok terapi 72 jam dimana pada kelompok ini terjadi peningkatan BDNF yang cukup signifikan yaitu sebesar 326,05% dengan kadar BDNF $1029,54 \text{ pg/mg} \pm 5,58$. Oleh karena itu, antosianin ubi jalar ungu dapat dijadikan sebagai bahan terapi untuk penyakit stroke yang dipicu oleh peningkatan radikal bebas. Gambar 5.5 memperlihatkan grafik perubahan kadar BDNF otak kecil pada kelompok perlakuan yang mengalami stroke iskemik.



Gambar 5.6 Grafik Kadar BDNF pada otak kecil tikus model stroke iskemik

KN = Kontrol Kontrol

K1 = Kelompok Kontrol Positif Iskemik Reperfusi 1 Jam

K2 = Kelompok Kontrol Positif Iskemik Reperfusi 24 Jam

T1 = Kelompok Terapi Iskemik Reperfusi 24 Jam

T2 = Kelompok Terapi Iskemik Reperfusi 72 Jam

5.5 Korelasi Eksresi Beta Amyloid, Ekspresi VEGF dan Kadar BDNF Terhadap Potensi Antosianin Ubi Jalar Ungu Pada Otak kecil Tikus Model Stroke Iskemik

Antosianin ubi jalar ungu mampu menekan produksi radikal bebas akibat iskemik reperfusi dengan cara mendonorkan elektron yang dimilikinya sehingga membentuk molekul yang netral. Pemberian ekstrak antosianin ubi jalar ungu pada tikus model stroke iskemik berpengaruh secara signifikan terhadap perbaikan otak kecil. Efektivitas antosianin ubi jalar ungu dapat diamati berdasarkan ekspresi Beta Amyloid dan ekspresi VEGF serta kadar BDNF. Berdasarkan pada pengamatan terhadap ketiga parameter tersebut terjadi perbaikan jaringan sel pada otak kecil setelah pemberian ekstrak antosianin ubi jalar ungu.

Pembentukan radikal bebas yang berlebihan berkorelasi positif dengan pembentukan Beta Amyloid. Hal ini ditandai dengan peningkatan ekspresi Beta Amyloid pada kelompok stroke iskemik 1 jam (K1) dan kelompok stroke iskemik 72 jam (K2). Sementara itu, ekspresi VEGF meningkat pada kelompok K1 dan tidak berbeda secara nyata dengan K2. Hal ini hampir sama dengan kadar BDNF dimana pada K2 terjadi kenaikan yang cukup signifikan. Adanya peningkatan ekspresi VEGF dan BDNF merupakan reaksi alami yang terjadi pada otak sebagai respon proteksi terhadap perubahan seluler yang terjadi. Selain itu, pengamatan yang dilakukan adalah pada otak kecil dimana daerah ini tidak terpengaruh secara langsung teknik MCAO yang diberikan. Namun, peningkatan ekspresi VEGF dan kadar BDNF menjadi tanda bahwa stroke iskemik mampu memicu aktivasi sistem pertahanan otak

Berdasarkan hasil pengukuran baik ekspresi Beta Amyloid, ekspresi VEGF maupun kadar BDNF pada kelompok terapi memperlihatkan adanya potensi

antosianin sebagai agen terapi stroke iskemik. Secara umum hasil pengamatan memperlihatkan penurunan ekspresi Beta Amyloid dan peningkatan ekspresi VEGF dan kadar BDNF pada kelompok T1 dan T2 yang diberi terapi antosianin.

Pembentukan BDNF mampu menghambat aktivasi sinyal kematian yang memprogram kematian sel. Selain itu, meskipun a Beta Amyloid yang terbentuk akibat tingginya produksi radikal bebas mampu menghambat angiogenesis, namun pemberian antosianin mampu menangkal radikal bebas sehingga dapat menurunkan ekspresi Beta Amyloid dan meningkatkan ekspresi VEGF pada otak kecil stroke iskemik.