

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Gambaran Umum Penelitian**

Penelitian potensi ekstrak etanol daging buah semangka sebagai antiinflamasi melalui pengamatan ukuran tebal epitel duodenum mencit BALB/c telah berhasil dilakukan. Penelitian menggunakan 30 ekor mencit strain BALB/c berusia 8 minggu dengan berat  $\pm 20$  gram yang didapatkan dari Unit Pengelolaan Hewan Percobaan (UPHP) UGM. Mencit digunakan sebagai subyek dalam penelitian ini dengan pertimbangan harga murah, cepat berkembang biak, sifat anatomis dan fisiologis mirip dengan manusia (Pribadi, 2008).

Pemilihan jenis kelamin jantan berdasarkan pertimbangan bahwa mencit jantan tidak mempunyai hormon estrogen, walaupun ada hanya dalam jumlah yang relatif sedikit serta kondisi hormonal mencit jantan lebih stabil jika dibandingkan dengan mencit betina. Mencit betina mengalami perubahan kondisi hormonal pada masa-masa tertentu seperti pada masa siklus estrus, masa kehamilan dan menyusui yang dapat mempengaruhi kondisi psikologis mencit tersebut. Selain itu tingkat stress pada mencit betina lebih tinggi dibandingkan dengan mencit jantan yang mungkin dapat mengganggu pada saat pengujian (Ariyanti *et al*, 2007).

Mencit kemudian diaklimatisasi selama 1 minggu dan diberi pakan standar BR 1 dan minum akuades. Mencit kemudian dibagi menjadi 6 kelompok dengan menggunakan *simple random sampling*. Pemilihan *simple random sampling* bertujuan untuk memberikan peluang yang sama bagi setiap anggota populasi untuk menjadi sampel dan menghindari bisa dikarenakan variasi umur dan berat

badan meskipun telah dilakukan pemilihan hewan uji dengan usia dan berat badan yang relatif sama (Prinarbaningrum, 2015).

Jumlah anggota per kelompok ditentukan dengan rumus Federer sehingga didapatkan 5 ekor mencit setiap kelompok. Kelompok I merupakan kelompok normal yang tidak diberi perlakuan apapun (K-N), kelompok II diberikan Ovalbumin (K-OVA), kelompok III diberi Ovalbumin dan ekstrak etanol daging buah semangka dengan dosis 175 mg/kgbb/hari (K-P1), kelompok IV diberi Ovalbumin dan ekstrak etanol daging buah semangka dengan dosis 350 mg/kgbb/hari (K-P2), kelompok V diberi Ovalbumin dan ekstrak etanol daging buah semangka dengan dosis 700 mg/kgbb/hari (K-P3) dan Kelompok VI merupakan kelompok yang diberi Metilprednisolon (K-MP).

Tahap selanjutnya adalah pengujian taksonomi terhadap buah semangka di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada untuk menghindari kesalahan dalam pengambilan objek penelitian. Berdasarkan surat uji taksonomi nomor 0644/S.Tb/II/2015, hasil uji menunjukkan bahwa objek yang diuji benar *Citrullus lanatus*. Buah *Citrullus lanatus* yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah semangka yang berasal dari Kulon Progo.

Tahap selanjutnya adalah pembuatan ekstrak etanol buah *Citullus lanatus* yang dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada. Buah *Citrullus lanatus* yang telah lolos uji taksonomi kemudian dicuci hingga bersih kemudian dikupas dan diambil buahnya selanjutnya dibuat menjadi simplisia dengan cara di potong kecil-kecil kemudian dikeringkan dengan menggunakan mesin *freeze drying*. Setelah buah menjadi simplisia kemudian

dibuat menjadi ekstrak dengan menggunakan metode maserasi yaitu direndam dengan menggunakan pelarut etanol 80%. Pelarut etanol 80% digunakan karena etanol bersifat semipolar sehingga semua jenis flavonoid dapat terekstraksi. Selain itu Departemen Kesehatan Republik Indonesia hanya mengizinkan etanol dan air sebagai pelarut obat (Umar, 2008).

Ekstrak etanol *C. lanatus* tersebut diberikan pada mencit secara peroral dengan bantuan sonde dengan dosis 175 mg/kgbb/hari (K-P1), 350 mg/kgbb/hari (K-P2) dan 700 mg/kgbb/hari (K-P3) selama 28 hari. Dosis tersebut didapatkan dari konversi dosis ekstrak pepaya yang memberikan efek hepatoproteksi pada tikus (Kantham, 2009). Kandungan flavonoid yang terdapat dalam pepaya adalah sebesar  $57.70 \pm 2.11$  mg/100g berat kering. Kandungan flavonoid dalam pada buah semangka sebanyak  $58.10 \pm 0.33$  mg/100g (Johnson *et al.*, 2012). Kandungan flavonoid pada kedua buah tersebut hampir sama sehingga dilakukan konversi dosis dari ekstrak pepaya tersebut.

Pada kelompok kontrol (K-MP) diberikan obat Metilprednisolon. Metilprednisolon merupakan kortikosteroid dan antiinflamasi yang memiliki mekanisme kerja memodulasi metabolisme karbohidrat, protein, dan lipid serta pemeliharaan homeostasis cairan dan elektrolit. Kontrol atau mencegah peradangan dengan mengendalikan laju sintesis protein, menekan migrasi leukosit polimorfonuklear (PMN) dan fibroblast, membalikkan permeabilitas kapiler dan menstabilkan lisosom pada tingkat sel (Katzung, 2004).

Tahap selanjutnya adalah pembuatan mencit model alergi dengan cara pemberian Ovalbumin. Ovalbumin merupakan alergen utama yang terdapat pada putih telur (Subijanto, 2008). Ovalbumin diberikan pada hari ke 15 secara intraperitoneal dengan dosis 0,15 cc OVA dalam  $\text{Al}(\text{OH})_3$ /mencit dari 2,5 mg OVA yang dilarutkan pada 7,75 ml aluminium hidroksida dan pada hari ke 22 dengan dosis 0,15 cc OVA dalam akuades/mencit dari 2,5 mg OVA yang dilarutkan pada 10 ml akuades. Tujuan pemberian OVA secara intraperitoneal adalah agar lebih mudah diserap tubuh dan menghasilkan respon imun yang lebih cepat. Pada hari ke-23 hingga hari ke-28, mencit dipapar lagi peroral dengan 0,15 cc/mencit OVA dalam akuades dibuat dari 2,5 mg OVA dalam 2,5 ml akuades, dengan tujuan agar dihasilkan respon imun sistemik (Subijanto dan Prasetyo, 2008).

Pada hari ke-29 mencit dikorbankan dengan cara dimasukkan ke dalam toples yang berisi kloroform kemudian diambil organ duodenumnya dan direndam dalam formalin 10%. Organ duodenum yang sudah diambil kemudian dibuat preparat di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Gadjah Mada. Duodenum dipotong melintang pada dua ujungnya sepanjang 3 mm dan membujur sepanjang 10 mm kemudian ditanam dalam media parafin. Blok parafin yang mengandung jaringan kemudian dipotong dengan menggunakan mesin mikrotom dengan ketebalan berkisar 3-4  $\mu\text{m}$ . Potongan tersebut diletakkan secara hati-hati di atas permukaan air dalam *waterbath* bersuhu 46<sup>0</sup>C. Bentuk irisan dirapikan kemudian diletakkan di atas kaca obyek yang telah diolesi *Ewith* sebagai perekat. Preparat yang sudah siap lalu diwarnai dengan pewarnaan Hematoksilin dan 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 (Budiawan *et al.*, 2013).

Tahap terakhir adalah pengamatan preparat duodenum dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali sebanyak 4 lapang pandang untuk setiap preparat. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop dan Optilab untuk mengambil gambar preparat. Tahap selanjutnya adalah pengukuran tebal epitel duodenum dengan menggunakan aplikasi *Imageraster*. Setiap preparat diambil 4 lapang pandang dan dari setiap lapang pandang diukur tebal 4 sel epitel yang mewakili setiap kelompoknya (Sriwahyuni *et al.*, 2008).

## **B. Hasil Penelitian**

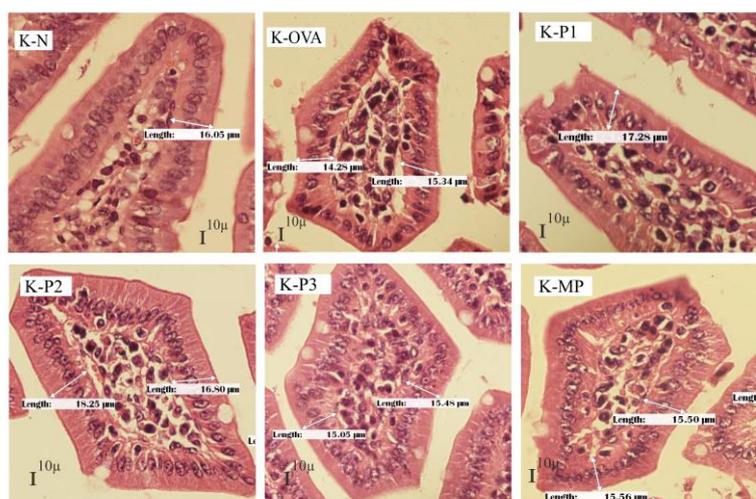
Kelompok Normal (K-N) yang tidak diberi perlakuan apapun memiliki tebal epitel paling tinggi yaitu  $20,02 \pm 3,50 \mu\text{m}$ . Kelompok yang hanya diberi Ovalbumin (K-OVA) memiliki tebal epitel paling rendah yaitu  $15,98 \pm 3,22 \mu\text{m}$ . Kelompok yang diberi ekstrak etanol *Citrullus lanatus* pada semua dosis mengalami penebalan dibandingkan dengan K-OVA dengan penebalan paling tinggi terjadi pada kelompok dengan dosis 350 mg/kgbb/hari (K-P2) dengan tebal  $19,03 \pm 4,47 \mu\text{m}$ . Pada kelompok dengan dosis 175 mg/kgbb/hari (K-P1) memiliki tebal epitel  $17,46 \pm 3,50 \mu\text{m}$  dan pada kelompok dengan dosis 700 mg/kgbb/hari (K-P3) memiliki tebal epitel  $17,17 \pm 3,58 \mu\text{m}$ . Kelompok kontrol

Metilprednisolon (K-MP) juga mengalami penebalan epitel yaitu  $18,44 \pm 3,03$   $\mu\text{m}$ .

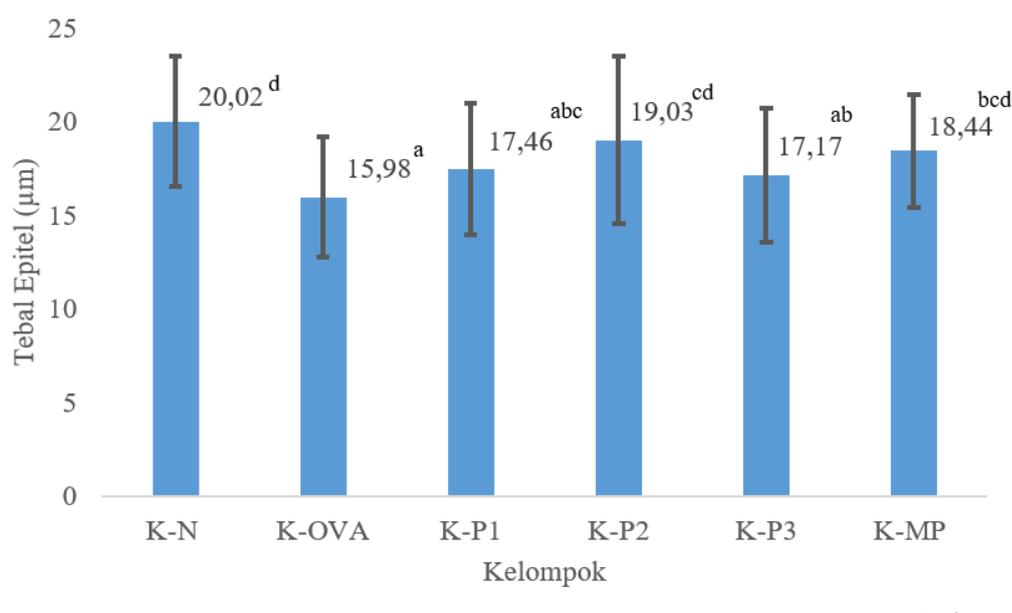
Tabel 1. Rata-rata tebal epitel duodenum ( $x \pm \text{SD}$ ) dalam satuan  $\mu\text{m}$  pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah 28 hari perlakuan.

No	Kelompok	Rata-rata $\pm$ SD ( $\mu\text{m}$ )
1	K-Normal	$20,02 \pm 3,50^{\text{d}}$
2	K-Ova	$15,98 \pm 3,22^{\text{a}}$
3	K-P1	$17,46 \pm 3,50^{\text{abc}}$
4	K-P2	$19,03 \pm 4,47^{\text{cd}}$
5	K-P3	$17,17 \pm 3,58^{\text{ab}}$
6	K-MP	$18,44 \pm 3,03^{\text{bcd}}$

Keterangan : SD: standar deviasi ; <sup>a,b</sup>:angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata antar kelompoknya.



Gambar 8. Histologi epitel duodenum mencit BALB/c dengan perwarnaan HE perbesaran 400x setelah 28 hari perlakuan pada K-N (Normal), K-OVA, Ekstrak Etanol *C. Lanatus* (EECL) 175, 350, 750 mg/kgbb/ hari dan K-MP (Metiprednisolon).



Gambar 9. Grafik rata-rata ketebalan epitel duodenum ( $\mu\text{m}$ ) pada masing-masing kelompok setelah 28 hari perlakuan; <sup>a,b</sup>:angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata antar kelompoknya.

Tebal epitel duodenum yang telah didapatkan kemudian di uji normalitas menggunakan *Kolmogorov Smirnov* dan didapatkan hasil data normal ( $p > 0,05$ ) dan uji homogenitas dengan hasil  $p < 0,05$  yang berarti data homogen sehingga syarat uji parametrik terpenuhi. Uji parametrik *One Way Anova* didapatkan nilai  $p = 0,00$  ( $p < 0,05$ ) menunjukkan bahwa rata-rata tebal epitel duodenum berbeda secara signifikan. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Tukey* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

K-P2 atau kelompok yang diberi ekstrak etanol *C. lanatus* dosis 350 mg/kgbb/hari menunjukkan tebal epitel yang tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol normal (K-N) dan kelompok kontrol K-MP (Metilprednisolon).

### C. Pembahasan

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek antiinflamasi dari ekstrak etanol *Citrullus lanatus*. Semua kelompok kecuali kelompok normal (K-N) dibuat alergi inflamasi dengan cara pemberian Ovalbumin secara intraperitoneal pada hari ke-15 dan ke-22 dilanjutkan dengan pemberian peroral pada hari ke 23 hingga 28. Pada kelompok yang hanya diberi Ovalbumin saja (K-OVA) didapatkan rata-rata tebal epitel paling rendah yaitu  $15,98 \pm 3,22 \mu\text{m}$ . Hal ini terjadi karena terjadi kerusakan pada epitel duodenum. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Prasetyo pada tahun 2008 yaitu paparan Ovalbumin kronik dapat meningkatkan derajat inflamasi pada duodenum mencit BALB/c.

Duodenum merupakan organ pencernaan yang menjadi tempat penyerapan pertama zat-zat nutrisi. Paparan zat-zat tertentu pada duodenum dapat berefek pada kerusakan epitel mukosa duodenum. Kerusakan epitel duodenum dapat didefenisikan dengan melihat kedalamannya yaitu berupa erosi mukosa dan ulserasi mukosa. Erosi mukosa merupakan hilangnya sebagian ketebalan mukosa, sedangkan ulserasi mukosa adalah hilangnya seluruh tebal mukosa dan sering menembus lapisan yang lebih dalam. Kerusakan juga bisa dikarenakan kurangnya produksi mukus oleh kelenjar Brunner yang terdapat di submukosa duodenum yang berfungsi sebagai pelindung mukosa, aktivasi kelenjar Brunner dihambat oleh stimulus simpatis yang meningkat pada keadaan stress kronik yang disebabkan paparan Ovalbumin (Wahab *et al.*, 2012).

Paparan Ovalbumin pada saluran pencernaan dapat menyebabkan terjadinya alergi atau hipersensitivitas tipe I. Alergi terjadi karena ketidakseimbangan hasil diferensiasi sel CD4<sup>+</sup> T yaitu Sel CD4<sup>+</sup> Th1 dan Sel CD4<sup>+</sup> Th2. Sel CD4<sup>+</sup> Th1 mensekresikan IFN $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ), TNF (*Tumor Necrosis Factor*) dan limfotoksin yang berperan dalam imunitas seluler, sedangkan sel CD4<sup>+</sup> Th2 mensekresikan interleukin-4 (IL-4), IL-5, IL-6, IL-10 dan IL-13, yang berperan penting dalam respon imun humoral. Pada alergi-inflamasi terjadi peningkatan sel CD4<sup>+</sup> Th2 dan terjadi supresi sel CD4<sup>+</sup> Th1. Pemaparan yang berulang dari OVA mampu meningkatkan sel limfosit CD4<sup>+</sup> untuk selanjutnya akan merangsang sel B untuk meningkatkan produksi Ig E. Ig E merupakan sitokin yang sangat berperan dalam perkembangan terjadinya reaksi alergi (Prasetyo *et al.*, 2008).

Sitokin yang dihasilkan oleh sel CD4<sup>+</sup> Th2 memicu produksi sel mast dan basofil. Interaksi antara alergen berulang dengan permukaan sel mast akan memicu terjadinya degranulasi sel mast, basofil dan eosinofil sehingga mediator inflamasi terlepas dan mengakibatkan terjadinya inflamasi (Baratawidjaja *et al.*, 2014; Subijanto, 2008). Salah satu sitokin yang dihasilkan adalah histamin. Tingginya kadar histamin ini akan meningkatkan tingkatan inflamasi pada mukosa usus. Pada keadaan ini terjadi ketidakseimbangan flora di usus, sebagai akibat terlepasnya mediator-mediator inflamasi, sehingga terjadi kerusakan sistem barrier mukosa usus (Prasetyo *et al.*, 2008).

Berbeda dengan di saluran pencernaan, paparan kronik Ovalbumin secara inhalasi pada saluran pernapasan mencit BALB/c menyebabkan alergi inflamasi

dan perubahan struktur saluran napas yang salah satunya berupa penebalan epitel saluran napas. Perubahan struktur saluran napas yang lain adalah hiperplasia sel goblet dan penebalan otot polos saluran napas. Jejas berulang yang disebabkan inflamasi saluran pernapasan mengakibatkan perpanjangan aktivasi *epithelial mesenchymal trophic unit* (EMTU) yang akan memicu perubahan struktur saluran napas. Penebalan epitel saluran pencernaan disebabkan karena terjadinya peningkatan regulasi dan hipersekresi musin keluarga MUC (MUC5B dan MUC5AC lebih dari tipe MUC2) yang dapat menyebabkan hiperplasia dan metaplasia sel mukous dan penebalan epitel (Barlianto, 2009).

Pemberian ekstrak etanol *Citrullus lanatus* pada dosis 175, 350 dan 700 mg/kgbb/hari dapat meningkatkan tebal epitel duodenum karena pada buah *Citrullus lanatus* memiliki metabolit sekunder salah satunya adalah flavonoid. Flavonoid merupakan kumpulan senyawa polifenol yang memiliki karakteristik dan susunan kimia yang beragam. Saat ini ada lebih dari 9000 jenis flavonoid yang ditemukan di dalam tanaman. Manfaat flavonoid sangat beragam salah satunya adalah sebagai agen antiinflamasi (Xiao *et al.*, 2011).

Mekanisme flavonoid sebagai antiinflamasi melalui berbagai jalur diantaranya adalah dengan aktivitas antioksidan yaitu *radical scavenging*, menghambat produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan menghambat enzim prooksidan sehingga menurunkan radikal bebas dan *lipidic peroxidation*. Mekanisme kedua adalah modulasi enzim proinflamasi yaitu asam arakidonat dan NO (*Nitric Oxide*) sehingga menurunkan mediator inflamasi seperti NO, leukotrien dan prostaglandin. Mekanisme ketiga adalah modulasi mediator

proinflamasi sehingga menurunkan sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan leukotrien. Mekanisme yang terakhir adalah dengan modulasi gen proinflamasi dengan menghambat sinyal transduksi sehingga menurunkan modulasi transkripsi gen (García-Lafuente, 2009).

Kelompok yang diberi ekstrak etanol *Citrullus lanatus* mengalami penebalan dibandingkan K-OVA dengan penebalan epitel yang paling mendekati normal dan kelompok kontrol Metilprednisolon terjadi pada KP-2 yaitu kelompok ekstrak etanol *Citrullus lanatus* dengan dosis 350 mg/kgbb/hari. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *Citrullus lanatus* memiliki efek antiinflamasi. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Niwanggalih pada tahun 2014 bahwa pemberian ekstrak kulit buah *Citrullus lanatus* dapat menurunkan jumlah netrofil pada mencit BALB/c yang mengalami luka gores.

Pemberian Metilprednisolon juga meningkatkan tebal epitel duodenum mencit. Salah satu efek Metilprednisolon dalam tubuh adalah sebagai antiinflamasi. Metilprednisolon dapat mengurangi efek inflamasi karena efeknya yang hebat pada konsentrasi, distribusi dan fungsi dari lekosit perifer serta penghambatan aktifitas Fosfolipase A2. Metilprednisolon menghambat fungsi lekosit dari jaringan makrofag sehingga respon terhadap antigen menjadi berkurang. Efek terhadap makrofag sangat jelas yaitu dengan membatasi kemampuan memfagosit dan membunuh mikroorganisme serta mengeluarkan IL-1, pirogen, kolagenase, elastase dan TNF dan aktivator paslminogen. Selain itu Metilprednisolon juga mengurangi intesis prostaglandin dan leukotrien oleh aktivasi fosfolipase A2. Selain itu Metiprednisolon juga menghambat COX 2

yang lebih berperan dalam peradangan dibandingkan COX 1. Metilprednisolon menyebabkan vasokonstriksi, menurunkan permeabilitas kapiler dengan menghambat aktivitas kinin dan endotoksin sehingga mengurangi histamin yang dilepaskan oleh basofil. Pada dosis yang tinggi Metilprednisolon dapat menurunkan jumlah antibodi (Katzung, 2004).

Dalam penelitian ini terdapat 2 mencit yang mati pada kelompok K-MP (Kelompok Metilprednisolon). Metilprednisolon mempunyai efek yang berbahaya bagi tubuh apabila dikonsumsi dalam jangka waktu lama. Hal ini dapat disebabkan oleh efek samping Metilprednisolon seperti atrofi otot, osteoporosis, *moon face*, *buffalo hump*, lemak ekstremitas berkurang, gangguan reabsorpsi  $\text{Na}^+$  serta sekresi  $\text{K}^+$  dan  $\text{H}^+$  di ginjal, gangguan absorpsi  $\text{Ca}^{2+}$  di usus, dan gangguan neuropsikiatri (Sudir, 2007).