

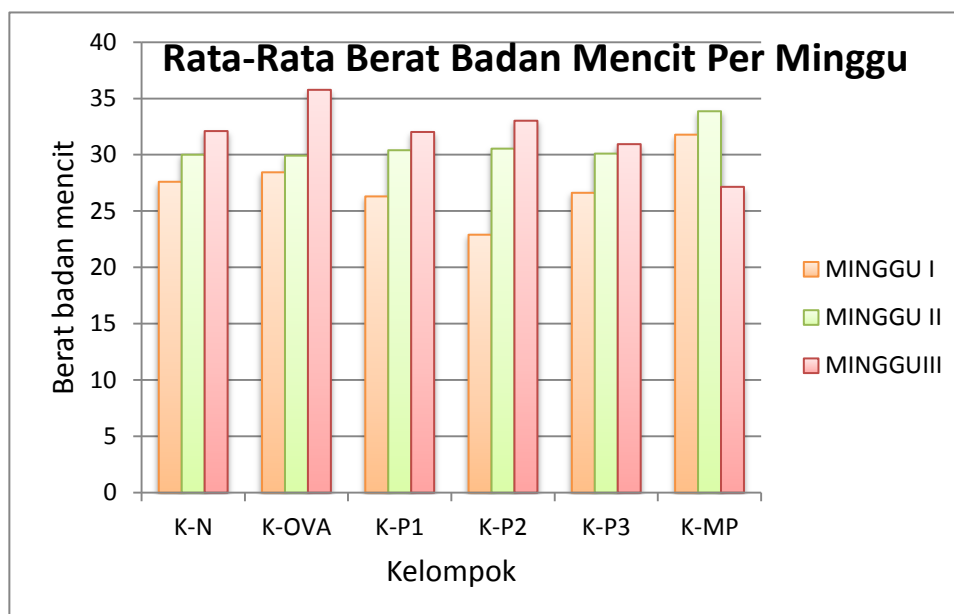
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian efek ekstrak etanol buah *Citrullus lanatus* terhadap jumlah sel goblet duodenum mencit BALB/c diinduksi OVA berhasil dilakukan. Penelitian diawali dengan menentukan subjek penelitian. Penelitian ini menggunakan 30 ekor mencit galur BALB/c jantan berusia 8 minggu dengan berat badan \pm 20 gram yang diperoleh dari UPHP (Unit Pengelolaan Hewan Percobaan) UGM. Mencit galur BALB/c dipilih karena mencit ini memiliki respon imunologi yang mudah diamati (Wahidah, 2010). Mencit jantan dipilih karena mencit jantan tidak mempunyai hormon estrogen, jika ada jumlahnya pun relatif sedikit serta kondisi hormonal pada mencit jantan lebih stabil jika dibandingkan dengan mencit betina karena pada mencit betina mengalami perubahan hormonal pada masa-masa estrus, masa menyusui, dan kehamilan dimana kondisi tersebut dapat mempengaruhi kondisi psikologis hewan uji tersebut. Tingkat stress pada mencit betina lebih tinggi dibandingkan dengan mencit jantan yang mungkin dapat mengganggu penelitian (Muhtadi *et al.*, 2014).

Setelah mendapatkan mencit sesuai kriteria dilakukan adaptasi selama 1 minggu, dipelihara dalam kondisi kandang dan pencahayaan yang sama, diberi pakan standar BR I dan minum akuades. Tujuan dilakukannya adaptasi yaitu agar mencit tidak stres dan terbiasa dengan tempat tinggal yang baru.

Selama penelitian, dilakukan penimbangan mencit setiap minggu untuk mengetahui perkembangan berat badan. Tujuan penimbangan mencit untuk menyesuaikan pemberian dosis ekstrak etanol buah *Citullus lanatus* dan Metilprednisolon. Hasil dari penimbangan berat badan mencit secara umum mengalami peningkatan dan dapat dilihat pada Gambar 8 atau Lampiran 4.



Gambar 8. Grafik Rata-Rata Berat Badan Mencit tiap Kelompok per-Minggu

Pada gambar grafik di atas menjelaskan bahwa berat badan mencit mengalami peningkatan perminggunya seiring dengan bertambahnya usia mencit. Bertambahnya berat badan secara normal menandakan mencit yang digunakan dalam percobaan ini sehat dan layak untuk digunakan sebagai hewan uji. Tetapi pada minggu ketiga berat badan mencit pada kelompok perlakuan yang diberi Metilprednisolon mengalami penurunan. Penurunan tersebut terjadi karena adanya efek samping dari Metilprednisolon.

Identifikasi taksonomi buah semangka yang dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada. Tujuan dari uji taksonomi ini untuk mencegah terjadinya kesalahan dalam pengambilan obyek uji. Hasil pengujian menunjukkan bahwa objek yang diidentifikasi benar yaitu *Citrullus lanatus*. Hasil uji taksonomi dapat dilihat di Lampiran 3.

Pembuatan ekstrak etanol buah *Citrullus lanatus* didapatkan dari daging buah *Citrullus lanatus* matang. Daging buah ini kemudian dikeringkan dengan metode *freeze drying*. Metode *freeze drying* adalah salah satu metode pengeringan dengan suhu relative rendah. Metode ini dipilih karena jika diaplikasikan pada bahan pangan yang peka terhadap panas seperti buah *Citrullus lanatus* maka bahan tersebut akan utuh dan tidak rusak. *Freeze drying* merupakan metode pengawetan makanan yang memberi hasil tahan lama pada aroma dan rasa makanan, serta memiliki sifat rehidrasi yang lebih baik jika dibandingkan dengan metode pengeringan lainnya (Pujihastuti, 2009).

Setelah dikeringkan dengan metode *freeze drying*, daging buah *Citrullus lanatus* dibuat menjadi simplisia atau bubuk yang kemudian dimaserasi menggunakan etanol 80% dan diuapkan hingga didapatkan ekstrak kental buah *Citrullus lanatus*. Etanol 80% merupakan pelarut semi polar yang biasa digunakan untuk mengekstrak senyawa aktif yang ada pada hancuran buah. Etanol digunakan sebagai pelarut karena mampu melarutkan sejumlah besar senyawa organik baik yang bersifat polar, semi polar, maupun non polar. Titik

didih etanol relatif rendah (64.5 °C) sehingga mudah diuapkan (Hidayat , 2015; Tanaya *et al.* 2015). Sebanyak 10 kg buah *Citrullus lanatus* menghasilkan ekstrak etanol *Citrullus lanatus* sebesar 136,01 gram. Jadi rendemen ekstrak etanol *Citrullus lanatus* sebesar 1,3%.

Ekstrak etanol *Citrullus lanatus* diberikan pada mencit secara peroral menggunakan sonde dengan dosis 175 mg/kgbb/hari, 350 mg/kgbb/hari, dan 700 mg/kgbb/hari selama 28 hari berturut-turut. Dosis ekstrak tersebut didapatkan dari konversi dosis ekstrak pepaya yang memberikan efek hepatoproteksi pada tikus (Kantham, 2009). Buah *Cacica papaya L.* segar mengandung flavonoid sebesar 57.80 ± 2.11 mg rutin/ 100g berat kering (Asmah, 2012). Buah *Citrullus lanatus* segar mengandung flavonoid sebesar 58.10 ± 0.33 mg/ 100g (Johnson *et al.*, 2012). Berdasarkan perhitungan, jumlah kandungan flavonoid pada kedua buah tersebut hampir sama, maka konversi tersebut bisa dilakukan. Konversi dosis dapat dilihat pada Lampiran 5.

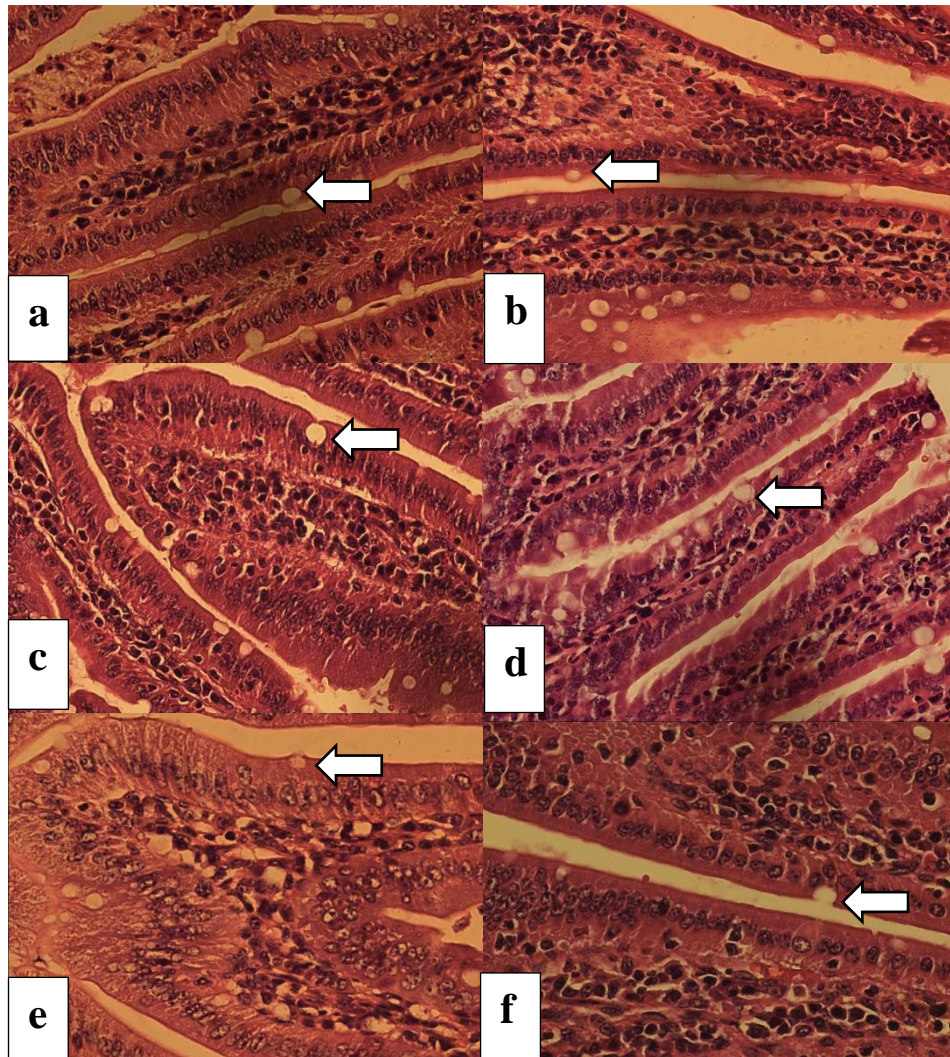
K-MP diberi Metilprednisolon peroral dengan dosis 0,13mg/mencit/hari selama 28 hari berturut-turut. Prednisolon mempunyai efek glukokortikoid yang dominan dan merupakan golongan kortikosteroid oral yang paling sering digunakan. Kortikosteroid digunakan karena obat tersebut mudah ditemukan serta penggunaan klinik yang luas (Novia, 2015). Perhitungan dosis dapat dilihat pada Lampiran 5.

Untuk memicu respon inflamasi, mencit disensitisasi dengan OVA. OVA sebanyak 2,5 mg dilarutkan pada 7,75 ml natrium klorida dan kemudian

disensitisasi secara intraperitoneal dengan dosis 0,15 ml/mencit pada hari ke-15 dan hari ke-22. Tujuan OVA disensitisasi secara intraperitoneal agar OVA lebih cepat diserap tubuh dan menghasilkan imunitas yang lebih cepat (Geniosa, 2015). Sensitivitas OVA melalui intraperitoneal lebih menguntungkan dalam hal ketepatan dosis dan dan pemberian tidak perlu dilakukan setiap hari (Kartikawati, 2003). Sensitisasi berikutnya pada hari ke-23 sampai dengan hari ke-28 mencit dipapar peroral dengan 0.15 ml/mencit OVA dalam akuades dibuat dari 2.5 mg OVA dalam 7,75 ml akuades. Tujuan pemberian secara peroral yaitu agar dihasilkan imunitas sistemik (Asifa, 2015).

Pembedahan mencit dilakukan 24 jam setelah paparan OVA terakhir. Organ duodenum diambil dan dimasukkan dalam formalin 10%, kemudian dibuat preparat histologi di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Gadjah Mada. Preparat yang sudah siap lalu diwarnai dengan *Hematoxylin-Eosin* (HE). Hasil pewarnaan memperlihatkan bahwa inti sel berwarna biru sedangkan sitoplasma dan jaringan disekitarnya berwarna merah muda sampai merah. Proses pembiruan dalam hematoksilin akan merubah warna merah kecoklatan dari hematoksilin menjadi biru kehitaman, lalu akan terlihat lebih jelas setelah dilakukan *counter stain* dengan eosin yang berwarna merah menjadi merah muda (Muntiha, 2001).

Pengamatan jumlah sel goblet duodenum mencit untuk menilai inflamasi mencit dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Setelah itu dilanjutkan dengan analisis data.



Gambar 9. Histologi mukosa duodenum mencit potongan membujur dengan perwarnaan HE perbesaran 400x pada: a. Kelompok normal (K-N), b. Kelompok kontrol negatif (K-OVA), c. Kelompok ekstrak 175 mg/kgbb (K-P1), d. Kelompok ekstrak dosis 350 mg/kgbb (K-P2), e. Kelompok ekstrak dosis 700 mg/kgbb, f. Kelompok kontrol positif (K-MP). Keterangan: Sel goblet ditunjukkan dengan tanda panah.

Penilaian Efek antiinflamasi ekstrak *Citrullus lanatus* dengan cara menghitung rata-rata jumlah sel goblet tiap 100 sel epitel pada 20 vili duodenum di sepuluh lapang pandang (Bergstrom *et al.*, 2008). Perhitungan dilakukan dengan menggunakan *hand counters* sebanyak 2 kali ulangan. Rata-rata jumlah sel goblet pada duodenum dapat dilihat pada Tabel 1.

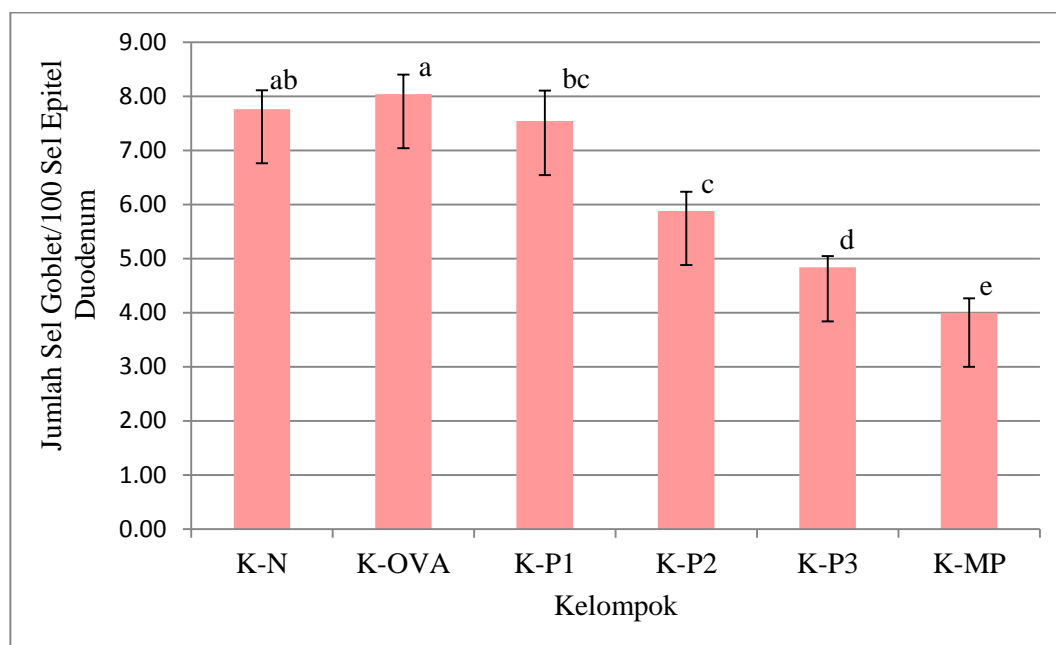
Tabel 1. Rata-rata jumlah sel goblet/100 sel epitel duodenum mencit ($\bar{x} \pm SE$) pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah 28 hari

| No. | Kelompok | Rata-rata \pm SE |
|-----|---|---------------------------------|
| 1 | Kontrol Normal (K-N) | 7,760 \pm 0,349 ^{ab} |
| 2 | Kontrol Negatif (K-OVA) | 8,040 \pm 0,360 ^a |
| 3 | Ekstrak <i>C. lanatus</i> 175mg/kgbb (K-P1) | 7,540 \pm 0,566 ^{bc} |
| 4 | Ekstrak <i>C. lanatus</i> 350mg/kgbb (K-P2) | 5,880 \pm 0,352 ^c |
| 5 | Ekstrak <i>C. lanatus</i> 700mg/kgbb (K-P3) | 4,840 \pm 0,203 ^d |
| 6 | Kontrol Positif (K-MP) | 4,000 \pm 0,262 ^e |

Keterangan : SE = Standar Error, ^{a, b, c, d, e}: angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda yang nyata antar kelompoknya.

Pada Tabel 1 didapatkan rata-rata jumlah sel goblet/100 epitel tertinggi pada K-OVA 8,040 \pm 0,360 dan rata-rata jumlah sel goblet/100 epitel terendah pada K-MP sebesar 4000 \pm 0,262. Semakin tinggi dosis ekstrak *Citrullus lanatus* yang diberikan maka jumlah sel goblet/100 sel epitel yang didapatkan semakin rendah. Kemudian dilakukan uji normalitas untuk mengetahui persebaran datanya. Penelitian ini menggunakan uji normalitas dengan metode analisis *Shapiro Wilk* karena jumlah sampel yang digunakan ≤ 50 . Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa hanya K-N yang memiliki nilai $p=0.114$ ($p>0.05$) yang berarti distribusi datanya normal, sedangkan kelompok lainnya memiliki nilai $p<0.05$ yang berarti distribusi datanya tidak normal. Sehingga dapat disimpulkan hasil dominan dari semua kelompok distribusi datanya tidak normal. Pada uji homogenitas varians didapatkan hasil $P=0.00$ ($p<0.05$), menunjukkan bahwa data memiliki perbedaan varian secara bermakna. Data memiliki distribusi tidak normal dan varian yang berbeda maka tidak memenuhi syarat uji parametrik. Uji statistik yang dipilih adalah uji non

parametrik *Kruskal-Wallis*. Hasil uji *Kruskal-Wallis* didapatkan $p=0.00$ ($p<0.05$) berarti rata-rata jumlah sel goblet/100 sel epitel pada keenam kelompok perlakuan memiliki perbedaan signifikan. Kemudian dilakukan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui kelompok mana dari keenam kelompok tersebut yang memiliki perbedaan.



Gambar 10. Grafik rata-rata jumlah sel goblet/100 epitel tiap kelompok menunjukkan perbedaan. Keterangan: ^{a, b, c, d, e}: angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda yang nyata antar kelompoknya.

Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa K-N tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan K-OVA dan K-P1. Sedangkan antara K-OVA dengan K-P1 menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0.05$). K-N tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan K-OVA menjelaskan bahwa kadar OVA yang disensitisasi kurang bisa memicu respon inflamasi mencit BALB/c sehingga hasil rata-rata jumlah sel goblet/100 sel epitel hampir sama dengan rata-rata jumlah sel goblet/100 sel epitel pada K-N. Hasil pengujian K-

P1 dengan K-P2 menunjukkan nilai $p=0.066$ ($p>0.05$) sehingga kedua kelompok ini tidak memiliki perbedaan rata-rata jumlah sel goblet/100 sel epitel yang signifikan.

Radang merupakan mekanisme pertahanan tubuh yang disebabkan adanya respon jaringan terhadap pengaruh-pengaruh yang merusak seperti noksi fisika, kimia, bakteri, parasit, dan sebagainya. (Mutschler, 1991 dalam Mansjoer, 2003). Proses radang diawali dengan dilatasi dan peningkatan permeabilitas kapiler di sekitar jaringan. Volume darah yang membawa leukosit ke daerah radang bertambah disertai gejala klinis berupa rasa panas dan kemerah-merahan. Kemudian aliran darah menjadi lebih lambat, leukosit beragregasi di sepanjang dinding pembuluh darah menyebabkan pembuluh darah kehilangan tekstur. Permeabilitas kapiler yang ditingkatkan oleh histamine, serotonin, bradikinin, sistem pembekuan dan komplemen dapat disebabkan oleh kontraksi sel-sel endotel sehingga menimbulkan celah membrane. Plasma darah setelah melewati dinding pembuluh darah yang permeabel (limfe radang) dan leukosit secara bersamaan membentuk eksudat radang yang menimbulkan pembengkakan jaringan. Pembengkakan jaringan akan menekan serabut syaraf yang mengakibatkan rasa sakit. Selain itu rasa sakit juga dapat disebabkan bradikinin dan prostaglandin. (Korolkovas, 1988 dan Boyd, 1971 dalam Mansjoer, 2003).

Peradangan pada saluran cerna terjadi karena adanya gangguan homeostasis pada mukosa karena ketidakseimbangan antara lapisan musin, sel-sel epitel, mikrobiota, dan kekebalan tubuh yang mengakibatkan kelainan

pembatas musin dengan meningkatnya permeabilitas (Lievin-Le dan Servin, 2006; McGuckin *et al.*, 2009 dalam Kim dan Khan, 2013). Lapisan musin yang melapisi epitel disekresikan oleh sel-sel goblet yang berfungsi untuk membersihkan isi saluran cerna dan memberikan pertahanan lini pertama terhadap cedera fisik dan kimia yang disebabkan oleh makanan, mikroba, dan produk mikroba. Oleh karena itu apabila terjadi radang maka jumlah sel goblet akan meningkat untuk menghasilkan musin yang lebih banyak (Lievin-Le dan Servin, 2006; Dharmani *et al.*, 2009 dalam Kim dan Khan, 2013).

Selain berfungsi sebagai pelindungi epitel, mucus memiliki permeabilitas terhadap bahan dengan berat molekul rendah dan hal ini penting untuk menyerap nutrisi. Mucus pada usus sangat terhidrasi sehingga dapat berperan untuk melawan iritan endogen, eksogen dan invasi mikroba. Mucus mengandung sebagai komponen utama glikoprotein dengan berat molekul besar yang dikenal sebagai mucins yang dihasilkan oleh sel goblet melalui lapisan epitel (Hollingsworth dan Swanson, 2004 dalam Kim dan Khan, 2013). Mucin adalah polimer kunci, viskoelastik yang bergabung dengan air, ion, dan immunoglobulin A (IgA) dan peptida anti-mikroba menjadi mucus yang memfasilitasi pembersihan saluran pencernaan dari patogen (Kim dan Khan, 2013).

Setelah disintesis oleh sel goblet, musin diubah menjadi bentuk granul dan diangkut ke permukaan sel kemudian disekresi ke lumen. Mucin disekresikan oleh dua jalur yaitu sekresi terus menerus dalam jumlah rendah dan sekresi yang disebabkan oleh adanya stimulus eksternal seperti

neuropeptida, sitokin atau lipid tertentu (Dharmani *et al.*, 2009 dalam Kim dan Khan, 2013). Hasil penelitian oleh Khan dan Collins (2004) menunjukkan bahwa pengobatan tikus satu hari sebelum infeksi dengan dosis tunggal antibodi anti-CD4 secara signifikan mengurangi produksi jumlah mukus pada usus.

K-MP menunjukkan rata-rata jumlah sel goblet/100 epitel terendah. Dosis metilprednisolon yang direkomendasikan adalah 40-60mg, maka didapatkan dosis untuk mencit 0,13mg/mencit (Saputri, 2010). Metilprednisolon dapat digunakan sebagai obat antiradang (antiinflamasi), immunosupresi dalam proses alergi, pengatur metabolisme protein dan karbohidrat, mempengaruhi kadar natrium dalam darah, dan lain-lain (Novia, 2015). Metilprednisolon bekerja seperti glukokortikoid lainnya yang memiliki efek immunosupresif dan efek antiinflamasi cukup poten (Arozal *et al.*, 2005). Glukokortikoid menekan proses inflamasi dengan membentuk *phospholipase inhibitor lipocortin*, yang bekerja menekan produksi asam arakidonat yang penting untuk pembentukan prostaglandin dan leukotrien. Hal ini akan menekan proses inflamasi melalui penghambatan permeabilitas kapiler, edema, migrasi sel leukosit, proliferasi kapiler, fibroblas, dan deposit kolagen (Setiawan *et al.*, 2014).

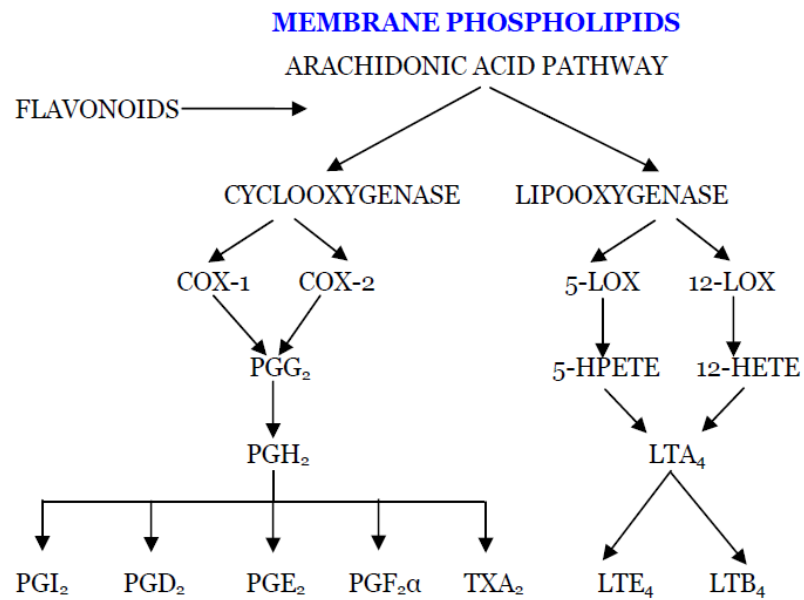
Paparan metilprednisolon yang dilakukan dalam 28 hari membuat dua ekor mencit mati di akhir penelitian. Hal ini dapat disebabkan oleh penurunan daya tahan tubuh mencit terhadap efek immunosupresinya. Penggunaan jangka panjang Metilprednisolon oral dapat dikaitkan dengan efek samping berupa

atrofi otot, osteoporosis, *moon face*, *buffalo hump*, lemak ekstremitas berkurang, gangguan reabsorpsi Na^+ serta sekresi K^+ dan H^+ di ginjal, gangguan absorpsi Ca^{2+} di usus, dan gangguan neuropsikiatri (Sudir, 2007). Pemberian immunosupresan dapat menekan proliferasi sel goblet bahkan lebih rendah daripada mencit normal. Pada penelitian Luperchio (2001) dalam Bergstrom *et al* (2008) menunjukkan adanya penurunan proliferasi sel goblet pada kondisi infeksi bakteri di saluran pencernaan, sedangkan pada penelitian Hashimoto *et al* (2008) menunjukkan adanya hiperplasia sel goblet pada alergi dan invasi cacing di saluran pencernaan.

Sel goblet berperan dalam melindungi saluran cerna dengan mensintesis dan mensekresikan beberapa mediator seperti gen MUC2 dan *trefoil factor 3* (Tff3) (Moncada *et al.*, 2003 dalam Bergstrom *et al.*, 2008). Keberadaan MUC2 dalam menghasilkan musin penting dalam menjaga homeostasis mukosa tubuh, mencegah perlekatan pathogen enterik serta menekan pertumbuhan tumor (Bergstrom *et al.*, 2008). Selain itu, *trefoil factor 3* (Tff3) memainkan peran penting dalam penyembuhan luka dan bersinergi dengan mucin saluran cerna untuk meningkatkan sifat pelindung dari lapisan lendir terhadap racun bakteri (Mashimo *et al.*, 1996 dalam Bergstrom *et al.*, 2008).

Pemberian ekstrak etanol *Citrullus lanatus* dosis 175 mg/kgbb/hari terbukti dapat menurunkan rata-rata jumlah sel goblet/100 epitel. Hasil uji statistik menunjukkan kelompok ekstrak etanol *Citrullus lanatus* dosis 175 mg/kgbb memiliki rata-rata jumlah sel goblet/100 epitel yang tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol normal. Hal ini disebabkan karena

ekstrak tersebut mengandung flavonoid yang merupakan senyawa penting yang terkandung pada *Citrullus lanatus*. Sifat anti inflamasi dari flavonoid telah terbukti baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Kandungan flavonoid pada tumbuhan tidak hanya berefek meningkatkan sistem imun, namun juga menekan sistem imun apabila aktivitasnya berlebihan. Jika aktivitas sistem imun berkurang, maka flavonoid akan mengirimkan sinyal intraseluler pada reseptor sel untuk meningkatkan aktivitasnya. Sebaliknya jika sistem imun kerjanya berlebihan, maka tumbuhan itu berkhasiat dalam mengurangi kerja sistem imun tersebut (Suhirman dan Winarti 2010). Penurunan proliferasi sel goblet duodenum pada K-P2 dan K-P3 dibawah normal disebabkan karena tingginya kandungan flavonoid yang bisa menekan proliferasi sel goblet lebih redah. Terdapat 2 mekanisme flavonoid dalam menghambat terjadinya inflamasi. Pertama pada konsentrasi rendah senyawa flavonoid hanya memblok jalur lipooksigenase, sementara pada konsentrasi tinggi senyawa flavonoid dapat menghambat pelepasan asam arakidonat dan sekresi enzim lisosom dari sel netrofil dan sel endothelial (Landolfi, 1984 dalam Sabir, 2003). Berkurangnya ketersediaan substrat arakidonat bagi jalur siklooksigenase, jalur lipooksigenase, dan fosfolipase A2 karena hambatan tadi dapat menekan jumlah prostaglandin, prostasiklin, endoperoksida, leukotrin, NO (nitrit oksida), dan lain-lain sehingga proses inflamasi akan terhambat. Kedua menghambat fase proliferasi dan fase eksudasi dari proses inflamasi (Sabir, 2003).



Gambar 10. Mekanisme Kerja Flavonoid pada Inflamasi (Rang, 2007)

Penelitian Geniosa (2015) menyebutkan bahwa senyawa flavonoid pada buah *Carica papaya* L. dapat menurunkan jumlah sel goblet duodenum mencit BALB/c.