

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian potensi ekstrak buah pepaya sebagai antiinflamasi melalui pengamatan ukuran tebal epitel duodenum mencit BALB/c telah berhasil dilakukan. Penelitian dimulai dengan menentukan subyek penelitian. Pada penelitian ini digunakan 30 ekor mencit. Mencit yang dipilih adalah mencit galur BALB/c karena mencit ini bisa digunakan dalam studi mengenai imunologi (Johnson, 2012). Penelitian ini menggunakan mencit umur 8 minggu karena kadar hormonalnya sudah stabil seperti manusia pada usia dewasa. Mencit jantan dipilih dengan 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 fisiologis mencit tersebut. Selain itu tingkat stress pada mencit betina lebih tinggi dibandingkan dengan mencit jantan yang mungkin dapat mengganggu pada saat pengujian (Ariyani, 2015).

Setelah didapatkan mencit sesuai kriteria, dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu. Tujuan aklimatisasi adalah supaya mencit terbiasa dengan tempat tinggal yang baru dan tidak stres. Setelah diaklimatisasi, mencit dibagi menjadi 6 kelompok secara *simple random sampling*, Terdapat kelompok kontrol normal, kelompok kontrol negatif (hanya disensitisasi menggunakan Ovalbumin), kelompok kontrol

positif (disensitisasi OVA dan diberi Metilprednisolon) dan tiga kelompok perlakuan (disensitisasi OVA dan diberi ekstrak etanol *Carica papaya L.* dengan dosis 0,175 mg/kgbb/hari, 350 mg/kgbb/hari, 750 mg/kgbb/hari). Selama penelitian, mencit ditimbang berat badannya setiap minggu untuk mengetahui perkembangan berat badan. Secara umum berat badan mencit mengalami peningkatan. Data berat badan mencit dapat dilihat pada Lampiran 5.

Identifikasi taksonomi buah pepaya dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada untuk menghindari kesalahan dalam pengambilan objek penelitian. Hasil uji menunjukkan bahwa objek yang diidentifikasi adalah benar *Carica papaya L.* Keterangan uji taksonomi dapat dilihat pada Lampiran 3

Pembuatan ekstrak etanol *C. papaya* diperoleh dari buah pepaya matang berwarna jingga yang dicuci bersih, dikupas, diiris tipis kemudian dikeringkan dengan *freeze drying*, dihaluskan dan diekstraksi dengan etanol 80% menggunakan metode maserasi. Etanol digunakan sebagai pelarut karena etanol bersifat semi polar, artinya dapat melarutkan senyawa polar maupun nonpolar. Flavonoid yang merupakan senyawa polar diharapkan larut dalam pelarut tersebut (Geniosa, 2015).

Ekstrak etanol *C. papaya* diberikan secara peroral, dengan dosis 175 mg/kgbb/hari (K-P1); 350 mg/kgbb/hari (K-P2); dan 700 mg/kgbb/hari (K-P03) selama 28 hari berturut-turut. Dosis ekstrak ditentukan berdasarkan dosis ekstrak pepaya yang memberikan efek hepatoproteksi pada tikus dikonversikan ke dalam dosis mencit (Kantham, 2009). Konversi dosis dapat dilihat pada Lampiran 4.

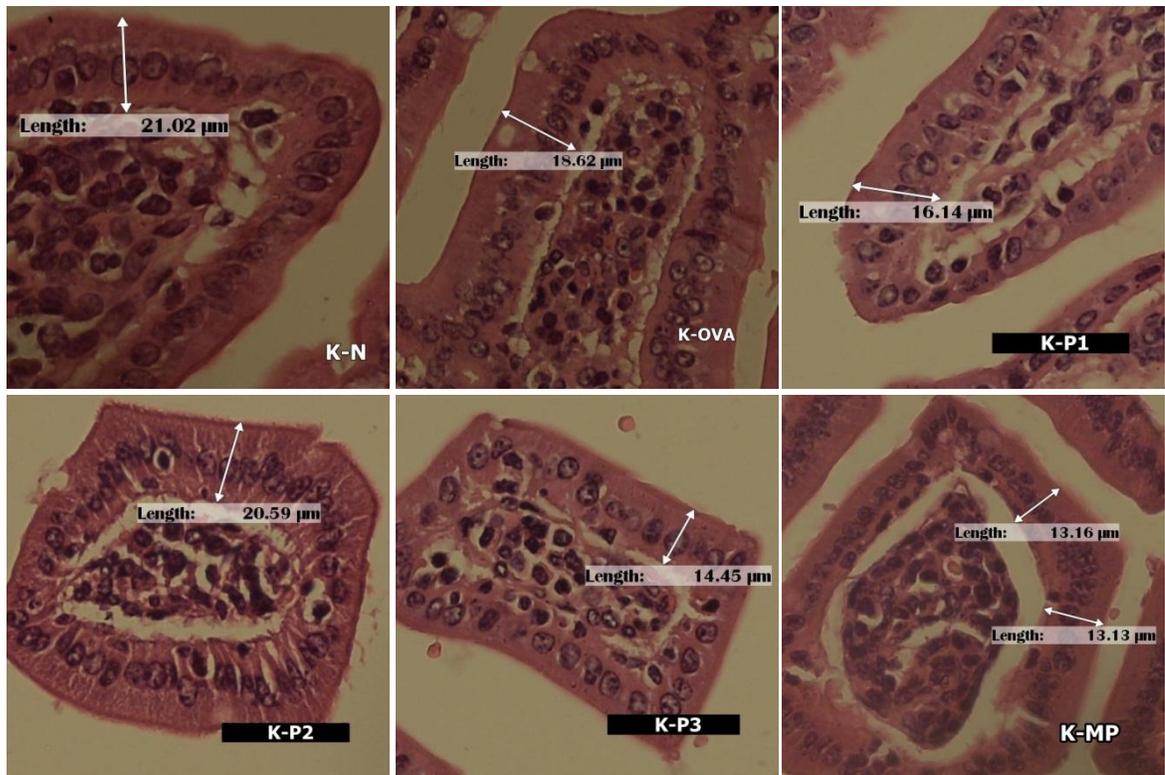
Uji efek antiinflamasi ekstrak *C. papaya* dengan pemberian Ovalbumin pada mencit. Mencit disensitisasi dengan OVA secara intraperitoneal agar lebih cepat diserap tubuh dan menghasilkan imunitas yang lebih cepat. Sensitisasi intraperitoneal dilakukan pada hari ke-15 dan hari ke-22. Sensitisasi berikutnya pada hari ke-23 sampai dengan hari ke-28 dipapar peroral dengan 0,15 cc/mencit OVA dalam akuades dibuat dari 2,5 mg OVA dalam 7,75 ml akuades, dengan tujuan agar dihasilkan imunitas sistemik (Subijanto *et al.*, 2008).

Kelompok kontrol positif pada penelitian ini diberikan Metilprednisolon secara peroral. Metilprednisolon merupakan kortikosteroid dan antiinflamasi yang memiliki mekanisme kerja memodulasi metabolisme karbohidrat, protein, dan lipid dan pemeliharaan homeostasis cairan dan elektrolit. Metilprednisolon dapat 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).

Mencit dibedah setelah paparan OVA terakhir pada hari ke-29 dan diambil organ duodenumnya. Organ duodenum yang sudah diambil kemudian dibuat preparat. Preparat 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.

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

Gambaran histologi epitel duodenum mencit BALB/c yang diamati dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Histologi epitel duodenum mencit BALB/c dengan perwarnaan HE perbesaran 400x setelah 28 hari perlakuan pada K-N (Normal) , K-OVA, K-P1, K-P2, K-P3 dan K-MP (Metiprednisolon)

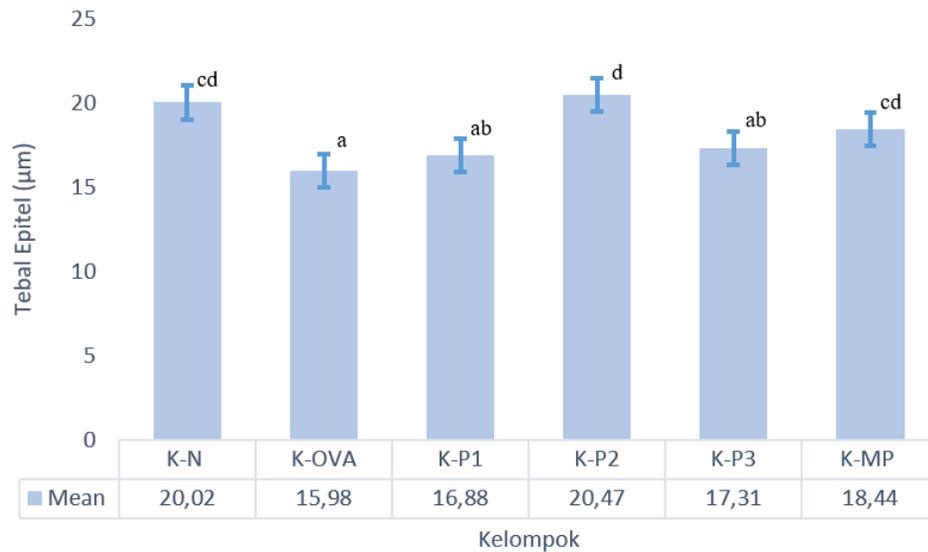
Setelah dilakukan pengukuran tebal epitel duodenum pada keenam kelompok, dilakukan penghitungan rata-rata tebal epitel duodenum mencit yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata tebal epitel duodenum mencit BALB/c ($x \pm SD$) dalam satuan μm pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah 28 hari perlakuan.

No.	Kelompok	Tebal Epitel Duodenum (μm)
1	K-N	$20,02 \pm 3,50^{\text{cd}}$
2	K-OVA	$15,98 \pm 3,23^{\text{a}}$
3	K-P1	$16,88 \pm 3,64^{\text{ab}}$
4	K-P2	$20,47 \pm 4,01^{\text{d}}$
5	K-P3	$17,31 \pm 2,39^{\text{ab}}$
6	K-MP	$18,45 \pm 3,03^{\text{bc}}$

Keterangan: SD: Standar Deviasi ; ^{a,b}:angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata antar kelompoknya.

Data tebal epitel duodenum diuji normalitasnya menggunakan *Kolmogorov Smirnov* dimana 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. Pengolahan data dilanjutkan dengan uji *Tukey* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.



Gambar 7. Grafik rata-rata ketebalan epitel duodenum (μm) pada masing-masing kelompok setelah 28 hari perlakuan ; ^{a,b}:angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata antar kelompoknya.

Pada Tabel 1 didapatkan rata-rata ukuran tebal epitel duodenum terendah pada K-OVA sebesar $15,98 \pm 3,23 \mu\text{m}$. K-OVA memiliki ukuran tebal epitel yang lebih rendah secara signifikan dari K-N yaitu $20,02 \pm 3,50 \mu\text{m}$. Hal ini disebabkan karena pemberian OVA yang menyebabkan peradangan saluran cerna menciut sehingga terjadi kerusakan epitel duodenum dan menurunkan ketebalannya (Prasetyo, 2008).

Radang pada saluran cerna menyebabkan aktifnya sistem pertahanan berupa sel goblet, sel epitel, makrofag dan sel dendritik (Kvietys *et al.*, 2014). Paparan zat-zat tertentu pada duodenum dapat berefek pada kerusakan epitel mukosa duodenum. 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. Kerusakan epitel duodenum dapat didefinisikan 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 (Wahab *et al.*, 2012).

Paparan Ovalbumin pada saluran pencernaan dapat menyebabkan terjadinya alergi atau hipersensitifitas tipe I. Alergi terjadi karena ketidakseimbangan hasil diferensiasi sel CD4⁺ T yaitu Sel CD4⁺ Th1 dan Sel CD4⁺ Th2. Sel CD4⁺ Th1 mensekresikan IFN γ (Interferon γ), TNF (*Tumor Necrosis Factor*) dan limfotoksin yang berperan dalam imunitas seluler, sedangkan sel CD4⁺ 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⁺ Th2 dan terjadi supresi sel CD4⁺ Th1. Pemaparan yang berulang dari OVA mampu meningkatkan sel limfosit CD4⁺ untuk selanjutnya akan merangsang sel B untuk meningkatkan produksi IgE. IgE merupakan sitokin yang sangat berperan dalam perkembangan terjadinya reaksi alergi (Prasetyo *et al.*, 2008).

Sitokin yang dihasilkan oleh sel CD4⁺ 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).

Pemberian Metilprednisolon dapat meningkatkan tebal epitel duodenum mencit. Metilprednisolon merupakan obat golongan glukokortikoid yang berperan sebagai terapi antiinflamasi. Metilprednisolon digunakan sebagai terapi antiinflamasi melalui efek immunosupresifnya. Glukokortikoid yang tidak terikat menembus membran sel dan berikatan dengan reseptor afinitas tinggi di sitoplasma, kemudian terjadi modifikasi transkripsi dan sintesis protein. Pada daerah radang, glukokortikoid menghambat infiltrasi leukosit, mengganggu respon mediator inflamasi, dan menekan respon imun humoral (Boivin *et al.*, 2007). Dosis Metilprednisolon yang direkomendasikan adalah 40-60mg, maka didapatkan dosis untuk mencit 0,13mg/mencit (Saputri, 2010). Perhitungan dosis dapat dilihat pada Lampiran.

Pada akhir penelitian, dua ekor mencit yang diberi sediaan Metilprednisolon mati. Paparan Metilprednisolon yang dilakukan selama 28 hari membuat daya tahan tubuh mencit menurun melalui efek immunosupresinya. Hal ini juga dapat disebabkan oleh efek samping obat Metilprednisolon tersebut. Pada dosis yang tinggi Metilprednisolon dapat menurunkan jumlah antibodi (Katzung, 2004). Penggunaan jangka panjang Metilprednisolon oral dapat dikaitkan dengan efek samping berupa osteoporosis, penyakit metabolik dan peningkatan risiko penyakit kardiovaskular (Wei *et al.*, 2004).

Kelompok yang diberi ekstrak etanol *Carica papaya L.* dosis 175, 350 dan 700 mg/kgbb/hari memiliki tebal epitel yang lebih tinggi daripada K-OVA. Pemberian ekstrak etanol *Carica papaya L.* dapat meningkatkan tebal epitel duodenum karena pada buah tersebut memiliki kandungan vitamin A, vitamin B9, vitamin C dan vitamin E. Selain itu pepaya mengandung mineral seperti fosfor, magnesium zat besi dan kalsium.. Penelitian yang dilakukan Ramdani (2013) membuktikan bahwa pepaya juga mengandung senyawa flavonoid. 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 arakhidonat dan NO (*Nitric Oxide*) sehingga menurunkan mediator inflamasi seperti NO, leukotriens dan prostaglandin. Mekanisme ketiga adalah modulasi mediator proinflamasi sehingga menurunkan sitokin proinflamasi seperti TNF α dan leukotriens. Mekanisme yang terakhir adalah dengan modulasi gen proinflamasi dengan menghambat sinyal transduksi sehingga menurunkan modulasi transkripsi gen (García-Lafuente, 2009).

Kelompok yang paling signifikan peningkatan tebal epitelnya terjadi pada K-P2 dimana pada kelompok tersebut mengalami penebalan epitel yang lebih tinggi dibanding kelompok kontrol normal (K-N) dan kelompok kontrol Metilprednisolon. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *Carica papaya L.* memiliki efek

antiinflamasi. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Geniosa pada tahun 2015 bahwa pemberian ekstrak etanol buah *Carica papaya L.* mampu menurunkan proliferasi sel goblet duodenum mencit BALB/c yang diinduksi Ovalbumin.

