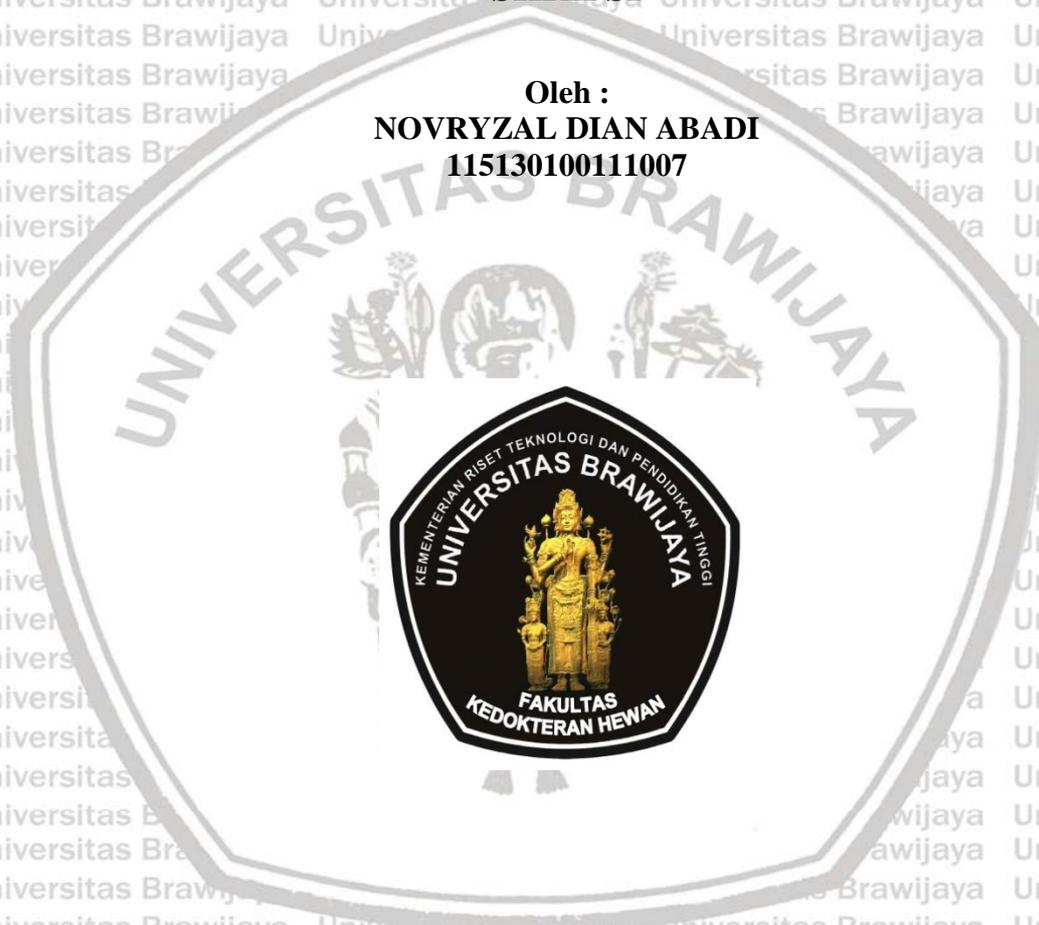


**POTENSI TERAPI PREVENTIF AIR PERASAN
BAWANG PUTIH (*Allium sativum*) TERHADAP
AKTIVITAS PROTEASE DAN HISTOPATOLOGI
JEJUNUM PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
HASIL INDUKSI RHODAMIN B**

SKRIPSI

Oleh :
NOVRYZAL DIAN ABADI
115130100111007



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2017

**POTENSI TERAPI PREVENTIF AIR PERASAN
BAWANG PUTIH (*Allium sativum*) TERHADAP
AKTIVITAS PROTEASE DAN HISTOPATOLOGI
JEJUNUM PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
HASIL INDUKSI RHODAMIN B**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :
NOVRYZAL DIAN ABADI
115130100111007



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2017

ii

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**POTENSI TERAPI PREVENTIF AIR PERASAN BAWANG PUTIH
(*Allium sativum*) TERHADAP AKTIVITAS PROTEASE DAN
HISTOPATOLOGI JEJUNUM PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)
HASIL INDUKSI RHODAMIN B**

Oleh :
NOVRYZAL DIAN ABADI
115130100111007

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 18 Agustus 2017
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc
NIP. 19580711 199203 2 002

drh. Herlina Pratiwi, M. Si
NIP. 19870518 201012 2 010

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

**LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : NOVRYZAL DIAN ABADI

NIM : 115130100111007

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul : POTENSI TERAPI PREVENTIF AIR PERASAN

BAWANG PUTIH (*Allium sativum*) TERHADAP

AKTIVITAS PROTEASE DAN HISTOPATOLOGI

JEJUNUM PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*)

HASIL INDUKSI RHODAMIN B

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 21 Agustus 2017

Yang menyatakan,

(Novryzal Dian Abadi)

NIM. 115130100111007

Potensi Terapi Preventif Air Perasan Bawang Putih (*Allium sativum*) terhadap Aktivitas Protease dan Histopatologi Jejunum pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil induksi Rhodamin B

ABSTRAK

Rhodamin B merupakan zat warna sintetik yang dilarang digunakan dalam produk pangan karena menimbulkan iritasi mukosa saluran pencernaan, saluran pernafasan dan kulit. Bawang putih mengandung antioksidan berupa alisin berfungsi menurunkan serta mencegah timbulnya radikal bebas. Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh pemberian air perasan bawang putih (*Allium sativum*) terhadap aktivitas protease dan perubahan gambaran histopatologi jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberi rhodamin B melalui pakan. Penelitian menggunakan tikus jantan strain *Wistar* dibagi menjadi kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif diberi pakan mengandung rhodamin B dengan konsentrasi 600 ppm, kelompok terapi preventif P1, P2, P3 diberikan air perasan bawang putih dengan volume pemberian 0,5mL/200gBB, 1,0mL/200gBB, 1,5mL/200gBB dengan konsentrasi air perasan bawang putih 25% setelah dipapar rhodamin B melalui pakan selama 14 hari. Aktivitas protease diukur dengan metode spektrofotometri dan histopatologi jejunum diamati menggunakan pewarnaan HE. Data aktivitas protease dianalisa secara kuantitatif menggunakan ANOVA, sedangkan histopatologi jejunum dianalisa secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan air perasan bawang putih memberikan pengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap penurunan aktivitas enzim protease dan histopatologi jejunum menunjukkan berkurangnya kerusakan sel epitel yang ruptur, infiltrasi sel radang, dan sel goblet yang hipertrofi. Air perasan bawang putih 0,5 ml/200gBB dengan konsentrasi air perasan bawang putih 25% merupakan volume efektif dalam menurunkan aktivitas enzim protease sebesar 43% dan mencegah kerusakan gambaran histopatologi jejunum tikus (*Rattus norvegicus*).

Kata kunci : Aktivitas protease, histopatologi jejunum, air perasan bawang putih, rhodamin B.

**The Potency of Preventive Therapy of Garlic Juice (*Allium sativum*) on
Protease Activity and Jejunum Histopathology in Rat
(*Rattus norvegicus*) Induced by Rhodamine B**

ABSTRACT

Rhodamin B is a prohibited synthetic dyestuff used in food products because it irritates the digestive tract mucosa, respiratory tract and skin. Garlic contains antioxidant allicin and serves to reduce and prevent the occurrence of free radicals. The aim of this research is to investigate the effect of garlic juice (*Allium sativum*) on the protease activity and change of histopathologic image of rat's jejunum (*Rattus norvegicus*) induced by rhodamine B through feed. The experiment used male rat wistar strain divided into negative control group, positive control group fed rhodamine B with concentration of 600 ppm, preventive therapy group P1, P2, P3 given garlic juice with a volume of 0.5mL/200gBB, 1.0mL/200gBB, 1.5mL/200gBB with 25% garlic juice concentration after exposure to rhodamine B through feed for 14 days. Protease activity measured by spectrophotometric method and histopathology of jejunum was observed use HE staining. Protease activity data were analyzed quantitatively used ANOVA, while jejunum histopathology was analyzed descriptively. The results showed that garlic juice had significant effect ($p < 0,05$) on the decrease of protease enzyme activity and histopathology of jejunal organ showed decrease of ruptured epithelial cell damage, inflammatory cell infiltration, and hypertrophy goblet cells. The volume of garlic juice of 0.5 ml/200gBB garlic juice with 25% garlic juice concentration is an effective volume in reducing protease enzyme activity by 43% and preventing damage to histopathologic images of rat's jejunum (*Rattus norvegicus*).

Keywords: Protease activity, jejunum histopathology, garlic juice, rhodamine B.

KATA PENGANTAR

Puji syukur Kehadirat Tuhan Yang Maha Esa penulis haturkan karena atas berkah dan rahmat-Nya sehingga mampu menyelesaikan tugas sarjana yang berjudul “Potensi Terapi Preventif Air Perasan Bawang Putih (*Allium sativum*) terhadap Aktivitas Protease dan Histopatologi Jejunum pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil induksi Rhodamin B”. Selama penyusunan tugas sarjana ini telah melibatkan banyak pihak sehingga penulis mengucapkan terima kasih kepada:

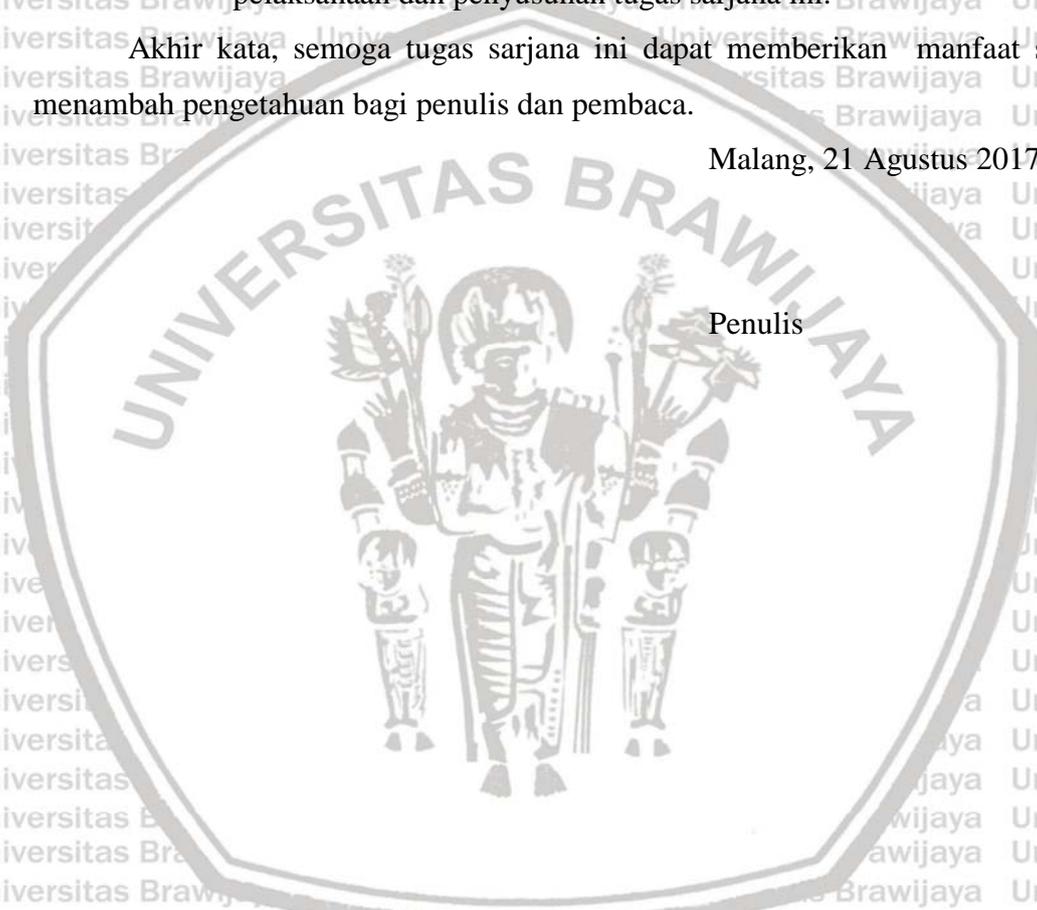
1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
2. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc dan drh. Herlina Pratiwi, M. Si selaku dosen pembimbing yang telah tulus ikhlas membimbing penulis.
3. Kepada drh. M. Arfan Lesmana, M.Sc dan drh. Wawid Purwatiningsih, M.Vet selaku penguji yang telah memberikan pengarahan dan masukan dengan kesabaran.
4. Seluruh jajaran Dekanat, Dosen dan Staf FKH UB atas motivasinya.
5. Papa M. Sugianto, Ibu Yayuk Endang Suharti dan kakak Ricky Setiawan tercinta yang selalu memberikan kasih sayang, motivasi, dan dukungan dalam segala bentuk untuk penulis.
6. Asisten Laboratorium Biokimia UB atas segala bantuan.
7. Sahabat terbaik kelompok skripsi Ghinanafiana Waafi Tuko, Yusrizal Doni, Chandra Afyan P, Evris Hikmat E S dan Abednego Adi Setiawan yang telah membantu penulis menyelesaikan tugas akhir ini.
8. Sahabat tercinta Vina serta teman-teman Danny Govindra, Prayoga Dwi S, Basri, Eka, Almabi, Taufan yang selalu memberikan motivasi dan dukungan untuk penulis.

9. Keluarga besar vetasclub (*Veterinary A Student Class University of Brawijaya*) yang selalu memberikan motivasi bagi penulis.
10. Keluarga besar FKH angkatan 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015 dan 2016.
11. Keluarga Besar Kingdom Kumis Kucing 29 C Tembalangan
12. Serta kepada semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan tugas sarjana ini.

Akhir kata, semoga tugas sarjana ini dapat memberikan manfaat serta menambah pengetahuan bagi penulis dan pembaca.

Malang, 21 Agustus 2017

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan	5
1.5 Manfaat	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Rhodamin B	6
2.2 Dampak Rhodamin B	7
2.3 Patomekamisme Rhodamin B	9
2.4 Pengaruh Paparan Rhodamin B terhadap Enzim Protease	11
2.5 Hewan Coba Tikus	12
2.6 Bawang Putih (<i>Allium sativum</i>)	14
2.7 Kandungan Bawang Putih	15
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	
3.1 Kerangka Konseptual	18
3.2 Hipotesis Penelitian	20
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	21
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	21
4.3 Tahapan Penelitian	22
4.4 Prosedur Penelitian	22
4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba	22
4.4.2 Variabel Penelitian	24
4.4.3 Pembuatan Perasan Air Bawang Putih	24
4.4.4 Penentuan Dosis Rhodamin B	25
4.4.5 Pembuatan Sediaan Pakan Yang Mengandung Rhodamin B dan Pemaparan Rhodamin B pada Hewan Coba	25
4.4.6 Pemberian Air Perasan Bawang Putih pada Hewan Coba	26
4.4.7 Pengambilan Organ Jejunum	26
4.4.8 Pengukuran Aktivitas Protease Jejunum	27
4.4.8.1 Isolasi Protein	27



4.4.8.2 Pembuatan Kurva Baku Tirosin	27
4.4.8.3 Pengukuran Aktivitas Protease Hasil Isolasi Protein Jejunum.....	28
4.4.9 Cara Pembuaan Preparat Histopatologi.....	29
4.4.9.1 Fiksasi	29
4.4.9.2 Dehidrasi dan Infiltrasi	29
4.4.9.3 Penjernihan (<i>Clearing</i>)	29
4.4.9.4 Infiltrasi Parafin	30
4.4.9.5 Penanaman Jaringan (<i>Embedding</i>).....	30
4.4.9.6 Pewarnaan <i>Hemotoksilin-Eosin</i>	30
4.4.9.7 Pengamatan Histopatologi.....	31
4.5 Analisi Data	31
BAB 5 HASIL DAN PENELITIAN	
5.1 Potensi Terapi Preventif Air Perasan Bawang Putih (<i>Allium sativum</i>) terhadap Aktivitas Protease pada Jejunum Tikus Putih (<i>Rattus</i> <i>norvegicus</i>) yang Diinduksi Rhodamin B melalui Pakan	32
5.2 Potensi Terapi Preventif Air Perasan Bawang Putih (<i>Allium sativum</i>) terhadap Histopatologi Jejunum pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi Rhodamin B melalui Pakan	36
BAB 6 PENUTUP	
6.1 Kesimpulan	43
6.2 Saran	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	49

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Komposisi Kimia Bawang Putih.....	17
4.1 Rancangan Penelitian	23
5.1 Aktivitas protease jejunum tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang diinduksi Rhodamin B melauai pakan dan di terapi preventif air perasan bawang putih	32



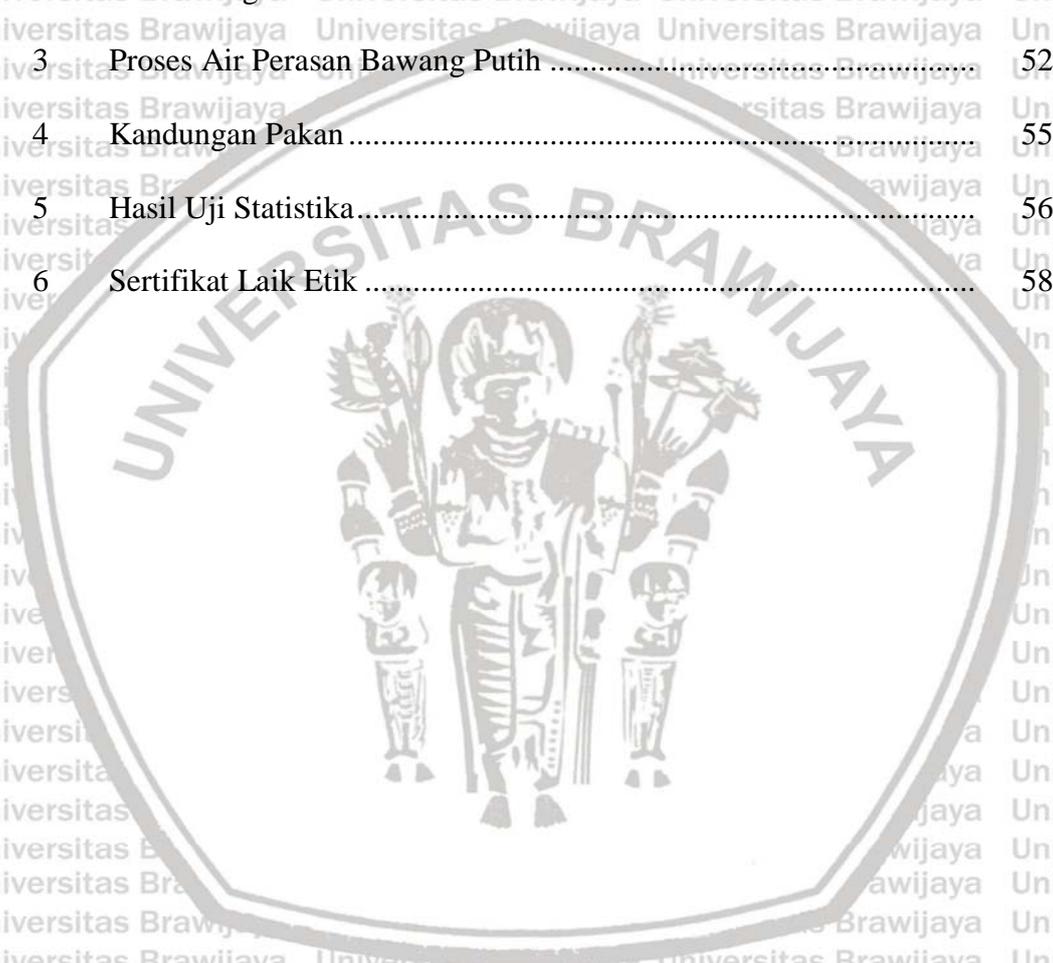
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur Rhodamin B	7
2.2 Struktur Kimia Alisin	16
3.1 Kerangka Konseptual	18
4.1 Rancangan Penelitian	23
5.1 Histopatologi jejunum tikus putih dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) perbesaran 400x	37



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Kerangka Operasional Rancangan Penelitian.....	50
2	Pakan dengan Rhodamin B.....	51
3	Proses Air Perasan Bawang Putih	52
4	Kandungan Pakan	55
5	Hasil Uji Statistika.....	56
6	Sertifikat Laik Etik	58



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<i>Symbol/ Singkatan</i>	<i>Keterangan</i>
°C	Derajat Celcius
λ	Lambda
μL	Mikroliter
Mmol	Mikromol
ANOVA	<i>one way analysis of varians</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BB	Berat badan
cc	Centimeter Cubic
Cl	Klorin
Cu	Merkuri
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
g	gram
GPX	<i>Glutathione Peroxidase</i>
HCl	<i>Hidrogen Klorida</i>
HE	<i>Hematoxylen Eosin</i>
Kg	Kilogram
L	Liter
LD	<i>Lethal Dosage</i>
Mg	Mangan
mg	Miligram
mL	Milliliter
NaCl	<i>Natrium Chlorida</i>
nm	Nanometer
PBS azida	<i>Phosphat Buffer Saline azida</i>
PBST PMSF	<i>Phoshat Buffer Saline Tween Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</i>
PFA	<i>Paraformaldehyde</i>
pH	<i>Potential Hidrogen</i>
ppm	<i>Part per Million</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	rotasi per menit
SD	Sekolah Dasar
SOD	<i>Superoxide dismutase</i>
TCA	<i>tri-chloroacetic acid</i>
TCA	<i>tri-chloroacetic acid</i>
TEMED	<i>Tetramethyl-1,2-diamino ethane</i>
Th	Thalium
WHO	<i>World Health Organization</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pewarna makanan adalah bahan tambahan makanan yang dapat memperbaiki warna makanan yang berubah atau menjadi pucat selama proses pengolahan atau untuk memberi warna pada makanan yang tidak berwarna agar terlihat lebih menarik (Winarno, 2002). Berbagai jenis pangan dan minuman yang beredar di Indonesia, baik secara sengaja maupun tidak sengaja telah diwarnai dengan pewarna tekstil atau pewarna yang bukan *food grade*, yang tidak diijinkan digunakan dalam bahan pangan (Cahyadi, 2009).

Rhodamin B merupakan salah satu contoh zat warna tekstil yang biasa digunakan pada makanan, padahal perwarna ini berbahaya dan dilarang penggunaannya. Rhodamin B merupakan zat warna sintetik yang umum digunakan sebagai pewarna tekstil, tetapi tidak boleh digunakan di dalam produk pangan. Dampak mengkonsumsi rhodamin B dalam jumlah besar dan berulang-ulang akan terjadi penumpukan dalam tubuh yang dapat menimbulkan iritasi pada mukosa saluran pencernaan, dan bila terhirup dapat mengiritasi saluran pernafasan, iritasi pada kulit, mata tampak kemerahan dan udem (Yulianti, 2007), serta menimbulkan kerusakan pada organ hepar, ginjal maupun limpa (Trestianti, 2003; Lee *et al.*, 2005).

Pada kenyataannya rhodamin B masih digunakan dalam berbagai produk olahan pangan. Pewarna rhodamin B banyak digunakan pada produk makanan dan minuman industri rumah tangga, antara lain kerupuk, makanan ringan, pefinen,

sirup, minuman kemasan, es doger, dan manisan. Makanan yang diberi zat pewarna itu biasanya berwarna merah lebih terang dan ditemukan pada makanan dan minuman jajanan anak sekolah dasar (SD) (Judarwanto, 2009).

Konsumsi rhodamin B dalam jumlah besar dan berulang-ulang akan mengakibatkan terjadinya penumpukan dalam tubuh yang dapat menimbulkan iritasi pada mukosa saluran pencernaan (Yulianti, 2007). Hal ini terjadi karena rhodamin B merupakan senyawa radikal bebas yang mengandung atom Cl yang memiliki elektron bebas yang tidak berpasangan dan memiliki reaktivitas yang tinggi untuk mencapai kestabilan dalam tubuh dengan cara berikatan terhadap senyawa-senyawa di dalam tubuh (Kusmayadi dan Sukandar, 2009).

Radikal bebas akan beredar ke seluruh tubuh termasuk pada organ jejunum kemudian akan berikatan dengan membran sel yang mengandung *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) sehingga menimbulkan peroksidasi lipid yang mampu memicu terjadinya kerusakan jaringan. Peroksidasi lipid yang terjadi pada membran jejunum akan mengakibatkan terjadinya inflamasi (Lamanepa, 2005).

Keadaan ini sesuai dengan pernyataan Dunlop and Malbert (2004) yang menyatakan bahwa dalam keadaan inflamasi akan terjadi infiltrasi sel-sel inflamasi seperti neutrofil yang dapat melepaskan enzim protease. NF- κ B dapat menginduksi sel-sel inflamasi seperti makrofag dan neutrofil yang berfungsi sebagai sel-sel pertahanan kekebalan tubuh. Selain itu, neutrofil itu juga akan melepaskan enzim protease (proteolitik) (Zhang *et al*, 2001; Mayer-Scholl, 2004).

Enzim protease yang berperan dalam proses inflamasi adalah protease serin (elastase neutrofil) yaitu jenis protease yang disimpan dalam neutrofil yang

berfungsi sebagai pertahanan antimikroba dan proses fagositosis mikroorganisme didalam fagolisosom neutrofil. Neutrofil merupakan salah satu sel yang berperan dalam respon inflamasi. Protease yang tersimpan dalam netrofil disebut protease serin netrofil jenis dari serin netrofil adalah cathespsin G, proteinase dan neutrofil elastase. Ketiga jenis protease tersebut berfungsi sebagai pertahanan antimikroba dan mekanisme fagositosis mikroorganisme didalam fagolisosom. Aktivitas protease yang meningkat dan terus menerus dapat juga merusak sel atau jaringan inang (Wati dkk, 2013). Oleh karena itulah, enzim protease digunakan untuk mengukur tingkat inflamasi yang terjadi di jejunum.

Bawang putih (*Allium Sativum*) merupakan salah satu tumbuhan yang memiliki kandungan antioksidan dan berfungsi untuk menurunkan serta mencegah timbulnya radikal bebas dalam tubuh. Bawang putih dapat digunakan sebagai obat tradisional untuk penyembuhan jerawat, bisul, borok, impotensi, cacingan, dan sakit gigi (Syamsiah dan Tajudin, 2003). Allisin merupakan antioksidan utama dalam bawang putih yang berperan dalam menghambat radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh (Schwartz, 2002).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui peran air perasan bawang putih (*Allium sativum*) sebagai sumber antioksidan dan pengaruhnya terhadap vili usus khususnya jejunum akibat makanan yang mengandung rhodamin B serta pengaruhnya terhadap aktivitas protease jejunum tikus (*Rattus norvegicus*)

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan pemaparan penulis mengenai latar belakang dilakukannya penelitian ini, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah pemberian perasan air bawang putih (*Allium sativum*) berpengaruh terhadap aktivitas protease tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberi rhodamin B melalui pakan?
2. Apakah pemberian perasan air bawang putih (*Allium sativum*) berpengaruh terhadap gambaran histopatologi jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberi rhodamin B melalui pakan?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* yang didapat dari Laboratorium Biologi Universitas Brawijaya dengan umur 8-12 minggu dan berat badan rata – rata 180 g. Penggunaan hewan coba pada penelitian ini telah mendapatkan sertifikat laik etik dengan nomor 613-KEP-UB dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya. (**Lampiran 6**).
2. Hewan model dibuat dengan pemberian pakan yang telah dicampur rhodamin B dengan konsentrasi 600 ppm boron selama 21 hari (Pipih dan Juli, 2000).
3. Rhodamin B yang digunakan dibeli dari Panadia *Laboratory* Malang dalam bentuk serbuk teknis.
4. Volume preventif perasan bawang putih (*Allium sativum*) pada penelitian ini adalah 0,5 mL/200 g BB, 1,0 mL/200 g BB dan 1,5 mL/200 g BB yang diberikan selama 21 hari melalui sonde lambung.

5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah aktivitas protease jejunum yang diukur dengan menggunakan metode spektrofotometri dan gambaran histopatologi jejunum menggunakan metode pewarnaan HE.

1.4 Tujuan

Berdasarkan latar belakang dilakukannya penelitian ini, diperoleh beberapa tujuan :

1. Mengetahui pengaruh pemberian perasan bawang putih (*Allium sativum*) terhadap aktivitas protease tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberi rhodamin B melalui pakan.
2. Mengetahui pengaruh pemberian perasan bawang putih (*Allium sativum*) terhadap perubahan gambaran histopatologi jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberi rhodamin B melalui pakan.

1.5 Manfaat

Manfaat penelitian ini adalah mengetahui pengaruh perasan bawang putih (*Allium sativum*) dalam mengurangi kerusakan jejunum melalui gambaran histopatologi jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) yang diberi rhodamin B melalui pakan dan sebagai sumber informasi untuk meningkatkan pengetahuan mengenai efektivitas perasan bawang putih (*Allium sativum*) sebagai antioksidan.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

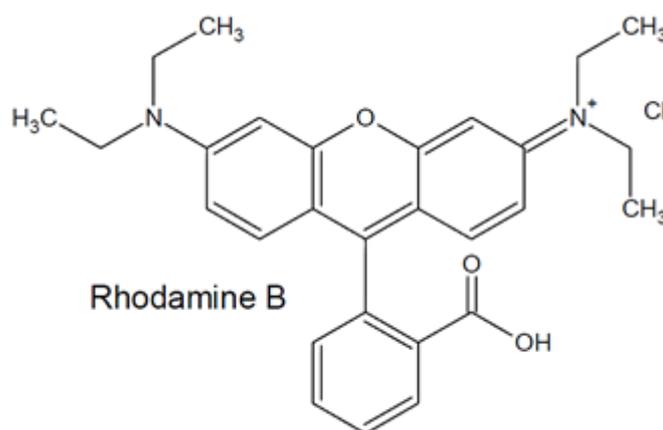
2.1 Rhodamin B

Rhodamin B yaitu zat pewarna berupa serbuk kristal berwarna hijau atau ungu kemerahan, tidak berbau, serta mudah larut dalam larutan warna merah terang berfluoresen sebagai bahan pewarna tekstil atau pakaian. Jenis jajanan yang banyak dijumpai dan dicampuri dengan Rhodamin B antara lain bubur delima, cendol, kolang kaling, cincau, dan kue-kue lainnya. Setelah decampuri bahan ini, makanan tersebut menjadi berwarna merah muda terang (Yamlean, 2011). Menurut Yuliarti (2007), penggunaan Rhodamin B pada makanan dalam waktu yang lama akan dapat mengakibatkan gangguan fungsi hati maupun kanker. Namun demikian, bila terpapar Rhodamin B dalam jumlah besar maka dalam waktu singkat akan terjadi gejala akut keracunan Rhodamin B. Zat warna ini dapat menyebabkan iritasi pada saluran pernafasan dan merupakan zat karsinogenik serta dalam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan kerusakan pada hati (Pramuktiajuni, 2009).

Rhodamin B dengan rumus kimia $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ adalah zat warna sintetis berbentuk serbuk kristal berwarna kehijauan, berwarna merah keunguan dalam bentuk terlarut pada konsentrasi tinggi dan berwarna merah terang pada konsentrasi rendah. Rhodamin B Termasuk golongan pewarna *xanthenes* basa, dan terbuat dari meta-dietilaminofenol dan ftalik anhidrid, suatu bahan yang tidak bisa dimakan (Manurung, 2011) serta sangat berfluoresensi (Merck Index, 2006).

Rhodamin B sangat larut dalam air dan alkohol, serta sedikit larut dalam asam klorida

dan natrium hidroksida. Rhodamin B digunakan sebagai pewarna kertas, kapas, wool, serat kulit kayu, nilon, sabun dan industri tekstil sebagai pewarna bahan kain atau pakaian (Merck Index, 2006) dan dalam laboratorium digunakan sebagai pereaksi (reagensia) untuk identifikasi plumbum, bismuth, kobalt, merkuri (Cu), mangan (Mg), thalium (Th) dan sebagai bahan uji pencemaran air (CTFA, 1991).



Gambar 2.1. Struktur rhodamin B (Nurmasari, 2014).

Rhodamin B mempunyai berat molekul sebesar 479 g/mol dan bersifat larut dalam air dengan kelarutan sampai 50 g/L. Berdasarkan RTECS (2005) pada hewan percobaan tikus ditemukan bahwa dosis lethal LD50 per-oral sebesar 887mg/kg berat badan, dan dosis terendah sebesar 500mg/kg berat badan. Rhodamin B bersifat karsinogenik dan genotoksik (Brantom, 2005).

2.2 Dampak Rhodamin B

Rhodamin B merupakan zat warna yang berbahaya yang sampai sekarang masih banyak disalahgunakan dalam mewarnai berbagai makanan dan minuman.

Analisis yang menggunakan metode destruksi yang dilanjutkan dengan metode

spektrofometri, telah diketahui bahwa sifat racun rhodamin B tidak hanya disebabkan senyawa organik, tetapi oleh karena kontaminasi senyawa anorganik terutama timbal dan arsen (Subandi, 1999). Dengan terkontaminasinya rhodamin B dengan kedua unsur tersebut, menyebabkan rhodamin B berbahaya jika digunakan sebagai pewarna pada makanan, obat maupun kosmetik. Hal ini didukung oleh Winarno (2004) yang menyatakan bahwa timbal memang banyak digunakan sebagai pigmen atau zat pewarna dalam industri kosmetik dan kontaminasi dalam makanan dapat terjadi akibat penggunaan zat pewarna tekstil tersebut. Di dalam struktur rhodamin B terdapat ikatan dengan senyawa klorin (Cl) dimana atom klorin tergolong sebagai senyawa halogen dan sifat halogen yang berada di dalam senyawa organik sangat berbahaya dan memiliki reaktivitas yang tinggi untuk mencapai kestabilan dalam tubuh dengan cara berikatan terhadap senyawa-senyawa di dalam tubuh yang menimbulkan efek toksik dan memicu kanker pada manusia (Kusmayadi dan Sukandar, 2009).

Dampak mengkonsumsi rhodamin B dalam jumlah besar dan berulang-ulang akan terjadi penumpukan dalam tubuh yang dapat menimbulkan iritasi pada mukosa saluran pencernaan, dan bila terhirup dapat mengiritasi saluran pernafasan, iritasi pada kulit, mata tampak kemerahan dan udem (Yulianti, 2007), serta menimbulkan kerusakan pada organ hepar, ginjal maupun limpa (Trestianti, 2003; Lee *et al.*, 2005). Pemberian rhodamin B secara subkutan pada hewan mencit dan tikus dapat menimbulkan sarkoma, pembesaran organ 14 hati, ginjal dan limfa yang diikuti perubahan anatomi berupa pembesaran organ (Merck Index, 2006). Manurung (2011) menyatakan bahwa pemberian rhodamin B dan

metanil yellow per-oral pada mencit selama 16 minggu menunjukkan perubahan gizi yang buruk, semua simpanan lemak di dalam tubuh habis, hepatoma, perubahan ginjal di bagian pielum dan bagian korteks yang menipis.

Menurut WHO, rhodamin B berbahaya bagi kesehatan manusia karena sifat kimia dan kandungan logam beratnya. Rhodamin B mengandung senyawa klorin (Cl). Senyawa klorin merupakan senyawa halogen yang berbahaya dan reaktif. Jika tertelan, maka senyawa ini akan berusaha mencapai kestabilan dalam tubuh dengan cara mengikat senyawa lain dalam tubuh, hal inilah yang bersifat racun bagi tubuh. Rhodamin B juga dapat menimbulkan efek akut jika tertelan sebanyak 500 mg/kg BB, yang merupakan dosis toksiknya. Efek toksik yang mungkin terjadi adalah iritasi saluran cerna (Jonqueira *and* Carneiro 2005; Samuelson 2007).

2.3 Patomekanisme Rhodamin B

Rhodamine B merupakan sumber senyawa radikal bebas atau senyawa oksigen reaktif atau *reactive oxygen species* (ROS). *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan oksidan yang sangat reaktif dan mempunyai aktivitas yang berbedaa. Dampak negatif senyawa tersebut timbul karena aktivitasnya, sehingga dapat merusak komponen sel yang sangat penting untuk mempertahankan integritas sel. Setiap ROS yang terbentuk dapat memulai suatu reaksi berantai yang terus berlanjut sampai ROS itu dihilangkan oleh ROS yang lain atau sistem antioksidannya. Secara cepat, molekul radikal bebas akan menarik elektron makromolekul biologis yang berada di sekitarnya seperti protein, asam nukleat, dan asam deoksiribonukleat (DNA) untuk memenuhi keganjilan elektronnya. Jika

makromolekul yang teroksidasi dan terdegradasi tersebut merupakan bagian dari sel atau organel, maka dapat mengakibatkan kerusakan pada sel tersebut (Astuti, 2008).

Secara fisiologis, sel memproduksi radikal bebas (endogen) sebagai konsekuensi logis pada reaksi biokimia dalam kehidupan aerobik. Organisme aerobik membutuhkan oksigen untuk menghasilkan ATP, yaitu senyawa yang merupakan sumber energi bagi makhluk hidup melalui fosforilasi oksidatif yang terjadi dalam mitokondria. Pada proses tersebut terjadi reduksi O_2 menjadi H_2O yang membutuhkan pengalihan 4 elektron. Pada kondisi tertentu, pengalihan elektron tersebut berjalan kurang sempurna sehingga dapat terbentuk radikal bebas yang dapat merusak sel jika tidak diredam (Suryohudoyo, 2007). Pembentukan radikal bebas akan dinetralkan oleh antioksidan yang diproduksi oleh tubuh dalam jumlah yang berimbang. Antioksidan yang dimaksud berupa enzim, diantaranya adalah enzim *superoxide dismutase* (SOD) yang terdapat di mitokondria dan sitosol, *glutathione peroxidase* (GPX), *glutathione reductase*, dan katalase (Astuti, 2008).

Efek negatif dari radikal bebas akan timbul jika jumlah radikal bebas melebihi kemampuan detoksifikasi sistem pertahanan antioksidan endogen sehingga menimbulkan kondisi stress oksidatif. Stress oksidatif merupakan suatu kondisi yang dapat menyebabkan peningkatan laju kerusakan sel akibat induksi oksigen dan turunannya seperti ROS. Mahdi (2010) menyebutkan bahwa stress oksidatif yang terjadi secara terus menerus dan dalam jangka waktu lama dapat menyebabkan terjadinya kerusakan oksidatif, yaitu terjadinya kerusakan dan

kematian sel, jaringan hingga organ tubuh. Sel yang mengalami kerusakan diakibatkan oleh adanya kondisi yang tidak seimbang antara pembentukan ROS dan aktivitas pertahanan enzim antioksidan (Fuji, *et al.*, 2013 ; Lee, *et al.*, 2004).

2.4 Pengaruh Paparan Rhodamin B terhadap Enzim Protease

Enzim protease merupakan biokatalisator untuk reaksi pemecahan protein menjadi oligopeptida atau asam-asam amino. Enzim-enzim ini bekerja mengkatalisis reaksi hidrolisis, yaitu reaksi yang melibatkan air pada ikatan spesifik dengan substrat, sehingga juga dapat digolongkan sebagai enzim hidrolase. Protease dinamakan juga peptidase, karena memecah ikatan peptida pada rantai polipeptida (Sajuthi dkk, 2010). Menurut Nuraini (2002) enzim protease adalah enzim yang berfungsi sebagai pemecah protein dalam proses pencernaan untuk memecah ikatan peptide dari protein yang dikonsumsi menjadi asam amino yang mudah direabsorpsi. Enzim protease berperan dalam proses metabolisme dan proses regurgitasi sel hewan, tumbuhan, mikroorganisme serta fungsi fisiologis sistem imun dan inflamasi.

Enzim protease yang berperan dalam proses inflamasi adalah protease serin (elastase netrofil) yaitu jenis protease yang disimpan dalam neutrofil yang berfungsi sebagai pertahanan antimikroba dan proses fagositosis mikroorganisme didalam fagolisosom neutrofil. Neutrofil merupakan salah satu sel yang berperan dalam respon inflamasi. Protease yang tersimpan dalam neutrofil disebut protease serin netrofil jenis dari serin netrofil adalah cathespsin G, proteinase dan neutrofil elastase. Ketiga jenis protease tersebut berfungsi sebagai pertahanan antimikroba dan mekanisme fagositosis mikroorganisme didalam fagolisosom. Aktivitas

protease yang meningkat dan terus menerus dapat juga merusak sel atau jaringan inang (Wati dkk, 2013).

Enzim protease pada permukaan sel memegang peranan penting terhadap homeostasis jaringan. Termasuk dalam degradasi ECM (*Extra Cellular Matrix*), koagulasi darah, pertumbuhan sel, diferensiasi, adhesi, migrasi, apoptosis, mencerna protein makanan, *protein turnover*, pembelahan sel dan transduksi sinyal (Lee, 2006; *Motyán et al.*, 2013).

2.5 Hewan Coba Tikus

Menurut Adiyati (2011), hewan coba merupakan hewan yang dikembangbiakkan untuk digunakan sebagai hewan uji coba. Tikus sering digunakan pada berbagai macam penelitian medis selama bertahun-tahun. Hal ini dikarenakan tikus memiliki karakteristik genetik yang unik, mudah berkembang biak, murah serta mudah untuk mendapatkannya.

Malole dan Pramono (1989) mengatakan bahwa secara umum hewan yang sering digunakan sebagai hewan percobaan antara lain adalah tikus, mencit, kelinci, hamster, kambing, domba, sapi, kuda, kerbau, unggas, dan simpanse.

Berbagai jenis hewan coba yang ada dan sering digunakan dalam penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*). Tikus (*Rattus norvegicus*) sering digunakan dalam penelitian karena mempunyai kebutuhan asam amino esensial, sistem metabolisme dan organ yang hampir sama seperti manusia.

Tikus putih digunakan dalam penelitian ini karena tikus putih memiliki evolusi yang rendah. Oleh karena itu, pada saat penelitian tikus putih tidak berubah dalam perkembangan hidupnya sehingga lebih mudah dipantau dengan

kondisi yang tetap atau hampir sama. Metabolisme tikus putih mirip dengan metabolisme pada anjing dan kucing sehingga tikus putih dapat dijadikan objek penelitian yang dapat diaplikasikan pada hewan tersebut (Rahayu, 2007). Berbeda dengan hewan laboratorium lainnya tikus tidak dapat muntah karena memiliki struktur anatomi tidak lazim pada tempat bermuara esofagus ke dalam lambung sehingga mempermudah proses pengekokan perlakuan menggunakan sonde lambung. Tikus juga tidak memiliki kelenjar empedu, lambung terdiri atas bagian glandular dan nonglandular, serta usus yang terdiri atas duodenum, jejunum, dan ileum (Kusumawati, 2004).

Taksonomi tikus (*Rattus norvegicus*) menurut Sirois (2005) adalah:

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mammalia

Ordo : Rodentia

Sub ordo : Myomorpha

Famili : Muridae

Sub famili : Murinae

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus norvegicus*

Morfologi tikus putih yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit, memiliki telinga yang tebal dan pendek dengan rambut halus. Mata berwarna merah muda, ciri yang paling terlihat adalah ekornya yang panjang. Berat badan

tikus jantan yang berumur 12 minggu mencapai 240 gram, sedangkan berat badan tikus betina mencapai 200 gram (Sirois, 2005).

2.6 Bawang Putih (*Allium sativum*)

Bawang putih (*Allium sativum*) termasuk genus *allium* atau di Indonesia lazim disebut bawang putih. Bawang putih termasuk klasifikasi tumbuhan terana berumbi lapis atau siung yang bersusun. Bawang putih tumbuh secara berumpun dan berdiri tegak sampai setinggi 30 – 75 cm, mempunyai batang semu yang terbentuk dari pelepah-pelepah daun. Helaian daunnya mirip pita, berbentuk pipih dan memanjang. Akar bawang putih terdiri dari serabut-serabut kecil yang berjumlah banyak. Dan setiap umbi bawang putih terdiri dari sejumlah anak bawang (siung) yang setiap siungnya terbungkus kulit tipis berwarna putih. Bawang putih yang semula merupakan tumbuhan daerah dataran tinggi, sekarang di Indonesia jenis tertentu dibudidayakan di dataran rendah. Bawang putih berkembang baik pada ketinggian berkisar 200 – 250 meter di atas permukaan laut (Untari, 2010).

Adapun taksonomi tanaman bawang putih (*Allium sativum*) (Santoso, 2000) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Super Divisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Liliopsida

Sub Kelas : Liliidae

Ordo : Liliales

Famili : Liliaceae

Genus : *Allium*

Spesies : *Allium sativum L*

Bawang putih (*Allium sativum*) merupakan salah satu jenis tanaman yang telah banyak dimanfaatkan untuk pengobatan sejak ribuan tahun yang lalu. Banyak hasil penelitian menunjukkan berbagai pengaruh farmakologis dari bawang putih, misalnya sebagai antibakteri, antijamur, hipolipidemik, hiperglikemik, antihipertensi dan antikanker. Efek perindungan yang dihasilkan oleh bawang putih berkaitan dengan sifat antioksidannya (Qidway, 2000).

2.7 Kandungan Bawang Putih

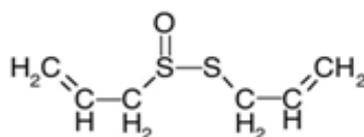
Menurut Yuhua dan Eddy (2001) kandungan kimia dari umbi bawang putih per 100 gram adalah alisin 1,5% yang merupakan komponen penting dengan efek antibiotik dan sebagai antioksidan, protein sebesar 4,5 gram, lemak 0,20 gram, hidrat arang 23,10 gram, vitamin B1 0,22 miligram, vitamin C 15 miligram, kalori sebanyak 95 kalori, fosfor 134 miligram, kalsium 42 miligram, zat besi 1 miligram, dan air 71 gram. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif adalah radikal bebas, senyawa ini terbentuk di dalam tubuh dan dipicu oleh bermacam-macam faktor (Winarsi, 2007). Turunan fenol sebagai antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas

(Hattenschwiler *and* Vitousek, 2000). Alisin merupakan salah satu senyawa alamiah yang terkandung di dalam bawang putih yang mampu mencegah timbulnya sel-sel tumor dan juga dapat menghambat pertumbuhan sel-sel kanker.

Komponen utama bawang putih tidak berbau disebut kompleks sativumin, yang diabsorpsi oleh glukosa dalam bentuk aslinya untuk mencegah proses dekomposisi. Dekomposisi kompleks sativumin akan menghasilkan bau khas yang tidak sedap dari allyl sulfide, allyl disulfide, allyl mercaptane, allicin dan alliin.

Komponen kimia ini mengandung unsur sulfur, Sulfur merupakan komponen penting yang terkandung dalam bawang putih (Nadzifa Ima, 2010).

Menurut Lawrence and Lawrence (2011) terdapat empat senyawa utama pada bawang putih yaitu alisin, allin, alil sistein, dan alil disulfide yang berperan sebagai antioksidan dengan aktivitas penghambat reaksi hidroksil dan peroksidasi lipid, serta ditemukan bahwa empat senyawa tersebut aktif terhadap kerusakan radikal bebas. Adapaun struktur molekul dari alisin yang berfungsi sebagai antioksidan alami dapat dilihat pada **Gambar 2.2** berikut :



Gambar 2.2 Struktur Kimia Alisin (Amagase *et al.*, 2001)

Tabel 2.1 Komposisi Kimia Bawang Putih dalam 100 gram bahan

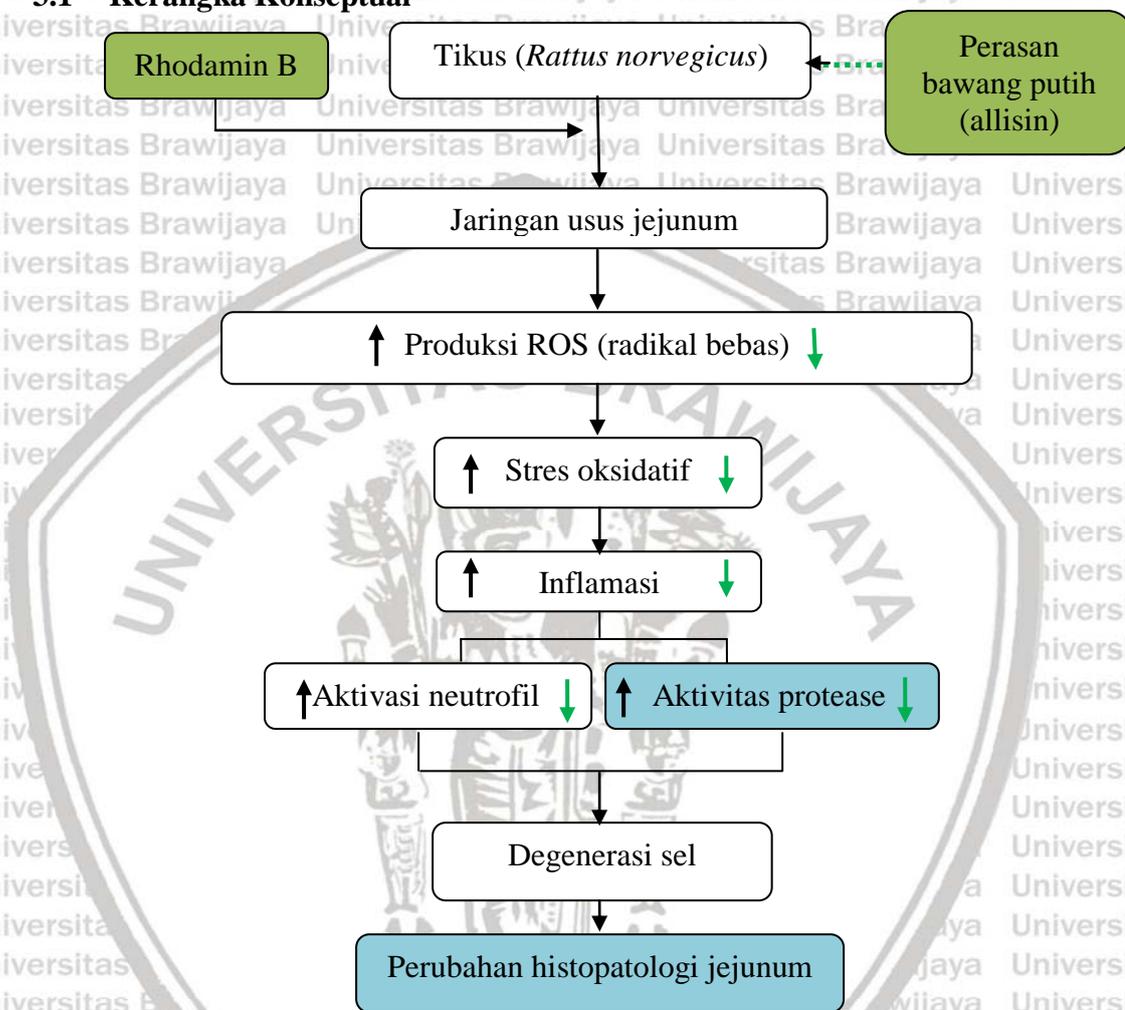
Bahan	Jumlah
Air	66,2 – 71,0 g
Kalori	95,0 – 122 kal
Protein	4,5 – 7 g
Lemak	0,2 – 0,3 g
Karbohidrat	23,1 – 24,6 g
Kalsium	26 – 42 mg
Fosfor	15 – 109 mg
Besi	1,4 – 1,5 mg
Kalium	346 – 377 mg

(Syamsiah dan Tajudin, 2003).

Penelitian yang telah dikembangkan untuk mengeksplorasi aktifitas biologi umbi bawang putih yang terkait dengan farmakologi antara lain; sebagai anti-diabetes, anti-hipertensi, anti-kolesterol, anti-atherosklerosis, anti-oksidan, antiagregasi sel platelet. Pemacu fibrinolisis, anti-virus, anti-mikroba dan antikanker (Hernawan, 2003). Dosis toksik dari bawang putih segar menurut kepustakaan adalah 500 mg/100 g berat badan sehari (Andru, 2009). *Allisin* merupakan anti-oksidan utama dalam umbi bawang putih (Schwartz *et al.*, 2002).

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :



: Variabel bebas

→ : Patomekanisme



: efek rhodamin B

⋯→ : Menghambat



: efek perasan bawang putih



: Variabel tergantung



Rhodamin B merupakan sumber senyawa oksigen reaktif (ROS) yang bersifat tidak stabil karena memiliki molekul Cl yang tidak berpasangan. Radikal bebas akan memicu stres oksidatif, yaitu suatu keadaan pembentukan radikal bebas melebihi sistem pertahanan atau sistem pertahanan tidak mampu mendetoksifikasi radikal bebas, selanjutnya radikal bebas akan beredar ke seluruh tubuh termasuk salah satunya pada organ jejunum. Radikal bebas yang berlebih akan berikatan dengan membran sel yang mengandung *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) sehingga terjadi peroksidasi lipid yang mengakibatkan terjadinya kerusakan jaringan atau inflamasi pada organ jejunum. Adanya inflamasi akan meningkatkan aktivasi neutrofil serta aktivasi protease. Enzim protease berperan dalam proses fagositosis mikroorganisme di dalam fagolisosom neutrofil. Peningkatan aktifitas protease yang berlebih pada jaringan yang mengalami inflamasi dapat mengakibatkan kerusakan sel.

Selain itu, adanya radikal bebas dalam jumlah berlebih tidak mampu dilawan oleh enzim antioksidan endogen pada tubuh sehingga terjadi penurunan fungsi enzim SOD, GPX, reduktase dan katalase. Dampaknya akan terjadi stres oksidatif atau peningkatan laju metabolisme yang akan mempercepat terjadinya peroksidasi lipid.

Pemberian perasan Bawang putih (*Allium sativum*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang mengandung allisin diharapkan dapat mencegah terbentuknya radikal bebas karena allisin yang memiliki gugus fenolik dapat mendonorkan ion sulfur. Dengan adanya donor molekul sulfur dan berikatan dengan molekul Cl, maka laju metabolisme tubuh berjalan dengan normal dan proses peroksidasi lipid

dapat dicegah sehingga kerusakan sel pada organ jejunum akibat stres oksidatif juga dapat dicegah dan produksi enzim protease dapat menurun.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat disusun adalah sebagai berikut :

1. Pemberian air perasan bawang putih (*Allium sativum*) dapat mencegah peningkatan aktivitas protease pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar rhodamin B melalui pakan.
2. Pemberian perasan air bawang putih (*Allium sativum*) dapat mencegah kerusakan jejunum dengan melihat histopatologi pada jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dipapar rhodamin B melalui pakan.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan April 2016 sampai bulan Mei 2016.

Tempat penelitian meliputi Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri Malang, Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah bak plastik sebagai tempat pemeliharaan hewan coba, botol minum tikus, sekam, alat sonde, *dissecting set*, papan bedah, sarung tangan, spuit 3 cc, microtube, timbangan digital, seperangkat alat gelas (cawan petri, gelas ukur, labu takar (10, 100, 500, dan 1000 mL), tabung reaksi, pipet tetes, pengaduk kaca, tabung mikro, *autoclave*, mortar, penangas air, *refrigerator*, *freezer*, pH meter digital, neraca analitik, mikropipet, aluminium foil, saringan berbahan plastik, *centrifuge* (*Thermoscientific Sorvall Biofuge Primo R Centrifuge*), *appendorf micropipette* ukuran 10-100 μ L, fotometer.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bawang putih, tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* umur 8-12 minggu dan berat badan rata-rata 180-200 gram, rhodamin B, hepar tikus, serum, pakan tikus, Aquades steril, NaCl fisiologis 0,9%.

4.3 Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Penentuan dosis rhodamin B dalam pakan dan dosis pemberian perasan air bawang putih
3. Pemaparan rhodamin B pada kelompok B, C, D, E serta pemberian perasan air bawang putih pada kelompok C, D, E
4. Pengambilan jaringan jejunum
5. Pengujian aktivitas protease menggunakan metode spektrofotometri
6. Analisis hasil pengujian aktivitas portease jaringan jejunum.

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Estimasi besar sampel yang dibutuhkan dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus berikut:

$$t(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = banyaknya perlakuan yang dicoba

n = banyaknya ulangan yang diperlukan

Sehingga estimasi besar sampel hewan coba yang diperlukan sebanyak 20 ekor tikus dengan jumlah tikus sebanyak 4 ekor sebagai ulangan pada masing-masing kelompok perlakuan.

Persiapan hewan coba dimulai dengan diaklimatisasi hewan coba selama tujuh hari di laboratorium. Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok tikus,

dengan uraian sebagai berikut : kelompok pertama sebagai kontrol negatif, yaitu diberikan pakan standar tanpa perlakuan (A), kelompok kedua sebagai kontrol positif yang diberi pakan mengandung rhodamin B tanpa pemberian perasan air bawang putih (B), kelompok ketiga, keempat, dan kelima diberikan air perasan bawang putih berturut-turut sebanyak 0,5 mL/200g BB (C), 1,0 mL/200g BB (D), dan 1,5 mL/200g BB selama tujuh hari pertama kemudian di hari ke delapan hingga hari ke 21 dipapar dengan rhodamin B melalui pakan setelah diberikan perasan air bawang putih sesuai volume pemberian perkelompok. Tikus dikandangkan dalam bak plastik berukuran 17,5 X 23,75 X 17,5 cm dengan jumlah sesuai dengan jumlah tikus yang digunakan.

Tabel 4.1 Rancangan penelitian

Variabel yang diamati	Ulangan			
	1	2	3	4
Aktivitas protease jejunum				
Kelompok A (kontrol negatif)				
Kelompok B (kontrol positif rhodamin B)				
Kelompok C (pakan rhodamin B 600 ppm + 0,5 mL perasan air bawang putih /200g BB)				
Kelompok D (pakan rhodamin B 600 ppm + 1,0 mL perasan air bawang putih /200g BB)				
Kelompok E (pakan rhodamin B 600 ppm + 1,5 mL perasan air bawang putih /200g BB)				

4.4.2 Variabel Penelitian

Adapun variabel dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : rhodamin B dan perasan air bawang putih

Variabel tergantung : aktivitas protease jejunum dan histopatologi jejunum

Variabel kontrol : Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar, berat badan \pm 200 gram, umur 8-12 minggu, jenis kelamin jantan, pakan AD II, kondisi eksperimental seperti kandang disekat menjadi empat bagian yang diisi masing-masing 1 ekor tikus.

4.4.3 Pembuatan Perasan Air Bawang Putih

Perasan air bawang putih dibuat dengan cara diblender sebanyak 1 kg bawang putih yang sudah dikupas kulitnya dan bawang putih yang sudah diblender diletakkan di atas kertas saring. Setelah itu, diperas sampai tinggal ampas dari bawang putih dan dari 1 kg bawang putih menghasilkan 500 mL air perasan bawang putih. Kemudian air hasil perasan bawang putih yang sudah disaring siap untuk dikonsumsi atau diberikan kepada tikus sebagai perlakuan atau bila tidak langsung dikonsumsi dapat disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C untuk memperpanjang masa simpan dan agar tidak terjadi asidifikasi lanjut (Hidayat, 2006).

4.4.4 Penentuan Dosis Rhodamin B

Dosis rhodamin B yang digunakan didasarkan pada hasil temuan pada penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa paparan rhodamin B dengan konsentrasi 600 ppm rhodamin B pada diet tikus dapat menimbulkan efek toksik pada organ dan saluran pencernaan tikus. Menurut Widiartini (2004), Pakan yang digunakan dalam pemeliharaan tikus putih adalah AD II. Pakan diberikan sebanyak 10% berat badan, yaitu sekitar 10-15 g/ekor/hari. Jadi setiap kelompok perlakuan diberikan pakan sebanyak 10 g/ekor/hari.

Dalam penelitian ini kelompok A (kontrol negatif) dan kelompok B (kontrol positif rhodamin B) tidak diberikan air perasan bawang putih. Volume air perasan bawang putih yang diberikan pada kelompok C, D, dan E yaitu sebanyak 0,5 ml/200g BB, 1,0 ml/200g BB, dan 1,5 ml/200g BB. Pemberian dosis air perasan bawang putih yang diberikan pada kelompok C, D, dan E didasarkan dengan pertimbangan bahwa volume maksimal pemberian terapi air perasan bawang putih secara per oral pada tikus adalah sebesar 5 mL/200g BB.

4.4.5 Pembuatan Sediaan Pakan yang Mengandung Rhodamin B dan Paparan Rhodamin B Pada Hewan Coba

Pembuatan pakan rhodamin B dilakukan dengan cara mencampurkan kebutuhan pakan tikus sehari dengan rhodamin B sampai didapatkan konsentrasi pakan 600 ppm dan juga dibutuhkan aquades secukupnya agar campuran pakan dan rhodamin B tercampur sempurna. Kebutuhan pakan tikus dengan berat 200 gram sehari adalah 10 gram sehingga untuk mendapatkan konsentrasi 600 ppm maka pakan sebesar 10 gram dicampur dengan rhodamin B sebesar 0,06 gram. Untuk kebutuhan pakan tikus perlakuan B, C, D dan E sejumlah 16 tikus maka

total campuran pakan yang digunakan sebesar 160 gram pakan dicampur dengan 0,96 gram rhodamin B. Untuk kebutuhan pakan campuran selama 14 hari diperlukan pakan sebesar 2240 gram dicampur dengan rhodamin B sebesar 13,44 gram. Setelah itu pakan dikeringkan dengan melalui proses pengeringan (oven) suhu 80°C selama 10 jam.

Pemberian paparan rhodamin B dilakukan dengan cara memberikan pakan yang mengandung rhodamin B dengan kadar 600 ppm pada kelompok tikus B, C, D, dan E selama 14 hari dan dimulai dari hari ke delapan. Pada hari ke-22 dilakukan pembedahan pada hewan coba untuk pengamatan aktivitas protease dan gambaran histopatologi jejunum.

4.4.6 Pemberian Air Perasan Bawang Putih pada Hewan Coba

Pemberian air perasan bawang putih pada kelompok C, D, dan E selama 21 hari dilakukan melalui sonde lambung dengan frekuensi pemberian sebanyak 1 kali sehari. Selama 21 hari, kelompok tikus pertama hanya diberikan air minum dan pakan standar (A), kelompok kedua diberikan pakan yang mengandung rhodamin B dan tanpa pemberian air perasan bawang putih (B), kelompok ketiga, keempat, dan kelima diberikan pakan yang telah dicampur dengan rhodamin B dan diberikan air perasan bawang putih sebanyak 0,5 ml/200gBB/hari (C), 1 ml/200gBB/hari (D) dan 1,5 ml/200gBB/hari (E). Pada hari ke-22 tikus dibedah dan diamati aktivitas protease dan gambaran histopatologi jejunum.

4.4.7 Pengambilan Organ Jejunum

Pengambilan organ jejunum pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan setelah seluruh perlakuan dilakukan selama 21 hari.

Langkah pertama yang dilakukan adalah dislokasi hewan coba pada bagian leher kemudian diletakkan pada papan bedah dan tikus diposisikan rebah dorsal.

Scalpel, gunting, dan pinset merupakan alat yang digunakan saat proses pembedahan. Pembedahan dilakukan pada bagian abdomen, kemudian diambil bagian jejunum yang terletak di bagian kanan pada ventral abdomen, kemudian diisolasi dan dipotong. Organ jejunum dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9% dingin. Kemudian organ jejunum dibagi menjadi dua bagian dan dimasukkan dalam larutan *Phosphate Buffer Saline-azida* (PBS – azida) pH 7,4 dan larutan paraformaldehid 4% (PFA) untuk pengujian aktivitas protease dan histopatologi.

4.4.8 Pengukuran Aktivitas Enzim Protease

4.4.8.1 Isolasi Protein

Organ jejunum ditimbang 0,3 gram, kemudian dipotong kecil-kecil dengan menggunakan gunting bedah, ditambah sedikit pasir kuarsa, dan digerus dengan mortar dingin yang diletakkan diatas balok es. Setelah itu homogenat ditambah dengan larutan PBS – Tween : PSMF (9 : 1) sebanyak 1 mL dan dipindahkan ke dalam tabung *effendorf* steril. Dilanjutkan dengan menyvorteks selama 15 menit (6000 rpm), dan selama 10 menit disonikasi dengan sonikator. Kemudian supernatannya diambil dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1 : 1 dan dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan. Setelah itu disentrifugasi selama 15 menit (10.000 rpm), diambil endapannya dan dikeringkan sampai bau etanol hilang. Kemudian endapan ditambah dengan larutan 0,02 M Tris – HCl pH 6,5 dingin perbandingan volume 1 : 1 (Walter, 1984).

4.4.8.2 Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Langkah awal dalam pembuatan kurva baku tirosin yaitu disiapkan 10 labu ukur dan masing-masing diisi larutan baku tirosin 20 ppm 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 mL untuk konsentrasi 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 ppm.

Selanjutnya ditambah aquades sampai tanda batas kemudian tabung ditutup dengan aluminium foil lalu dikocok. Selanjutnya diukur absorbansinya pada masing-masing konsentrasi larutan baku pada panjang gelombang maksimum.

Blanko yang digunakan adalah aquades.

4.4.8.3 Pengukuran Aktivitas Protease Hasil Isolasi Protein Jejenum

Diawali dengan mencampurkan kasein 500 ppm sebanyak 200 μ L, 300 μ L larutan buffer fosfat pH 7 dan 100 μ L enzim protease lalu didiamkan 60 menit pada suhu 37^oC di atas inkubator. Kemudian ditambahkan 400 μ L larutan TCA 4% didiamkan selama 30 menit pada suhu 27^oC (suhu kamar). Selanjutnya diputar dengan alat sentrifugasi 4000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil 300 μ L dan diencerkan 5 kali volume sampel dengan buffer fosfat lalu diukur nilai absorbansinya pada λ maks tirosin. Blanko yang digunakan dengan prosedur sama dengan penentuan aktivitas, tetapi untuk perlakuan penambahan TCA dilakukan secepatnya setelah penambahan larutan enzim.

Adapun pengukuran aktivitas enzim protease dilakukan berdasarkan metode walter (1984) menggunakan rumus :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times f_p$$

Dimana : v = volume total sampel (mL)
 q = waktu inkubasi (mL)
 f_p = faktor pengenceran
 p = jumlah enzim (mL)

4.4.9 Cara Pembuatan Preparat Histopatologi

4.4.9.1 Fiksasi

Fiksasi dilakukan dengan cara yang pertama organ jejunum dibilas dengan NaCl – fisiologis 0,9% dingin. Kemudian organ jejunum dibagi dan dimasukkan dalam larutan *paraformaldehid* 4% (PFA). Fiksasi memiliki tujuan yaitu untuk mencegah adanya kerusakan pada jaringan, menghentikan proses metabolisme, dan mengawetkan komponen histologis.

4.4.9.2 Dehidrasi dan Infiltrasi

Proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat mulai dari 70%, 80%, 90%, 95%. Proses dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan air dari dalam jaringan. Lama jaringan dalam larutan etanol berkisar antara 10 menit hingga 30 menit. Proses dehidrasi berjalan dalam kondisi teragitasi dan pada suhu 4⁰C.

4.4.9.3 Penjernihan (*Clearing*)

Penjernihan bertujuan untuk menggantikan tempat etanol dalam jaringan. Reagen yang dipergunakan adalah xylol. Jaringan dipindahkan dari alkohol absolut III ke larutan penjernihan (xylol). Penjernih dilakukan dalam xylol I (1 jam), xylol II (1 jam), dan xylol III (30 menit pada suhu kamar dan 30 menit pada inkubator).

4.4.9.4 Infiltrasi Parafin

Infiltrasi parafin dilakukan dengan cara memasukkan jaringan dalam parafin cair I, parafin cair II, dan parafin cair III (masing-masing 1 jam di dalam oven). Infiltrasi parafin ini bertujuan untuk menggantikan kedudukan dehidran dalam jaringan dan bahan penjernih dengan parafin cair.

4.4.9.5 Penanaman Jaringan (*Embedding*)

Embedding dilakukan dengan cetakan yang di dalamnya diisi parafin cair. Blok parafin yang sudah membeku tersebut dipasang pada mikrotom dan diatur agar posisi sejajar dengan posisi pisau. Blok parafin dipotong dengan ketebalan 4 μm . pada awal pemotongan dilakukan *trimming* karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna. Sediaan disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C selama semalam lalu siap untuk diwarnai dengan pewarnaan HE.

4.4.9.6 Pewarnaan *Hematoksilin-Eosin*

Pewarnaan *Hematoksilin – Eosin* dilakukan dengan menggunakan zat pewarna hematoksilin untuk memberi warna biru pada inti sel (basofilik) serta eosin yang merupakan *counterstaining* hematoksilin, digunakan untuk mewarnai sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberikan warna merah muda.

Proses yang dilakukan yaitu deparafinasi dengan menggunakan xylol dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol absolut I, II, dan III masing-masing 5 menit, ethanol 95%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit. Sediaan dicuci dengan air mengalir selama 15menit dan dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna hematoksilin selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air

mengalir selama 30 menit dan air aquades selama 5 menit. Setelah itu sediaan diwarnai dengan pewarna Eosin selama 5 menit dan air aquades selama 5 menit.

Setelah sediaan diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama beberapa detik, dan dilanjutkan dengan alkohol 100% I,II dan III masing-masing selama 2 menit. Setelah itu dilakukan proses *Clearing* dengan xylol I, II dan III selama 3 menit dan ditutup dengan *cover glass*.

4.4.9.7 Pengamatan Histopatologi

Preparat organ jejunum diamati menggunakan mikroskop cahaya *olympus* BX 51 dengan perbesaran 40x, 100x dan 400x.. Pengambilan gambar histopatologi jantung menggunakan kamera digital Bagian yang diamati yaitu adanya perubahan pada mukosa meliputi pada diskuamasi epitel, pendarahan, kerusakan vili, dan adanya infiltrasi sel radang pada jejunum.

4.5 Analisa Data

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini yaitu perubahan kadar aktivitas protease yang dianalisis menggunakan Analisis Ragam *one way analysis of varians ANOVA* dan uji lanjutan BNJ (Beda Nyata Jujur) $\alpha = 0,05$ untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan, sedangkan analisa data histopatologi dilakukan secara kualitatif dengan pengamatan secara deskriptif (Kusriningrum, 2008).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Potensi Terapi Preventif Air Perasan Bawang Putih (*Allium sativum*) terhadap Aktivitas Protease pada Jejunum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Rhodamin B melalui Pakan.

Aktivitas enzim protease pada jejunum masing-masing kelompok hewan coba (**Lampiran 5**) menunjukkan hasil perbedaan nyata antar perlakuan ($p < 0,05$) setelah dianalisa menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Tukey seperti yang ditunjukkan pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1. Aktivitas protease jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Rhodamin B melalui pakan dan di terapi preventif air perasan bawang putih

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata Aktivitas Protease (nmol.mL/menit)	Aktivitas Protease (%)	
		Peningkatan Terhadap Negatif	Penurunan Terhadap Positif
Kelompok A (negatif)	0,105 ± 0,008 ^a	-	-
Kelompok B (positif)	0,208 ± 0,005 ^c	98%	-
Kelompok C (0,5ml)	0,118 ± 0,014 ^a	-	43 %
Kelompok D (1ml)	0,174 ± 0,004 ^b	-	16 %
Kelompok E (1,5ml)	0,191 ± 0,003 ^b	-	8 %

Keterangan: Notasi (a, b dan c) yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antara kelompok perlakuan.

Kelompok A (kontrol negatif) menunjukkan nilai aktivitas protease yang terendah yaitu sebesar 0,105 ± 0,008 nmol.mL/menit. Nilai aktivitas protease pada kontrol negatif digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan yang terjadi karena adanya pengaruh perlakuan. Dalam keadaan normal enzim

protease dihasilkan untuk membantu proses terjadinya apoptosis, dan juga membantu pencernaan protein di dalam usus (Hardiany, 2013). Protease adalah enzim yang mengkatalisasi pemecahan ikatan peptida dalam peptida, polipeptida, dan protein menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana seperti peptida rantai pendek, dan asam amino (Motyan, 2013). Menurut Saptono (2014) enzim proteolitik yang dihasilkan oleh jejunum dalam keadaan normal berfungsi untuk memecah protein makanan menjadi asam amino dan mencerna sel-sel epitel yang secara teratur lepas ke dalam lumen untuk diganti dengan sel yang baru (regenerasi lumen). Enzim protease yang ada pada saluran pencernaan adalah pepsin, tripsin, kimotripsin, dan elastase. Protease yang berada di saluran pencernaan disintesis dalam bentuk besar yang inaktif dan dikenal sebagai zimogen. Setelah disekresikan ke dalam saluran cerna, zimogen tersebut mengalami suatu reaksi untuk menghasilkan protease yang aktif.

Hasil uji statistik *One-Way ANOVA* menggunakan *statistical package for the social science (SPSS) version 16.0 for windows* dengan tingkat kepercayaan 95% menunjukkan signifikansi sebesar 0,000 yang berarti terdapat perbedaan yang sangat nyata pada kelima perlakuan tersebut. Hasil uji lanjutan *Tukey test* menunjukkan adanya perbedaan notasi yang berarti terdapat pengaruh perlakuan terhadap masing-masing kelompok (**Lampiran 5**).

Berdasarkan uji lanjutan *Tukey test*, kelompok B (kontrol positif) memiliki notasi yang berbeda dengan kelompok A (kontrol negatif) (**Tabel 5.1**). Notasi tersebut menunjukkan bahwa aktivitas protease pada kelompok B (positif) dan kelompok A (negatif) berbeda sangat nyata karena adanya pengaruh perlakuan

pemberian rhodamin B yang dicampur pakan pada kontrol positif. Peningkatan pada kontrol positif yaitu sebesar 98% dan merupakan peningkatan yang tertinggi.

Hasil statistik ini membuktikan bahwa induksi rhodamin B secara peroral dapat meningkatkan aktivitas enzim protease. Peningkatan aktivitas protease dapat terjadi karena pengaruh rhodamin B yang merupakan sumber radikal bebas akan memicu terjadinya reaksi inflamasi pada saluran pencernaan karena molekul Cl akan berikatan dengan PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acid*) dan akan meningkatkan kadar ROS (Xiong, 2001). Radikal bebas akan menyebar ke seluruh tubuh dan salah satunya pada organ jejunum. Radikal bebas akan menyebabkan peroksidasi lipid dan mengakibatkan terjadinya inflamasi. Saat terjadinya inflamasi, neutrofil akan melepaskan enzim protease untuk membantu proses fagositosis sel-sel yang mengalami kerusakan (Bratawidjaya, 2010).

Hasil uji statistik kelompok C (0,5 ml) memiliki notasi yang sama dengan kelompok A (negatif). Pemberian volume 0,5 ml air perasan bawang putih (*Allium sativum*) mengalami penurunan kadar protease sebesar 43% terhadap kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian volume 0,5 ml/200 gram BB air perasan bawang putih efektif menurunkan aktivitas protease. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif adalah radikal bebas, senyawa ini terbentuk di dalam tubuh dan dipicu oleh bermacam-macam faktor (Astuti, 2008). Menurut Lawrence (2011) terdapat senyawa utama pada bawang putih yaitu allisin yang berperan sebagai antioksidan dengan aktivitas penghambat reaksi hidroksil dan peroksidasi

lipid, serta ditemukan bahwa senyawa tersebut aktif terhadap kerusakan radikal bebas, karena radikal bebas (ROS) berkurang maka aktivitas enzim protease menurun.

Menurut Pratiwi dkk., (2013) yang menyatakan bahwa antioksidan memecah ROS dalam tubuh dengan cara menangkap radikal bebas, mereduksi, mendonorkan atom hidrogen dan mengikat oksigen singlet. Keadaan ini menyebabkan *chain reaction* terhenti sehingga oksidan dan antioksidan kembali menjadi stabil. Keseimbangan tersebut menurunkan sekresi dan aktivitas protease hingga mencapai keadaan yang stabil. Pemberian volume 0,5 ml perasan bawang putih (*Allium sativum*) menunjukkan kadar protease yang mendekati kadar protease kelompok A (negatif) hewan sehat, sehingga volume 0,5 ml merupakan volume terbaik dalam penelitian ini karena pemberian berlebih perasan bawang putih mengakibatkan peningkatan aktivitas protease.

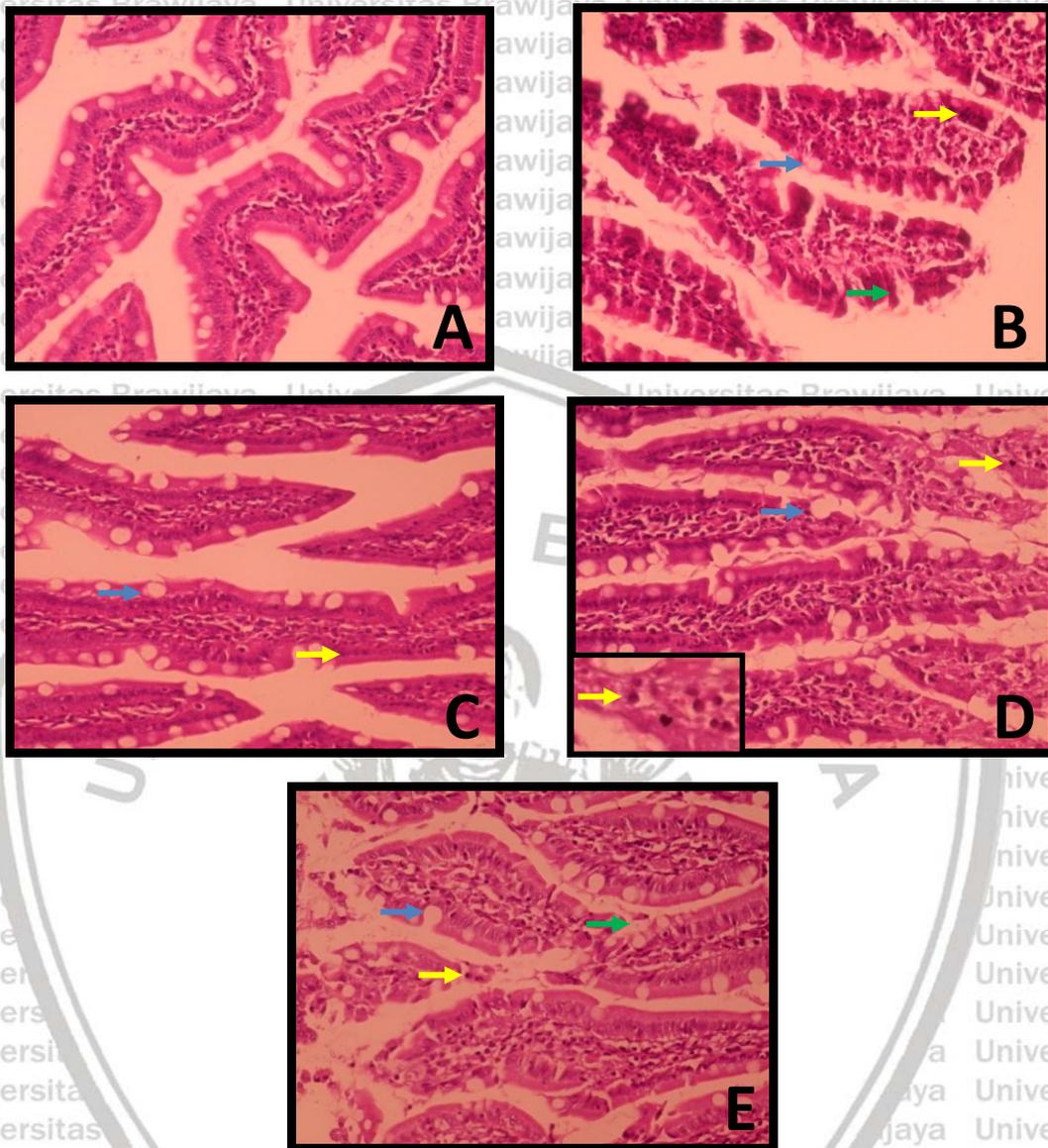
Kelompok D (1 ml) dan kelompok E (1,5 ml) masing-masing memiliki notasi yang berbeda dengan kelompok A (Positif) dan B (negatif). Pemberian volume 1 ml air perasan bawang putih (*Allium sativum*) menurunkan kadar protease sebesar 16% terhadap kontrol positif. Pemberian volume 1,5 ml air perasan bawang putih (*Allium sativum*) mengalami penurunan kadar protease sebesar 8% terhadap kontrol positif. Meningkatnya kadar protease terhadap peningkatan pemberian volume air perasan bawang putih dipengaruhi oleh efek samping bawang putih yang berasal dari alisin yang memiliki sifat prooksidan dan dapat mengiritasi gastrointestinal jika terapi yang diberikan tidak seimbang dengan paparan rhodamin B yang diberikan (Handayani, 2006). Hal ini

disebabkan oleh molekul sulfur (S) pada allisin yang berikatan dengan molekul Cl pada rhodamin B namun, diduga Kelompok D (1 ml) dan kelompok E (1,5 ml) mengandung molekul sulfur (S) berlebihan yang tidak berikatan dengan molekul Cl. Berdasarkan nomor atomnya (16) diketahui bahwa sulfur tidak stabil didalam tubuh sehingga menjadi radikal bebas dan berusaha untuk melengkapi lapisan terluar tersebut agar lebih stabil dengan cara mengikat molekul-molekul lain (Ambarsani dkk, 2013).

5.2 Potensi Terapi Preventif Air Perasan Bawang Putih (*Allium sativum*) terhadap Histopatologi Jejunum pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Rhodamin B melalui Pakan.

Penelitian ini menggunakan parameter histopatologi jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan melihat perubahan mikroskopis menggunakan pewarnaan Hemaktoksin-Eosin (HE) pada setiap kelompok perlakuannya. Perubahan histopatologi jejunum dianalisa secara deskriptif dengan cara membandingkan gambaran histopatologi organ jejunum dari masing-masing perlakuan yang terlihat di mikroskop dengan perbesaran 400x dan pada perlakuan tikus kontrol negatif digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya perubahan gambaran histopatologi pada kelompok lain. Perubahan yang diamati meliputi infiltrasi sel radang, ruptur sel epitel dan hipertrofi sel goblet. Dibawah ini adalah gambar hasil histopatologi dari penelitian yang dilakukan (**Gambar**

5.1) :



Gambar 5.1 Histopatologi jejunum tikus putih dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE), perbesaran 400x.

Keterangan:

(A) Tikus kontrol negatif; (B) tikus kontrol positif; (C) air perasan bawang putih 0,5 ml; (D) air perasan bawang putih 1 ml; (E) air perasan bawang putih 1,5 ml. Tanda panah merah (→) menunjukkan ruptur sel epitel, tanda panah biru (→) menunjukkan adanya sel goblet mengalami hipertrofi, tanda panah kuning (→) menunjukkan adanya infiltrasi sel radang.

Insert: infiltrasi sel radang.

Hasil histopatologi jejunum penelitian ini dibuat pada masing-masing kelompok perlakuan yaitu kelompok A, merupakan kelompok kontrol negatif yang diberi pakan standar, kelompok B (kontrol positif) mendapatkan pakan yang dicampur dengan rhodamin B sebesar 6 mg/200g BB dalam 10 gram pakan per hari; kelompok perlakuan terapi C, D dan E diterapi dengan pemberian 0,5 ml/200g BB, 1 ml/200g BB dan 1,5 ml/200g BB air perasan bawang putih dan pakan rhodamin B.

Gambaran histologi jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok A (K-) (**Gambar 5.1 A**) menunjukkan bahwa tunika mukosa jejunum dalam kondisi normal dan tidak ditemukan adanya kerusakan. Hal tersebut ditandai dengan sel epitel kolumnar selapis berbentuk utuh dan tersusun secara teratur sebaris. Diantara sel-sel epitel terdapat sel goblet berfungsi untuk melindungi dan melumasi lapisan usus dengan cara menghasilkan mucin glikoprotein (Mescher, 2010). Jejunum merupakan organ bagian dari usus halus setelah duodenum yang berhubungan langsung dengan lambung. Struktur jejunum secara mikroskopis dari dalam ke luar tersusun atas tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis (interna dan eksterna), dan tunika serosa. Tunika mukosa merupakan lamina propria yang menonjol ke lumen seperti jari-jari (vili) yang dibatasi oleh jaringan epitel (Junquiera dan Carneiro, 2005). Sebagian besar penyerapan karbohidrat dan lipid terjadi di duodenum dan jejunum bagian atas (Abdi, 2012).

Gambaran histopatologi jejunum tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok B (K+) (**Gambar 5.1 B**) ditemukan adanya kerusakan tunika mukosa yang ditandai permukaan vili menjadi kasar, terdapat banyak sel epitel yang mengalami ruptur,

infiltrasi sel radang dan ditemukan sel-sel goblet yang mengalami hipertrofi, hal ini dikarenakan sel goblet berusaha melindungi vili jejunum dari Cl dengan menghasilkan mukus. Dalam proses pencernaan, vili usus halus memiliki peranan penting dalam proses absorpsi nutrisi dan air karena tersusun atas sel absorbtif yang berupa epitel kolumnar selapis dengan *striated border* di vili tunika mukosa. Ingesti bahan aktif rhodamin B (Cl) ke dalam sistem pencernaan akan terabsorpsi oleh vili usus dan mengakibatkan ulserasi gastrointestinal yang dapat berdampak pada pemendekan bahkan kehilangan vili duodenum, jejunum, maupun ileum (Purnama, dkk., 2013). Radikal bebas yang berasal dari Rhodamin B bersifat tidak stabil secara cepat akan merebut elektron yang ada pada makromolekul biologis sel organ jejunum dan memicu terjadinya inflamasi. Terjadinya inflamasi pada organ jejunum akan mengaktifasi sel radang untuk menuju tempat terjadinya inflamasi.

Molekul klorin (Cl) yang tidak stabil dalam rhodamin B tersebut menginduksi pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS tersebut menyebabkan terjadinya stres oksidatif diberbagai tipe sel dan jaringan. Stres oksidatif mengakibatkan kerusakan komponen-komponen tubuh termasuk struktur lipid. Membran sel tersusun atas karbohidrat, protein, dan lipid yang tersusun secara bilayer (Pratiwi dkk, 2013). Menurut Abdi (2012), inflamasi pada jejunum ditandai dengan adanya infiltrasi sel-sel radang seperti limfosit, neutrofil, tunika mukosa mengalami edema, kerusakan sel epitel kolumnar, serta hipertrofi sel goblet. Terjadinya hipertrofi sel goblet merupakan bentuk adaptasi sel goblet sebagai respon terjadinya kerusakan atau inflamasi. Kondisi inflamasi

menyebabkan sel goblet memproduksi mukus yang berlebih untuk melindungi permukaan jaringan dari inflamasi. Mukus yang dihasilkan sel goblet berfungsi untuk melindungi permukaan jaringan dari mikroorganisme atau partikel yang berbahaya. Apabila terjadi infeksi maka sel goblet akan mengeluarkan mucus lebih banyak untuk mempercepat pengeluaran kerusakan sel tersebut (Griggs, 2005).

Menurut Robbins *et al* (2007) hipertrofi merupakan kelainan progresif berupa bertambahnya isi atau volume suatu jaringan atau alat tubuh yang terjadi pada sel-sel yang tidak dapat memperbanyak diri sehingga sel-sel yang menyusun jaringan tersebut membesar. Pada kondisi tersebut membesarnya jaringan disebabkan sel-sel yang menyusunya membesar, bukan karena bertambahnya jumlah sel. Derajat kerusakan yang terjadi pada jejunum tergantung pada dosis, konsentrasi, dan lama paparan rhodamin B. Pada penelitian ini digunakan dosis paparan 600 ppm yang diberikan secara per oral dicampur pakan selama 14 hari.

Gambaran histopatologi jejunum kelompok tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok C (0,5 ml) (**Gambar 5.1 C**) terdapat pencegahan kerusakan vili jejunum dan lebih mendekati gambaran histopatologi kelompok A (K-) (**Gambar 5.2 A**). Banyak sel-sel epitel yang terlindungi, namun masih terdapat kerusakan.

Jumlah sel goblet yang muncul pada gambaran histopatologi jejunum kelompok C (0,5 ml) lebih sedikit mendekati kelompok A (kontrol negatif) dibandingkan kelompok lainnya. Pencegahan terjadi karena kandungan allisin dalam bawang putih (*Allium sativum*). Allisin merupakan antioksidan utama dalam bawang putih. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi,

dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Ambarsani dkk, 2013). molekul sulfur (S) pada allisin akan berikatan dengan molekul Cl dalam rhodamin B sehingga meminimalkan pembentukan ROS karena akan membentuk SCl_2 yang stabil. Keadaan tersebut menghambat reaksi berantai dari pembentukan ROS sehingga peroksidasi lipid pada membran sel epitel tidak terjadi dan menghambat adanya kerusakan pada vili jejunum.

Peroksidasi lipid menyebabkan membran sel mengalami kerusakan dan dapat menyebabkan sel kehilangan fungsi selulernya hingga secara total. Menurut Astuti (2008), terdapat 3 mekanisme kerusakan membran sel, yaitu (1) Terjadinya ikatan kovalen antara radikal bebas dengan komponen penyusun membran mengakibatkan perubahan struktur dan fungsi reseptor; (2) Oksidasi gugus *thiol* pada komponen membran oleh radikal bebas sehingga menyebabkan proses transpor yang terjadi pada membran terganggu; (3) Reaksi peroksidasi lipid membran yang mengandung PUFA. Target dari ROS yaitu lipoprotein, protein, asam lemak tak jenuh, unsur RNA dan DNA termasuk karbohidrat. Pada jejunum, peroksidasi lipid tersebut mengakibatkan kerusakan membran sel epitel, permukaan tunika mukosa menjadi kasar dan *irregular*.

Gambaran histopatologi jejunum pada kelompok D (1 ml) (**Gambar 5.1 D**) dan E (1,5 ml) (**Gambar 5.1 E**) lebih parah dibandingkan kelompok C (0,5 ml) dan lebih baik dari kelompok B (K+). Hal tersebut dikarenakan pada pemberian volume 1 ml dan 1,5 ml menyebabkan kelebihan molekul sulfur (S) pada allisin yang sudah tidak berikatan lagi dengan radikal bebas yang berasal dari rhodamin B (Cl) sehingga mengakibatkan meningkatnya produksi ROS.

Efek samping dari alisin yang berlebihan memiliki sifat prooksidan dan tidak dapat dinetralisir di dalam tubuh. Allisin mempunyai sifat pengoksidasi dan dalam keadaan yang berlebih mampu mengoksidasi tiol dalam sel, misalnya glutathione dan protein yang mengandung sistein. Oksidasi glutathione yang berlebih menyebabkan potensi redoks seluler yang lebih tinggi. Oksidasi tiol protein dapat menyebabkan perubahan struktur protein melalui formasi ikatan disulfida. Perubahan struktural yang dipicu redoks dalam protein dapat menyebabkan hilangnya fungsi. Kondisi ini yang menyebabkan kerusakan sel epitel pada vili jejunum (Ambarsani dkk, 2013).



DAFTAR PUSTAKA

- Abdi, R.W. 2012. *Pengaruh Formalin Perora Dosis Bertingkat Selama 12 Minggu Terhadap Gambaran Histologis Duodenum Tikus Wistar*. Skripsi . Universitas Diponegoro. Fakultas Kedokteran.
- Adiyati, PN. 2011. *Ragam Jenis Ektoparasit Pada Hewan Coba Tikus Putih (Rattus novergicus) Galur Sparague Dawley*. Skripsi. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor
- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr* 131:955S-962S.
- Ambarsani, I. Qanytah . Sarjana .2013. Perubahan Aktivitas Antioksidan pada bawang Putih Selama Proses Pengolahan dan Penyimpanan. *Buletin teknologi Pascapanen Pertanian* Vol 9 (2) 64-73.
- Andru, Gestana. 2009. Efek Minyak Atsiri Dari Bawang Putih (*Allium sativum*) Terhadap Jumlah Monosit Tikus Wistar yang Diberi Diet Kuning Terlur [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Undip. Semarang.
- Astuti, S. 2008. Isoflavon Kedelai Dan Potensinya Sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri Dan Hasil Pertanian* 13(2).
- Brantom, Paul G. 2005. Review of the Toxicology of a number of dyes illegally present in food in the EU. *The EFSA Journal* (263):15-71.
- Bratawidjaja K, Rengganis I. *Imunologi Dasar*, Edisi Kedelapan. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Indonesia; 2009.
- Cahyadi. W. 2009. *Analisis & Aspek Kesehatan Bahan Tambahan Pangan*. Edisi Kedua. Jakarta: Bumi Aksara. Halaman 134
- CTFA (Cosmetic Toiletry and Fragrance Association). 1991. *CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary*. Nikitakis, J.M., McEwen, G.N. and Wenninger, J.A. CTFA Washington, DC.
- Fujii, J., Y. Iuchi, S. Matsuki, and T. Ishii. 2003. Cooperative Function of Antioxidant and Redox Systems Against Oxidative Stress in Male Reproductive Tissues. *Asian J. Androl.* 5: 231-242.
- Griggs, J.P. and Jacob, J.P. 2005. Alternatives to Antibiotics for Organic Poultry Production. *Journal. Appl. Poult. Res.* 14:750-756.

- Handayani, L., 2006. Potensi Bawang Putih Sebagai Obat Tradisional/Herbal dalam Pelayanan Kesehatan. *Majalah Kedokteran Indonesia*. Issn : 0377-1121. Vol. 56, No. 2. Jakarta. Hal : 64-70.
- Hardiany N. S. 2013. *Cathepsin dan Calpain : Enzim Pemecah protein dalam Sel*. Vol. 1 No. 1. Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler. Fakultas kedokteran Universitas Indonesia.
- Hattenschwiller, S dan Vitousek, P. M. 2000. The role of polyphenols interrestrial ecosystem nutrient cycling. *Review PII: S0169-5347(00)01861-9 TREE* vol. 15, no. 6 June 2000.
- Hernawan, U, E dan Ahmad Ds. 2003. Review: Senyawa Organosulfur Bawang Putih (*Allium sativum L.*) dan Aktivitas Biologinya. *Review: Organosulphure Compound Of Garlic (Allium sativum L.) and Its Biological Activities*. Jurusan Biologi FMIPA UNS. Surakarta. *Biofarmasi 1* (2): 65-76.
- Hidayat Nur. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta C.V. Andi Offset
- Judarwanto W. 2009. Perilaku makan anak sekolah. Jakarta.
- Junquiera, L.C. dan Carneiro, J. 2005. *Basic Histology: Text and Atlas*. Edisi ke-11. New York: McGraw-Hill Companies.
- Kusmayadi, Ayi dan Dadang Sukandar. 2008. Cara Memilih dan Mengolah Makana Untuk Perbaikan Gizi Masyarakat <http://database.deptan.go.id>
- Kusriningrum, R.S. 2008. *Perancangan Percobaan: Untuk Penelitian Bidang Biologi, Pertanian, Peternakan, Perikanan, Kedokteran, Kedokteran Hewan, Farmasi*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Lawrence Reena and Lawrence Kapil. 2011. *Antioxidant activity of Garlic Essential Oil (Allium sativum) Grown in North Indian Plants*. Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine. 1-3
- Lee, J., N. Koo, and D.B. Min. 2004. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Compre Rev. in Food Sci. and Food Safety* 3: 21-33.
- Lee, M.S. 2006. Matrix-Degrading Type II Transmembrane Serine Protease Matriptase : Its Role in Cancer Development and Malignancy. *J. Cancer Mol.* 2(5): 183-190.

- Lee, T.A., Sci, B.H. and Counsel. 2005. The food from hell: food colouring. The Internet Journal of Toxicology. Vol 2: (2) China: Queers Network Research.
- Levi, P.E. 1987. Toxic Action in Modern Toxycology, editor : Hodgson, E and Levi, P.E. Elsevier London. Elsevier Science Publishing Co.Inc. New York.
- Mahdi, C. 2010. Bahaya Makanan Berformalin dan Cara Mengatasinya. Pidato Pengukuhan Guru Besar dalam Bidang Ilmu Biokmia.
- Malole, M. B. M. dan C. S. Pramono. 1989. Penggunaan Hewan-hewan Percobaan Laboratorium. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Manurung RD. 2011. Manfaat pemberian madu terhadap perubahan kadar ureum dan kreatinin serta makroskopik ginjal dan histopatologi tubulus proksimal ginjal mencit (*Mus musculus l.*) jantan yang diberi rhodamin B. Tesis. Medan: Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
- Mescher, A.L. 2010. Junqueira's Basic Histology, Text & atlas Twelfth Edition. The McGraw-Hill Companies, Inc. United States of America.
- Motyán, J.A., T. Ferenc and T. Jozsef. 2013. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules* 3:923-942.
- Nadzifa Ima. 2010. Pengaruh Air Perasan Bawang Putih Lanang (*Allium Sativum*) Terhadap Kadar Glukosa Darah dan Gambaran Histopatologi Pankreas pada Mencit (*Mus musculus*) Diabetes Melitus:Skripsi. Malang. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam dan Negeri (UIN).
- Nuraini, A. D. 2002. Isolasi dan Karakteristik Enzim Protease dari *Bacillus Laterosporus* [Skripsi]. Fakultas MIPA. Universitas Brawijaya.
- Nurmasari, R., Astuti, M. D., Umaningrum, D., Khusnaria, D. A. 2014. Kajian Adsorpsi Rhodamin B pada Humin, Prosiding Seminar Nasional Kimia, ISBN:978-602-0951-00-3
- Pipih, S., dan Juli, S.S. (2000). Uji toksisitas zat warna makanan Rhodamin B terhadap jaringan hati Mencit (*Mus Musculus*) Galur Australia, *Jurnal Toksikologi Indonesia*, 1(3), 18-27, Desember 2000
- Pratiwi, A.D., Aulanni'am dan Sutrisno. 2013. Aktivitas Protease dan Profil Protein pada Hepar Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Pasca Induksi *Cylosporine-A*. *Kimia Student Journal*. 1(1):105-111.

- Punama, M.T.E., N.M.R. Widjaya, dan H. Plumeriastuti. 2013. Pengaruh Boraks terhadap Gambaran Histopatologi Duodenum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) . *Veterinaria medika* 6(2).
- Qidwai, W., R. Qureshi, S.N. Hasan, S.I. Azam. 2000. Effect of dietary garlic (*Allium sativum*) on the blood pressure in humans: a pilot study. *Journal of Pakistani Medical Association* 50 (6): 204–207.
- Rahayu, YS. 2007. *Khasiat Ekstrak Ramuan Daun Jati Belanda Terhadap Konsentrasi Kolesterol Hati Tikus Yang Hiperlipidemia*. FMIPA Institut Pertanian Bogor.
- Robbins, Kumar and Cotran,. 2007. *Buku Ajar Patologi*. Jakarta: EGC. hlm. 796.
- Sajuthi, D.I. Suoparto, Yanti dan W.,Praira. 2010. Purifikasi dan pencirian Enzim Protease Fibrinolitik dari Ekstrak Jamur Merang. *Makara, Sains* 14:145-150.
- Santoso, H.B. 2000. *Bawang Putih*. Edisi ke-12. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Saptono, H. 2014. Terapi Perasan Buah Labu Siam (*Sechium edule*) terhadap Aktivitas Protease dan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus (*Rattus norvegicus*) IBD (*Inflammatory bowel disease*) Hasil Induksi Indometasin [Skripsi]. Program Kedokteran Hewan. Brawijaya University Press.
- Sirois M. 2005. *Laboratory animal medicine: Principles and procedures*. United States of America: Mosby, Inc.
- Subandi, 1999, Penelitian Kadar Arsen dan Timbal Dalam Pewarna Rhodamine B dan Auramine Secara Spektrofotometri, Suatu penelitian pendahuluan. <http://www.malang.ac.id/jurnal/fmipa/mipa/1999a.htm>, (diakses tanggal 30 September 2006)
- Sunarto & Pikir. 1995. Modern Herbal : Garlic. <http://www.botanical.com>
- Suryohudoyo, P. 2007. *Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler*. CV Sagung Seto, Jakarta
- Syamsiah, I.S dan Tajudin, 2003. *Khasiat & Manfaat Bawang Putih*. AgroMedia Pustaka, Jakarta.
- Schwartz. I.F., R. Hershokovitz, A. Iaina, E. Gnessin, Y. Wollman, T. Chernikowski, M. Blum, Y. Levo, And D. Schwartz. 2002. Garlic Attenuates Nitric Oxide Production In Rat Cardiac Myocytes Through Inhibition Of Inducible Nitric Oxide Synthase And The Arginine Transporter Cat-2 (Cationic Amino Acid Transporter-2). *Clinical Science* 102: 487–493.

The Efsa Journal (2005) 263, P 34-37 . Opinion Of The Scientific Panel On Food Additives, Flavourings, Processing Aids And Materials In Contact With Food.

Trestiati, Mela. 2003. Analisis Rhodamin B pada Makanan dan Minuman Jajanan Anak SD (Studi Kasus : Sekolah Dasar di Kecamatan Margaasih Kabupaten Bandung). Tesis.Pascasarjana Fakultas Kesehatan Lingkungan, Bandung

Untari, I. 2010. Bawang Putih sebagai Obat Paling Mujarab Bagi Kesehatan. *GASTER*, Vol. 7 No. 1 Februari 2010.

Wati, I.P., Aulanni'am dan C. Mahdi. 2013. Aktivitas Protease dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi Cyclosporine-A. *Universitas Brawijaya Malang. Kimia. Student Journal* 1 (2) : 258.

Winarno, F. G., 2002. *Keamanan Pangan dan Gizi*. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama.

Winarno, F.G. 2004. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta : PT Gramedia Pustaka Utama.

Winarsi H, 2007 . Antioksidan Alami dan Radikal Bebas. Cetakan ke-5. Kanisius. Yogyakarta. Hal : 122-204.

Xiong C S. 2001. *Design and synthesis of Rhodamine 110 derivative and Caspase-3 substrate for enzyme and cell-based fluorescent assay*. *Bioorganic & Medical Chem Lett.*(11);39-42.

Yamlean, P. V. Y. 2011. Identifikasi dan Penetapan Kadar Rhodamin B pada Jajanan Kue Berwarna Merah Muda yang Beredar di Kota Manado. *Jurnal Ilmiah Sains* Vol. 11 No. 2

Yuhua, W.F.D, Eddy S. 2001. Buku Pintar : Terapi Jahe Dan Bawang Putih. Taramedia & Restu Agung. Jakarta

Yulianti, Nurheti. 2007. *Awas ! Bahaya Dibalik lezatnya Makanan*.Edisi Pertama. Yogyakarta: CV.ANDI offset :92-93

Zakaria, F.R.1996. Sintesis Senyawa Radikal dan Elektrofil Dalam dan Oleh Komponen Pangan. Editor : Zakaria, F.R., Dewanti, R dan Yasni, S. Prosiding Seminar Senyawa Radikal dan Sistem Pangan. Pusat Studi Pangan dan Gizi.IPB dan Kedutaan Besar Perancis Jakarta.