

repository.ub.ac.id

**PENGARUH TERAPI EKSTRAK DAUN PUTRI MALU
(*Mimosa pudica*, Linn) TERHADAP AKTIVITAS
ENZIM SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD)
DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI
PARU PADA TIKUS (*Rattus
norvegicus*) MODEL ASMA**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

YEHUDA LAKSANA AJI

10513010111101



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Terapi Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*,
Linn) Terhadap Aktifitas Enzim Superoksida Dismutase
(SOD) dan Gambaran Histopatologi Paru
pada Tikus (*Rattus norvegicus*)
Model Asma**

Oleh :
YEHUDA LAKSANA AJI
10513010111101

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 21 Agustus 2014
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 1898802 2 001

Pembimbing II

Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc
NIP. 19820914 200912 2 004

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Hewan
Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 1898802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yehuda Laksana Aji

NIM : 105130101111101

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul : Pengaruh Terapi Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*, Linn) Terhadap Aktifitas Enzim Superoksida Dismutase (SOD) dan Gambaran Histopatologi Paru pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma.

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah 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 2014
Yang menyatakan

(Yehuda Laksana Aji)
NIM.105130101111101

repository.ub.ac.id

Pengaruh Terapi Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*, Linn) Terhadap Aktifitas Enzim Superoksida Dismutase (SOD) dan Gambaran Histopatologi Paru pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma

ABSTRAK

Asma adalah penyakit yang diakibatkan inflamasi kronis pada saluran pernafasan. Angka prevalensi asma pada hewan kesayangan seperti anjing dan kucing sangatlah tinggi. Asma pada hewan dapat diperparah dengan adanya *plaque* pada gigi karena infeksi bakteri Gram negatif. Putri malu (*Mimosa pudica*, L) memiliki kandungan flavonoid tinggi yang dapat digunakan sebagai antiinflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh terapi ekstrak daun putri malu terhadap aktivitas enzim *Superoksida Dismutase* (SOD) dan gambaran histopatologi paru pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma. Penelitian ini dibagi dalam 4 kelompok tikus yang terdiri dari kelompok A (kontrol), kelompok B (Asma/Positif), kelompok C (Tikus asma dengan terapi dosis 500 mg/kg BB), kelompok D (Tikus asma dengan terapi dosis 1000 mg/kg BB). Aktivitas enzim *Superoksida Dismutase* diukur menggunakan tehnik ELISA. Sedangkan gambaran histopatologi bronkiolus paru diamati secara kualitatif menggunakan mikroskop BX51. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun putri malu dapat meningkatkan aktivitas enzim SOD secara signifikan ($p < 0,05$) antar perlakuan. Peningkatan terbaik pada terapi ekstrak daun putri malu dengan dosis 1000 mg/kg BB sebesar 34,87% terhadap tikus asma. Pengamatan gambaran histopatologi pada bronkiolus menunjukkan adanya perbaikan kondisi dari hipertropi otot polos bronkiolus menjadi bentuk yang mendekati normal. Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian terapi ekstrak daun putri malu dapat meningkatkan aktivitas enzim SOD dan perbaikan otot polos bronkiolus.

Kata kunci : Asma, SOD, *Mimosa pudica*, L, Histopatologi

Therapeutic Effect of *Mimosa pudica*, Linn Extract toward Superoxide Dismutase (SOD) Enzyme Activity and Lung Histopathology on Asthma Rats (*Rattus norvegicus*)

ABSTRACT

Asthma is a respiratory disease caused by chronic inflammation. It has been reported that prevalence of asthma in pets (i.e dog and cat) is very high. Asthma in animal can be compounded by the teeth plaque due to Gram-negative bacteria infection. *Mimosa pudica*, Linn has a high flavonoid content and can be used as anti-inflammation. This research was conducted to study therapeutic effect of *Mimosa pudica*, Linn extract toward Superoxide Dismutase (SOD) activity and lung histopathology on Asthma Rats (*Rattus norvegicus*). Four groups of rats in this research were A group (control), B group (asthma/positive), C group (asthma and *Mimosa pudica*, Linn extract therapy dose of 500 mg/kg BW), and D group (asthma and *Mimosa pudica*, Linn extract therapy dose of 1000 mg/kg BW). SOD activity was assessed by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) technique. The lung histopathology was observed microscopically. The result showed that therapy of *Mimosa pudica*, Linn extract could increase SOD activity significantly ($p < 0.05$). The best increasing of SOD activity showed by applying *Mimosa pudica*, Linn extract therapy dose of 1000 mg/kg BW. The histopathology observation of bronchioles showed repairment of bronchioles smooth muscle (BSM) from hypertrophy closed to normal condition. It can be concluded that *Mimosa pudica*, Linn extract have therapeutic effect based on increasing the SOD activity and repairing BSM.

Key Words : Asthma, SOD, *Mimosa pudica*, Linn, Histopathology

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan yang telah melimpahkan berkat dan kasih-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Terapi Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*, Linn) Terhadap Aktifitas Enzim Superoksida Dismutase (SOD) dan Gambaran Histopatologi Paru pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma”**. Penelitian ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan pada Program Kedokteran Hewan, Program Studi Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya.

Penyusun menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada seluruh pihak yang telah membantu membimbing dalam menyelesaikan skripsi ini, secara khusus penyusun menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Pembimbing I atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu dalam penulisan laporan ini.
2. Dyah Kinasih Wuragil, SS.Si, MP., M.Sc selaku dosen Pembimbing II atas bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu dalam penulisan laporan ini.
3. drh. Herlina Pratiwi dan drh. Tiara Widyaputri selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu serta memberikan saran yang membangun.
4. Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si selaku Ketua Program Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan PKH UB tercinta.
5. Andreas Kateno S.Pd., dan Endang Sri Widayanti selaku orang tua, Palupi Tyas Asih selaku kakak, dan Alief Candra Darmawan selaku adik penulis serta Saudara-saudari penulis yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang senantiasa memberikan bantuan doa, motivasi maupun materi sehingga penulis dapat semangat tiada henti dalam menyelesaikan kuliahnya.
6. Seluruh staf serta asisten Laboratorium Biokimia dan Biologi Seluler Fakultas MIPA Universitas Brawijaya khususnya Vivi Shovia, Riska Nizar Rini, dan Noer M. Dliyaul Haq, serta mbak NINIK selaku asisten pendamping, juga Pak Har yang telah membantu dalam pemeliharaan hewan coba.

7. Seluruh Dosen, Staff dan Karyawan PKH UB yang telah banyak membantu penulis dalam kuliah nya.
8. Tim Penelitian “Mimo Team” khususnya Rizy Ahmada, Anita Wanda S., Hadlrotus Okvianty M.P., Nisa Mufidah, Adekhantari Yuanda A., dan Mohan Ari S. atas kerjasama dan cintanya selama penelitian dan laporan skripsi dapat ditulis.
9. Keluarga besar COMPAC dan RUMPIK FAMS serta terkhusus Yudis, Arif, Vincent, Tintus, dan Dimas (konco plek teko awal) serta Aman, Habyb, Nella, Gigih, Hendra, Tika dan lain-lain yang telah menjadi keluarga baru selama proses pendidikan di Kedokteran hewan dan menjadi pendorong untuk meraih kesuksesan.
10. Keluarga besar GELANG 28, BESWAN DJARUM 28 yang membuat hidup penulis semakin berarti dan penuh warna.
11. Keluarga besar IMPROVE khususnya IMPROVE KERTAS, “Orang besar berasal dari ternak besar”. Maju terus, jadilah contoh yang baik untuk organisasi yang lainnya.
12. Terkhusus buat KAMU, yang selalu memberikan semangat dan cinta yang tulus dari dalam lubuk hati.
13. Kolega 2008, 2009, 2010, 2011, 2012 dan 2013 PKH UB yang selalu membantu, memberikan dorongan, semangat dan keceriaan.
14. Dan semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan karya tulis ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Tuhan memberkati kita semua dan Skripsi ini dapat bermanfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

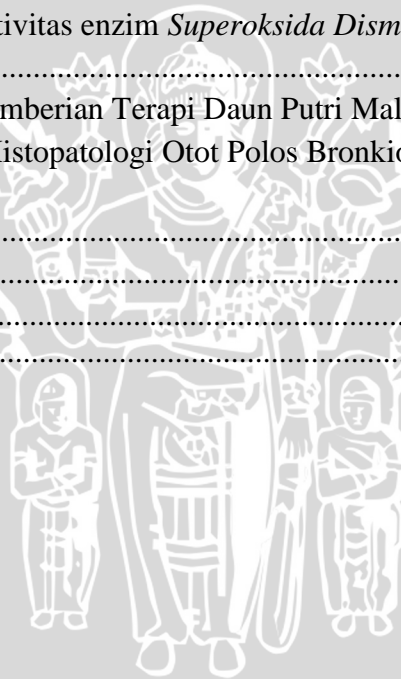
Malang, 21 Agustus 2014

Penulis

DAFTAR ISI

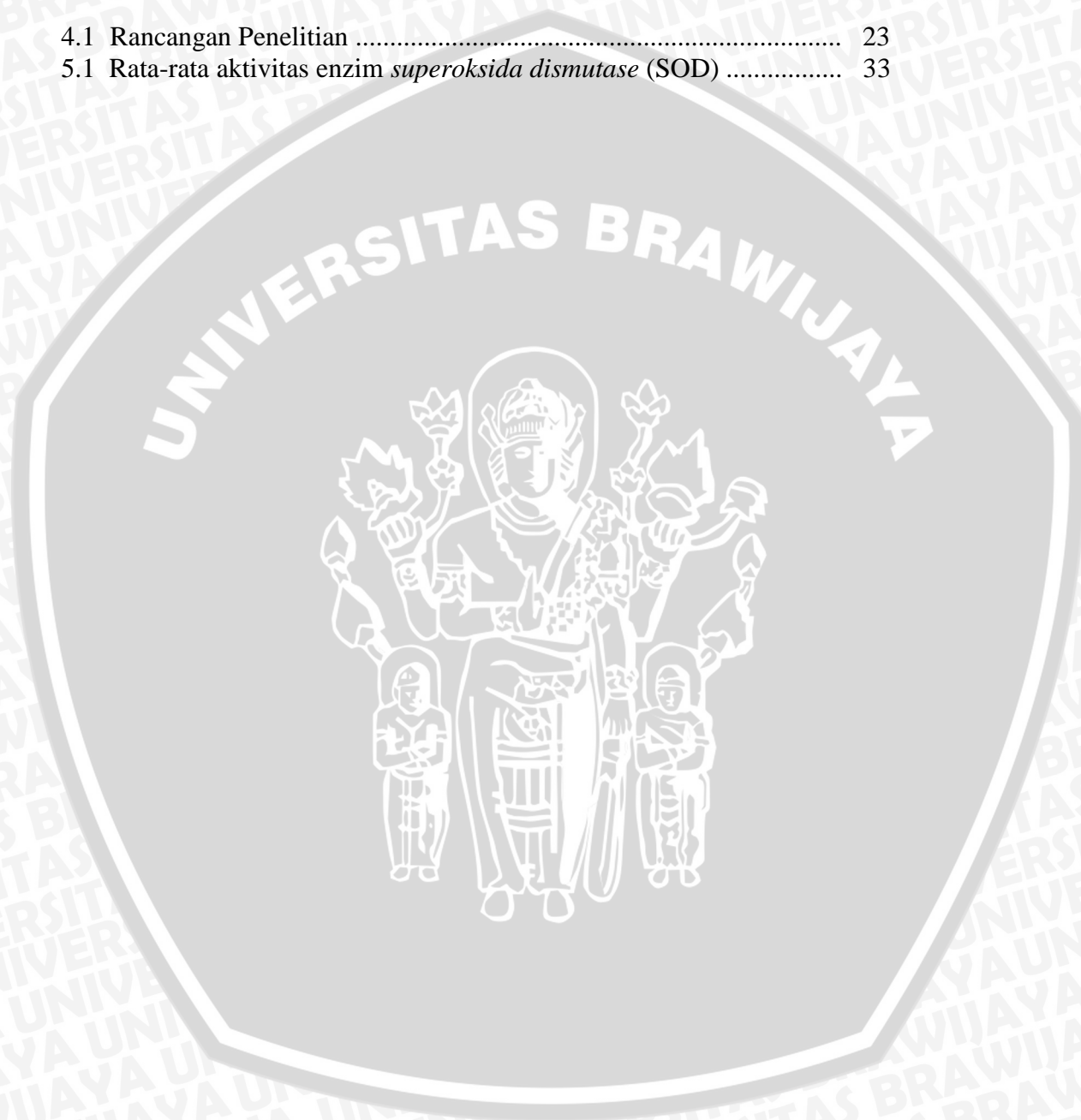
	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG.....	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Batasan Masalah	4
1.4. Tujuan Penelitian	5
1.5. Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Asma	7
2.2 Histopatologi Paru Asma	9
2.3 Radikal Bebas dan Enzim Superoksida Dismutase (SOD)....	11
2.4 Putri Malu (<i>Mimosa pudica</i> , Linn)	13
2.5 Hewan Coba Tikus	14
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konsep	19
3.2 Hipotesis Penelitian.....	21
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	
4.1 Waktudan Tempat Penelitian	22
4.2 Sampel Penelitian.....	22
4.3 Rancangan Penelitian	23
4.4 Variabel Penelitian	23
4.5 Materi Penelitian	24
4.6 Tahapan Penelitian	24
4.6.1 Persiapan Hewan Percobaan	24
4.6.2 Persiapan Hewan Model Asma dengan Ovalbumin	25
4.6.3 Tatalaksana Injeksi Lipopolisakarida (LPS)	26
4.6.4 Metode Ekstraksi <i>Mimosa pudica</i> ,Linn	26
4.6.5 Pemberian Terapi Ekstrak <i>Mimosa pudica</i> ,Linn	27
4.6.6 Pengambilan Organ Paru	27
4.6.7 Pengukuran Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD)	28

4.6.7.1	Persiapan Sampel	28
4.6.7.2	Penentuan Aktivitas Superoksida Dismutase....	29
4.6.8	Pembuatan Preparat Histologi.....	29
a.	Pengambilan Sampel, Fiksasi dan Pemotongan Organ	29
b.	Dehidrasi dan Infiltrasi.....	29
c.	Penjernihan (<i>Clearing</i>)	30
d.	Infiltrasi Parafin	30
e.	Penanaman Jaringan (<i>Embedding</i>).....	30
f.	Pewarnaan Hemaktosilin – Eosin (HE)	31
g.	Pengamatan Preparat HE	32
4.7	Analisis Data	32
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN		
5.1	Pengaruh Ekstrak Daun Putri Malu (<i>Mimosa pudica</i>) Terhadap aktivitas enzim <i>Superoksida Dismutase</i> (SOD)	33
5.2	Pengaruh Pemberian Terapi Daun Putri Malu terhadap Gambaran Histopatologi Otot Polos Bronkiolus	36
BAB 6 PENUTUP		
6.1	Kesimpulan	41
6.2	Saran	41
DAFTAR PUSTAKA		42
LAMPIRAN		45



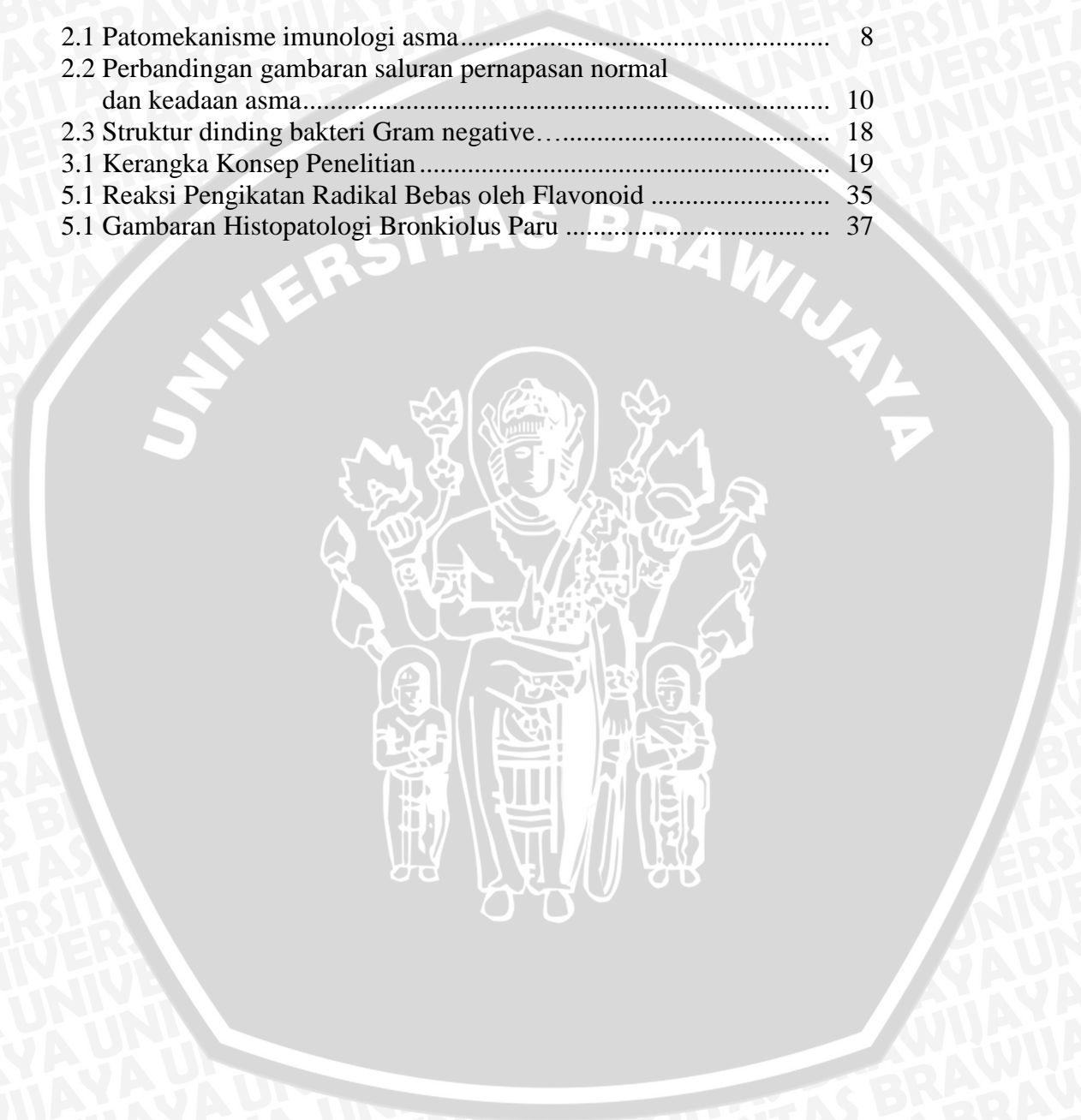
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian	23
5.1 Rata-rata aktivitas enzim <i>superoksida dismutase</i> (SOD)	33



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Patomekanisme imunologi asma.....	8
2.2 Perbandingan gambaran saluran pernapasan normal dan keadaan asma.....	10
2.3 Struktur dinding bakteri Gram negative.....	18
3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	19
5.1 Reaksi Pengikatan Radikal Bebas oleh Flavonoid	35
5.1 Gambaran Histopatologi Bronkiolus Paru	37



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik	45
2. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman	46
3. Hasil Uji LCMS	47
4. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian	48
5. Perhitungan Dosis	50
6. Komposisi Larutan	53
7. Diagram Kerja Penelitian	54
8. Perhitungan Aktivitas SOD	55
9. Tabel Perhitungan Aktivitas Enzim SOD	56
10. Data dan Uji Statistik Aktivitas SOD	57
11. Pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE)	59



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
AlOH ₃	<i>aluminium hydroxide</i>
BNT	beda nyata terkecil
BSM	<i>bronchioles smooth muscle</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GM-CSF	<i>granulocyte-monocyte colony stimulating factor</i>
HE	hematoksin-eosin
IgE	<i>immunoglobulin E</i>
IgG	<i>immunoglobulin G</i>
IL	<i>Interleukin</i>
LBP	<i>lyopolisaccaride binding protein</i>
LPS	<i>lipopolisakarida</i>
LSD	<i>lower significant different</i>
MD-2	<i>myeloid differentiation 2</i>
NaCl	Natrium Klorida
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PAR	<i>protease activated receptor</i>
PBS-azida	phosphate buffer saline-azida
PBS-Tween	phosphate buffer saline-tween
PFA	paraformaldehid
PG	<i>Porpyrominas gingivalis</i>
PGE2	prostaglandin
RAL	rancangan acak lengkap
ROS	<i>reactive oxygen spesies</i>
Rpm	<i>rotation per minute</i>
SOD	<i>Superoxide dismutase</i>
TCA	trichloacetic acid
Th-2	T helper 2
TLR-4	<i>tool-like receptor - 4</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor -α</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asma adalah penyakit atau kelainan yang diakibatkan inflamasi kronis pada saluran pernafasan dan memiliki dampak terhadap saluran pernafasan menjadi sensitif serta aliran udara menjadi terbatas (Anonymous, 2007). Gejala asma berhubungan dengan respon inflamasi. Inflamasi saluran pernafasan pada asma merupakan proses yang sangat kompleks, melibatkan faktor genetik, antigen, berbagai sel inflamasi, interaksi antar sel dan mediator yang membentuk proses inflamasi kronik dan *remodeling* jaringan (Sundaru, 2002). Hal ini ditegaskan oleh Barnes *et al.*, (1998) yaitu pelepasan mediator inflamasi juga mengakibatkan perubahan struktur dalam saluran pernafasan, misalnya fibrosis yang dihasilkan dari deposisi kolagen.

Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) pada tahun 1992, asma, bronkitis kronik dan emfisema merupakan penyebab kematian ke-4 di Indonesia atau sebesar 5,6 %. Tahun 1995, prevalensi asma di seluruh Indonesia sebesar 13/1000, sedangkan bronkitis kronik 11/1000 dan obstruksi paru 2/1000. Kejadian asma pada hewan kecil atau *pet animal* di Indonesia masih kurang diberitakan oleh media massa. Penelitian yang dilakukan di Barcelona, diketahui dari 26 ekor kucing (dipilih secara acak), 18 ekor menunjukkan gejala asma. Hal tersebut menegaskan bahwa asma merupakan penyakit yang serius dan memiliki nilai prevalensi yang cukup tinggi pada hewan (Anonymous, 2010).

Sel-sel inflamasi dan sel struktural yang teraktivasi akibat inflamasi pada asma akan menghasilkan oksidan reaktif dan nitrogen reaktif sebagai respon terhadap beberapa rangsangan (Caramori and Papi, 2004). *Reactive Oxygen Species (ROS)* yang dapat menyebabkan reaksi berantai dan menghasilkan senyawa radikal bebas baru dalam jumlah besar yang bersifat toksik dan mengakibatkan kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel hingga ke organ tubuh. Hal ini disebabkan adanya *lipopolisakarida (LPS)* yang menginduksi produksi dan pelepasan sel-sel radang pada kondisi asma (Beumer *et al.*, 2003). Radikal bebas yang semakin lama semakin reaktif dan antioksidan dalam tubuh tidak seimbang dapat menyebabkan stres oksidatif, hal ini ditandai dengan inaktivasi enzim antioksidan, diantaranya enzim *superoksida dismutase (SOD)*. Perubahan struktur saluran pernapasan, seperti infiltrasi sel inflamatori pada saluran pernapasan juga mempengaruhi inaktivasi enzim SOD (Caramori and Papi, 2004; Comhair *et al.*, 2005).

Pada kondisi asma, inflamasi akan menyebabkan hipertrofi kelenjar mukus dan hiperplasia sel goblet serta peningkatan eksudat inflamatori sehingga terjadi penghambatan dan peningkatan tekanan saluran napas yang akibatnya akan menutup jalur napas (Saetta and Turato, 2001). Hipersekresi mukus juga akan mengurangi gerakan silia, mempengaruhi lama inflamasi, dan menyebabkan kerusakan struktur serta fungsi epitel organ saluran pernafasan (Donno *et al.*, 2000).

Obat asma sering digunakan untuk menghilangkan dan mencegah timbulnya gejala dan obstruksi saluran pernafasan (Rogayah, 1995). Menurut

Surjanto dkk (1998), obat asma sintetis dapat dibedakan menjadi dua kelompok besar, yaitu *reliever* dan *controller*. *Reliever* adalah obat untuk menghilangkan gejala asma yaitu obstruksi saluran nafas, sedangkan *controller* adalah obat yang digunakan untuk mengendalikan asma persisten. Contoh obat *reliever* adalah agonis beta-2 yang mempunyai efek bronkodilatasi, sedangkan obat golongan *controller* contohnya kortikosteroid. Obat-obat sintetis tersebut memiliki efek samping bagi penggunaannya, seperti pada agonis beta-2 yaitu gangguan kardiovaskuler, peningkatan tekanan darah, tremor, palpitasi, takikardi dan sakit kepala.

Mimosa pudica, Linn. atau biasa disebut putri malu, merupakan golongan tanaman herbal dan memiliki kandungan kimia yang baik bagi kesehatan. Ekstrak herba putri malu mempunyai khasiat sebagai *transquilizer*, ekspektoran, deuretik, antitusif, antipiretik, dan antiinflamasi (Jayani, 2007). Hal ini ditegaskan oleh Juliet (2007), bahwa *flavonoid* adalah golongan senyawa yang di ketahui mempunyai berbagai khasiat, seperti anti radang, memperlancar pengeluaran air seni, anti virus, anti jamur, anti bakteri, antihipertensi, mampu menjaga dan meningkatkan kerja pembuluh darah kapiler.

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengkaji pengaruh terapi ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*, L) terhadap aktivitas enzim *superoksida dismutase* (SOD) dan gambaran histopatologi paru pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat ditarik suatu rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah terjadi peningkatan aktivitas SOD pada tikus model asma yang diterapi ekstrak daun *Mimosa pudica*, L?
2. Apakah ada perubahan gambaran histopatologi paru pada tikus model asma setelah diterapi ekstrak daun *Mimosa pudica*, L?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar yang diperoleh dari Laboratorium Biomol Universitas Brawijaya, memiliki umur 2-3 bulan dengan berat badan berkisar antara 150-250 gram. Penggunaan hewan coba sudah mendapatkan sertifikat laik etik No 208-KEP-UB dari komisi etik penelitian Universitas Brawijaya.
2. Pembuatan tikus asma dilakukan dengan injeksi ovalbumin dan lipopolisakarida bakteri *Phorphyromonas gingivalis* PG LPS 1435/1450 (Utomo, 2006). Perlakuan pada tikus dilakukan pada hari ke 0 dengan injeksi ovalbumin (OVA I) (*Sigma-Aldrich*) 10 µg/ml secara intraperitoneal dalam AIOH₃ dalam PBS (*phosphate buffer saline*) dan injeksi ovalbumin (OVA II) dilakukan pada hari ke-14. Pemaparan ovalbumin (OVA III) secara aerosol dilakukan pada hari ke-21 menggunakan tabung transparan yang dihubungkan dengan *Omron*

CompAir Compressor Nebulizer. Injeksi lipopolisakarida (LPS) intrasulkuler dilakukan dengan dosis 1 µg/ml pada sulkus gingiva molar rahang atas kiri tikus (Stephanie *et al.*, 2002). Injeksi LPS intrasulkuler dilakukan berturut-turut pada hari ke 10 dan 11 (Utomo, 2006)

- Putri malu yang digunakan adalah *Mimosa pudica*, L, diperoleh dari sekitar kampus Universitas Brawijaya. Putri malu kemudian dideterminasi kandungan bioaktifnya melalui uji *Liquid Chromatografi Mass Spectrofotometri* (LCMS) (Lampiran 3) oleh Laboratorium Kimia Polinema. Dosis terapi yang diberikan masing-masing 500 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB daun putri malu kering yang diekstraksi dengan air. Terapi ekstrak daun putri malu diberikan setiap hari selama 2 minggu berturut-turut (Ramadani, 2013).
- Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah aktivitas enzim SOD dan gambaran histopatologi paru. Pengukuran aktivitas SOD yang diukur menggunakan *Superoxide Dismutase Assay Kit* (Biovision, Cat K335-100). Pengamatan histopatologi bronkiolus paru dilakukan secara mikroskopis dengan perbesaran 200 X.

1.4 Tujuan Penelitian

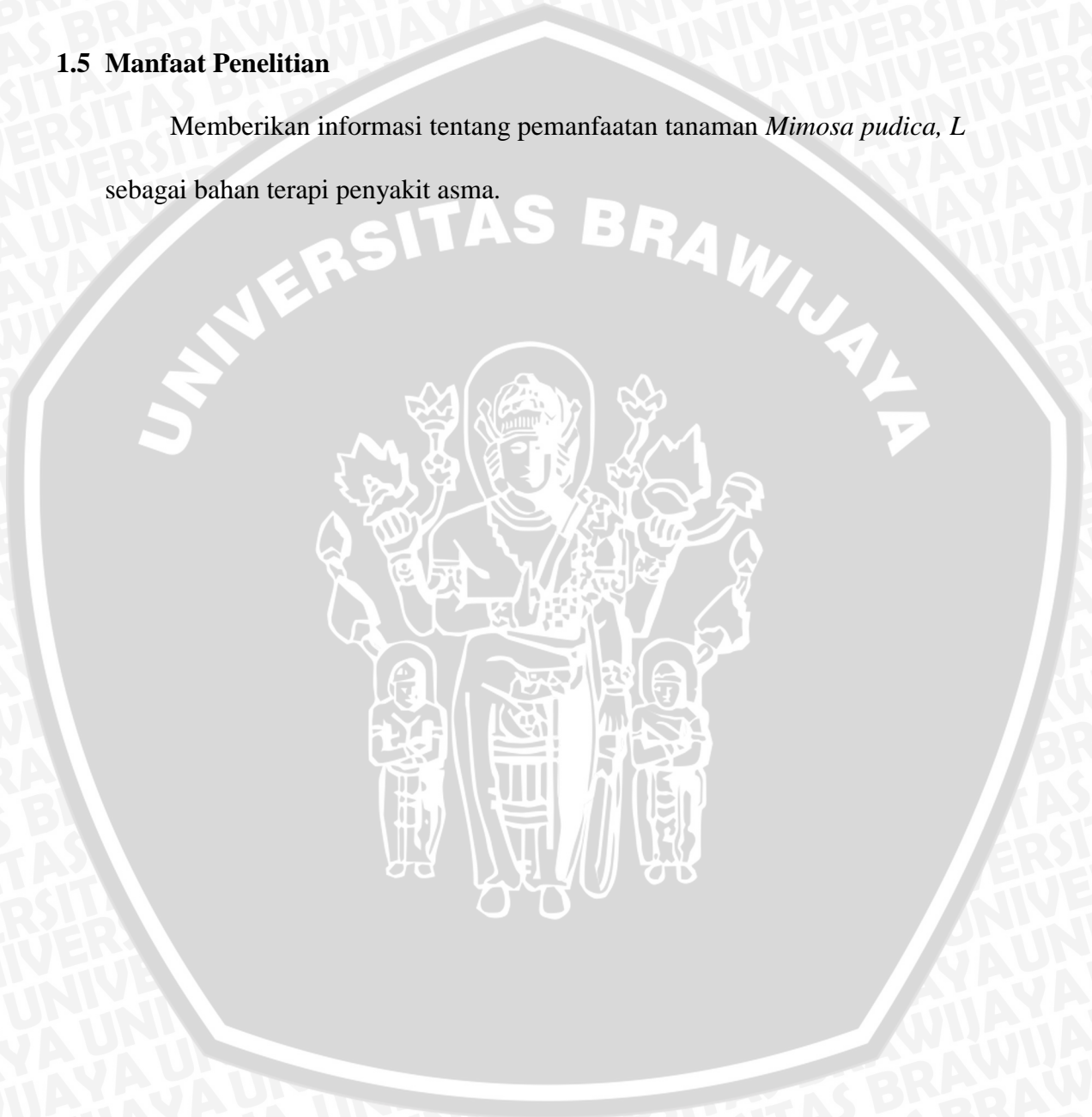
Adapun tujuan dari penelitian ini adalah :

- Mengetahui adanya perubahan aktivitas enzim SOD pada tikus model asma setelah diterapi dengan ekstrak daun *Mimosa pudica*, L.

2. Mengetahui perubahan gambar histopatologi pada paru tikus model asma setelah diterapi dengan ekstrak daun *Mimosa pudica, L.*

1.5 Manfaat Penelitian

Memberikan informasi tentang pemanfaatan tanaman *Mimosa pudica, L* sebagai bahan terapi penyakit asma.

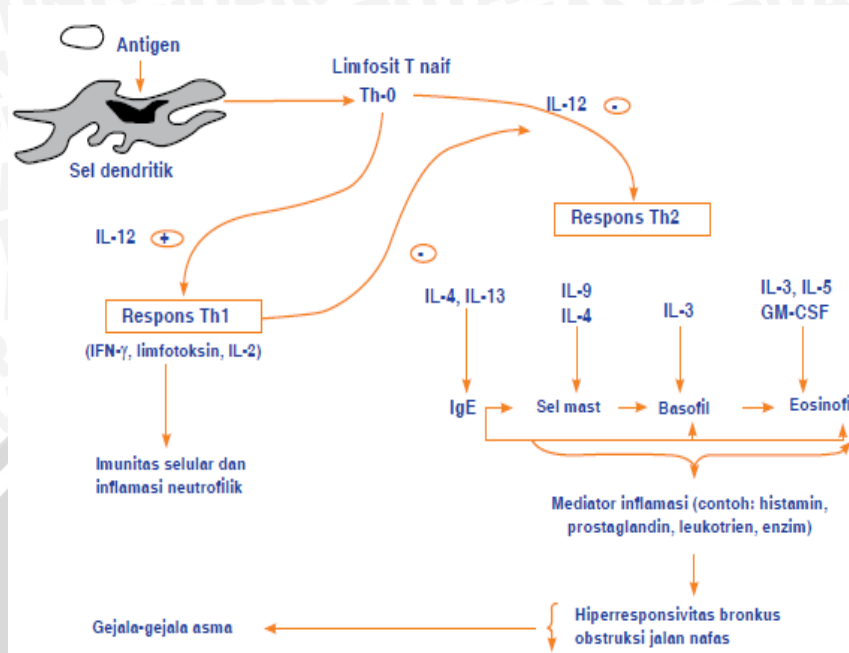


BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Asma

Asma merupakan penyakit atau kelainan akibat inflamasi kronis pada saluran pernafasan, yang berdampak saluran pernafasan menjadi sangat sensitif dan aliran udara menjadi terbatas (Anonymous, 2007). Hal ini ditegaskan oleh Busse dan Lemanske (2001), bahwa asma merupakan sindrom yang kompleks dengan karakterisasi obstruksi saluran napas, inflamasi kronis saluran pernafasan yang melibatkan banyak sel dan mediator seperti eosinofil, sel mast, dan limfosit T. Gejala asma memiliki hubungan dengan respon inflamasi yang akan menyebabkan obstruksi dan hiperresponsivitas serta *remodeling* dari saluran pernafasan. Inflamasi saluran pernafasan pada asma merupakan proses yang sangat kompleks, melibatkan faktor genetik, antigen, berbagai sel inflamasi, interaksi antar sel dan mediator yang membentuk proses inflamasi kronik dan *remodeling* (Anonymous, 2007; Sundaru, 2002). Hal ini sesuai dengan penelitian Barnes *et al.*, (1998), bahwa pelepasan mediator inflamasi juga mengakibatkan perubahan struktur dalam saluran pernafasan, misalnya fibrosis yang dihasilkan dari deposisi kolagen.

Gambaran khas inflamasi asma ditunjukkan dengan adanya peningkatan sejumlah eosinofil teraktivasi, sel *mast*, makrofag dan limfosit T dalam lumen dan mukosa saluran pernafasan. Proses patomekanisme asma secara umum tertera pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Patomekanisme imunologi asma (Barnes *et al.*, 2002).

Alergen yang masuk akan ditangkap dan dipresentasikan oleh *antigen presenting cell* (APC). Hasil dari presentasi tersebut mengaktifkan sel T yang kemudian terjadi polarisasi sel Th2. Sel Th2 akan melepaskan respon yang dapat merangsang pelepasan berbagai sitokin oleh sel efektor. Sel TH2 selanjutnya diteruskan ke sel limfosit B untuk menghasilkan IgE. Sitokin proinflamasi seperti IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-16, dan *granulocyte-monocyte colony stimulating factor* (GM-CSF) dihasilkan oleh sel Th2. Kemudian akan terjadi pengerahan sel mast, eosinofil, makrofag, neutrofil dan basofil ke daerah inflamasi. Mediator inflamasi yang dilepaskan adalah histamin, prostaglandin, leukotripon dan enzim (Barnes *et al.*, 2002).

Caramori dan Papi (2004) mengatakan bahwa inflamasi yang terjadi pada penyakit asma disebabkan oleh aktivasi sel inflamatori yang akan

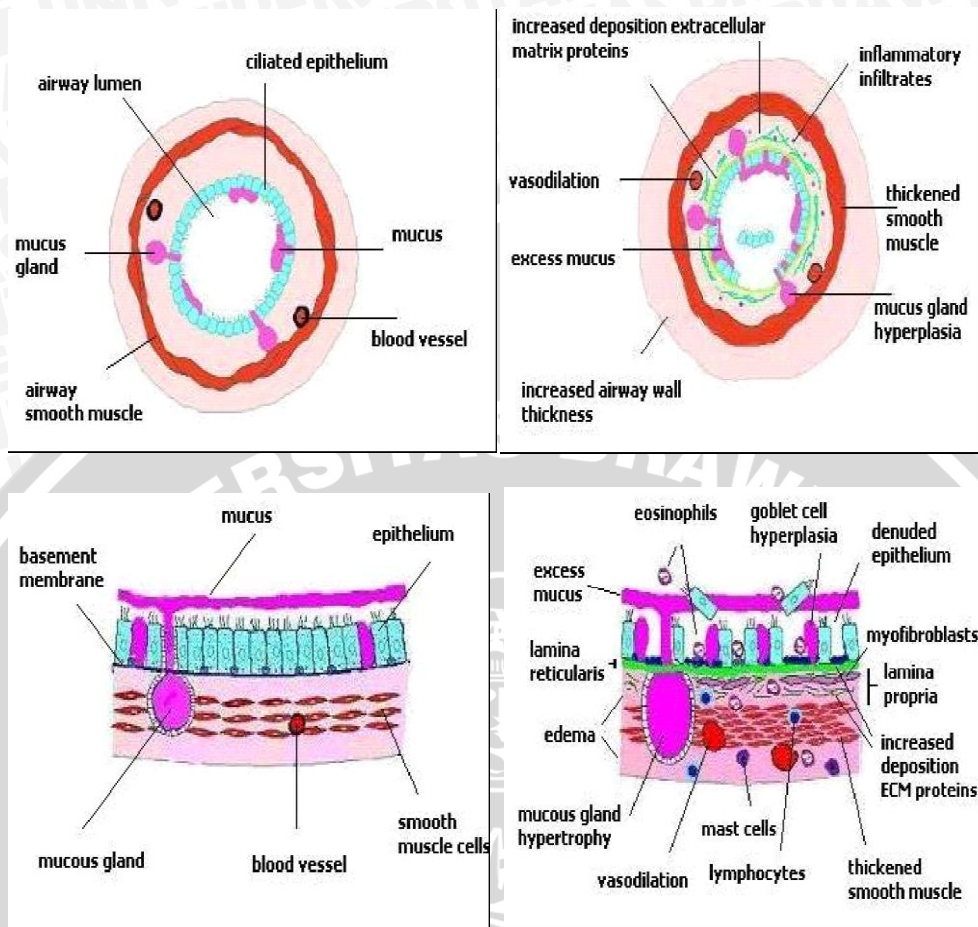
menghasilkan radikal bebas sebagai respon terhadap beberapa rangsangan. Ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan di dalam tubuh akan mengakibatkan stres oksidatif.

Pada keadaan asma terjadi perubahan sel dan abnormalitas struktur pada permukaan saluran pernafasan intrapulmonari yang dilapisi oleh epitel *pseudostratified*. Hal ini dikarenakan oleh inflamasi akut. Menurut Palmans (2002), lumen saluran napas tertutup oleh sumbatan mukus dan glikoprotein mukus berasal dari sel epitel permukaan.

Inflamasi menyebabkan hiperplasia sel goblet yang kemudian melepaskan cairan mukus, sehingga terjadi peningkatan eksudat inflamatori yang menyebabkan terjadinya penghambatan dan peningkatan tekanan saluran pernafasan sehingga menutup jalur napas (Saetta dan Turato, 2001). Donno (2000), hipersekresi mukus akan mengurangi gerakan silia, mempengaruhi lama inflamasi dan menyebabkan kerusakan struktur serta fungsi sel epitel.

2.2 Histopatologi Paru Asma

Studi histopatologi pada penderita asma menjelaskan bahwa asma merupakan proses yang mempengaruhi saluran pernafasan sentral dan periferal seperti perubahan seluler akibat infiltrasi sel inflamatori dan perubahan struktural dinding saluran pernafasan sebagai respon untuk memperbaiki jaringan yang rusak akibat inflamasi (Jeffery, 2004).



Gambar 2.2 Perbandingan gambaran saluran pernapasan normal dan keadaan asma (Palmans, 2002)

Perbandingan gambaran saluran pernapasan normal dan keadaan asma dapat dilihat pada Gambar 2.3. Pada kondisi asma lumen saluran napas tertutup oleh sumbatan mukus napas dan glikoprotein mukus berasal dari sel epitel permukaan. Terjadi pelepasan sel epitel, penebalan lapisan subepitel, penebalan lapisan otot polos karena hipertrofi dan hiperplasi sel *goblet* dan kelenjar mukus. Kurasan (*lavage*) bronkoalveolar penderita asma menunjukkan kenaikan jumlah limfosit, sel *mast* dan eosinofil serta aktivasi makrofag sedangkan biopsi bronkus menunjukkan infiltrasi eosinofil,

pelepasan epitel dan fibrosis subepitel. Analisis histologi biopsi bronkial menunjukkan peningkatan jumlah pembuluh darah yang disebabkan oleh proliferasi percabangan atau pemanjangan pembuluh darah yang terdapat pada submukosa serta pembesaran mikrovaskular yang disebabkan oleh proliferasi sel endothelial (Palmans *et al.*, 2002).

2.3 Radikal Bebas dan Enzim *Superoksida Dismutase* (SOD).

Radikal bebas adalah sebuah atom, gugus atom, atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada kulit terluarnya. Radikal bebas dapat ditemukan dalam tubuh manusia, sebagian besar tergolong ke dalam kelompok spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species*). Beberapa spesies oksigen reaktif yang terdapat di dalam tubuh adalah $O_2\cdot^-$, H_2O_2 , dan $OH\cdot$ (Shaban *et al.*, 2003).

Antioksidan yaitu senyawa atau bahan bioaktif yang dapat berfungsi untuk mencegah dan menurunkan reaksi oksidasi serta menstabilkan radikal bebas (Margail, 2005). Antioksidan dibedakan atas antioksidan endogen dan antioksidan eksogen. Antioksidan endogen umumnya berbentuk enzim, contohnya *superoksida dismutase* (SOD), katalase, glutathion peroksidase, dan glutathion reduktase. Antioksidan eksogen contohnya askorbat, tokoferol, dan karoten (Nayak, 2001).

Jumlah radikal bebas berpengaruh terhadap kerja antioksidan endogen. Jumlah radikal bebas yang sedikit akan meringankan kerja antioksidan endogen, sehingga antioksidan tersebut bisa dipertahankan di dalam sel.

Namun jika radikal bebas terlalu banyak, antioksidan endogen tidak akan mampu menetralsirkannya. Kekurangan antioksidan menyebabkan stres oksidatif yang berujung kerusakan sel dan menyebabkan timbulnya berbagai macam penyakit degeneratif (penuaan dini, kanker) (Evans *et al.*, 2004).

Aktivitas molekul radikal bebas yang reaktif akan mengakibatkan tubuh mengalami kondisi stres oksidatif. Stress oksidatif terjadi pada kondisi asma diakibatkan oleh adanya inflamasi. Stres oksidatif terjadi ketika tingkat *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) yang toksik melebihi pertahanan antioksidan endogen. Keadaan ini mengakibatkan kelebihan radikal bebas, yang akan bereaksi dengan lipid, protein, asam nukleat seluler, sehingga terjadi kerusakan lokal dan disfungsi organ tertentu (Allen and Tressini, 2000). Selain itu adanya inaktivasi enzim antioksidan seperti enzim *superoksida dismutase* (SOD) menjadi tolok ukur kejadian stress oksidatif. Perubahan struktur saluran pernapasan, seperti infiltrasi sel inflamatori pada saluran pernapasan juga mempengaruhi inaktivasi enzim SOD (Caramori and Papi, 2004; Comhair *et al.*, 2005).

Salah satu antioksidan enzimatis yang penting adalah enzim *superoksida dismutase* (SOD). Enzim ini bekerja spesifik untuk mengeliminasi radikal bebas anion superoksida (Carroll *et al.*, 2007). Perubahan struktur saluran pernapasan, seperti infiltrasi sel inflamatori pada saluran pernapasan juga mempengaruhi inaktivasi enzim SOD (Caramori and Papi, 2004; Comhair *et al.*, 2005). SOD berperan untuk mengubah molekul

superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) (Bowler, 2004; Comhair dkk, 2005).

2.4 Putri Malu (*Mimosa pudica*, Linn)

Putri malu (*Mimosa pudica*, Linn.) berasal dari Benua Amerika yang beriklim tropis dengan ketinggian 1-1200 mdpl. Perkembangbiakan putri malu sangat cepat dan biasanya putri malu tumbuh merambat atau berbentuk semak dengan tinggi 0,3 - 1,5 meter. Batang putri malu berbentuk bulat dan memiliki daun yang kecil berbentuk lancip dan terdapat bunga seperti bola dengan warna merah muda. Putri malu biasa ditemui tumbuh dipinggir jalan dan tempat-tempat terbuka yang terkena sinar matahari (Faridah, 2007).

Taksonomi *Mimosa pudica*, Linn dari laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan Fakultas MIPA Universitas Brawijaya adalah

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Fabales
Famili	: Fabaceae
Genus	: Mimosa
Spesies	: <i>Mimosa pudica</i> , Linn.

Putri malu merupakan golongan tanaman herbal dan memiliki kandungan kimia yang baik bagi kesehatan. Seluruh bagian tumbuhan Putri

Malu dapat dimanfaatkan sebagai obat, yakni dari akar, batang daun hingga keseluruhan bagian tumbuhan, baik dalam keadaan segar atau kering (Faridah, 2007). Ekstrak herba putri malu mempunyai khasiat sebagai *transquilizer* (penenang), ekspektoran (peluruh dahak), diuretik (peluruh air seni), antitusif (antibatuk), antipiretik (penurun panas), dan antiradang (Jayani, 2007). Menurut penelitian Annisa (2009), hasil penapisan fitokimia simplisia dan ekstrak putri malu menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid, tanin, polifenol, monoterpenoid, seskuiterpenoid, steroid, saponin dan kuinon. Menurut Faridah Juliet (2008), *flavonoid* adalah golongan senyawa yang diketahui mempunyai berbagai khasiat, seperti anti radang, memperlancar pengeluaran air seni, anti virus, anti jamur, anti bakteri, antihipertensi, serta mampu menjaga dan meningkatkan kerja pembuluh darah kapiler.

Berdasarkan penelitian Jin Zhang yang dipublikasikan pada 2011, kandungan flavonoid pada ekstrak *Mimosa pudica, L* terdiri atas lima monomer, yaitu flavone, isorientin, orientin, isovitexin, dan vitexin. Yelvi (2005) mengatakan ekstrak etanol herbal *Mimosa pudica, Linn.* mempunyai aktivitas antiinflamasi yang sangat signifikan.

2.5 Hewan Coba Tikus

Hewan percobaan yang akan digunakan dalam penelitian ilmiah ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar. Menurut Besselsen (2004) dan Depkes (2011) taksonomi tikus adalah:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodensia
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Menurut Departemen Kesehatan (2011), ciri-ciri morfologi *Rattus norvegicus* antara lain memiliki berat 150-600 gram, hidung tumpul dan badan besar dengan panjang 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20-23 mm. *Rattus norvegicus* memiliki rambut tubuh berwarna putih dan mata yang merah, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm bobot jantan dewasa berkisar 450-520 g dan betina 250-300 g (Myers and Armitage, 2004).

Penelitian Kumar *et al.*, (2008) telah menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan model asma menggunakan ovalbumin (OVA) dan *Aluminium Hydroxide* ($AlOH_3$) sebagai sensitisasi penginduksi asma. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan hewan model standar yang digunakan dalam kajian mekanisme asma yang tidak memerlukan perlakuan khusus, mudah diperoleh dan mudah pemeliharaannya (Utomo, 2006).

Smith dan Mangkoewidjojo (1988) mengatakan bahwa ada dua sifat utama yang membedakan tikus dengan hewan percobaan lainnya, yaitu tikus tidak dapat muntah karena struktur anatomi yang tidak lazim pada tempat

bermuara esofagus ke dalam lambung sehingga mempermudah proses pencekakan perlakuan menggunakan sonde lambung dan tidak mempunyai kandung empedu. Selain itu, tikus hanya mempunyai kelenjar keringat di telapak kaki. Ekor tikus menjadi bagian badan yang paling penting untuk mengurangi panas tubuh.

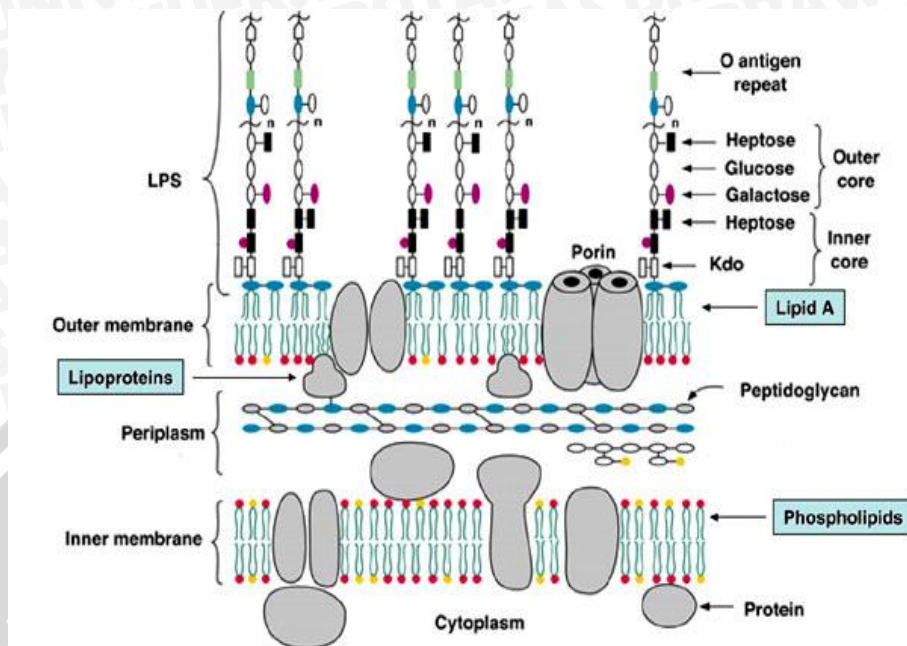
Rattus norvegicus sering digunakan sebagai hewan coba karena memiliki kebutuhan asam amino esensial yang sama seperti manusia, kemiripan fungsi dan bentuk organ serta proses biokimia antara tikus dan manusia sehingga penelitian dapat diaplikasikan kepada manusia (Hedrich, 2006). *Rattus norvegicus* memiliki keunggulan dari hewan coba lainnya seperti penanganan dan pemeliharaan yang mudah karena tubuhnya kecil, kemampuan reproduksi yang tinggi karena tidak memiliki musim kawin, masa kebuntingan singkat, sehat, bersih, dan cocok untuk berbagai macam penelitian (Malole dan Pramono, 1989).

Penggunaan *Rattus norvegicus* untuk model asma secara konvensional dapat dilakukan dengan cara membuat reaksi asma *artificial* (buatan) pada tikus menggunakan ovalbumin (OVA) yang diperoleh dari telur ayam seperti yang dilakukan oleh Kumar (2008) pada penelitiannya. Secara konvensional ovalbumin lazim dipakai secara umum sebagai bahan induksi timbulnya asma (Huntington and Stein, 2001). Ovalbumin adalah protein yang terbesar yang terdapat pada putih telur. Ovalbumin terdiri atas 385 asam amino dengan memiliki massa molekul 45 kDa. Sensitisasi alergi akut menggunakan alergen disertai dengan adjuvan *aluminium hydroxide* ($Al(OH)_3$) yang dapat

membantu pembentukan fenotip *T helper 2* (Th2) ketika terpapar antigen. Setelah itu hewan coba dipapar dengan Ovalbumin melalui inhalasi menggunakan *nebulizer*, yang menyebabkan terjadinya keadaan inflamasi kronis. Keadaan tersebut digunakan untuk mengetahui gejala asma lanjut seperti *remodeling* saluran pernapasan dan hipersensitivitas asma yang persisten, serta untuk menemukan model terapi baru atau mengevaluasi efek obat terhadap inflamasi paru (Nials and Uddin, 2008).

Lipopolisakarida (LPS) merupakan faktor patogenik utama pada sepsis Gram negatif, yang ditandai dengan syok, koagulopati, dan disfungsi multiorgan. Struktur LPS tersusun atas lipid bilayer, polisakarida, dan protein (Madigan *et al.*, 2003). Menurut Wang and Quinn (2010), polisakarida dalam LPS tersusun atas tiga bagian, yaitu lipid A, polisakarida inti dan Polisakarida O. Lipid A adalah komponen hidrofobik yang terletak bagian luar *outer membrane protein* (OMP) dan berperan dalam toksisitas bakteri.

Polisakarida inti adalah bagian LPS yang terletak diluar lipid A yang menghubungkan lipid A dengan polisakarida. Polisakarida-O atau antigen-O adalah polisakarida kompleks yang disusun oleh 5-8 monosakarida. Polisakarida ini memiliki peranan penting dalam sifat antigenik, diantaranya adalah petahanan terhadap fagositosis sebuah bakteri, sebagai reseptor bakteriofag, dan modulasi aktivasi *alternative complement pathway*, serta untuk menghambat penempelan kompleks membran dengan *outer membrane* bakteri (Feulner, 2.2) (Gambar 2.3).

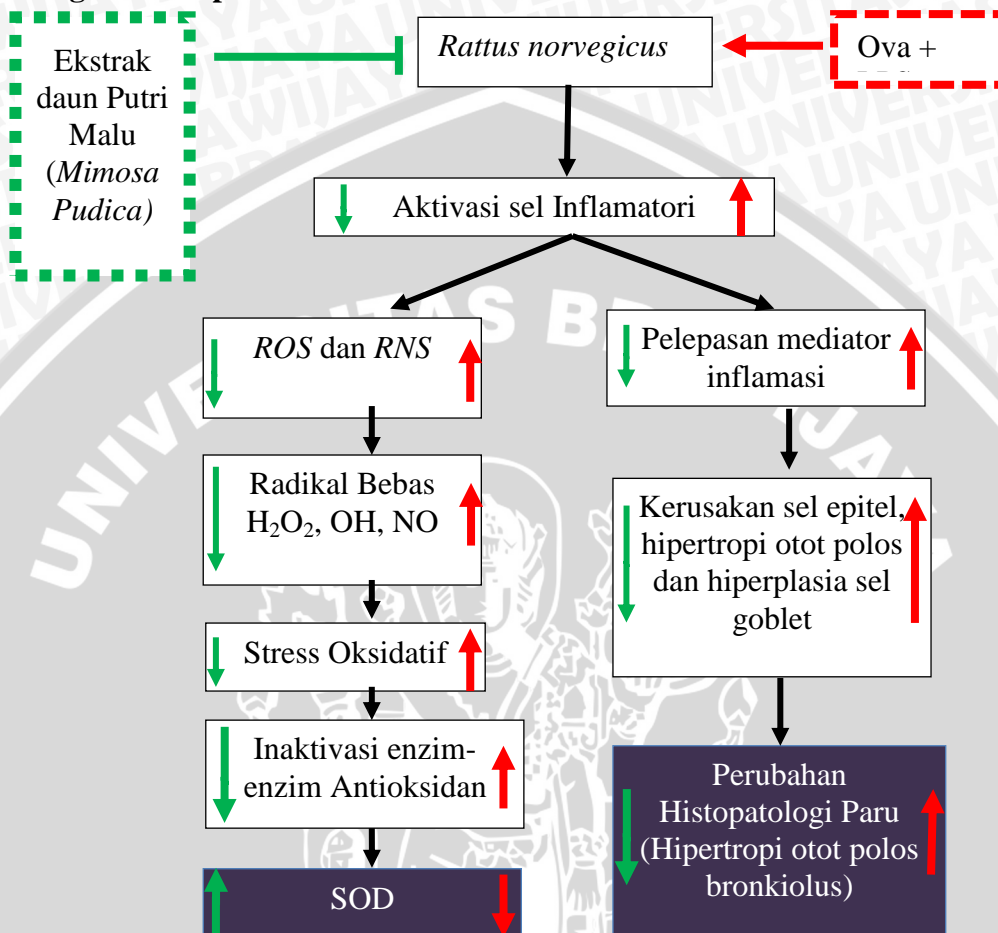


Gambar 2.3 Struktur dinding bakteri Gram negatif (Feulner, 2003)

Hiperresponsivitas saluran pernafasan pada penderita asma ditimbulkan oleh inhalasi LPS dimana secara eksperimen lebih sensitif terhadap penyempitan saluran pernafasan. *Toll-Like Receptor-4* (TLR-4) berperan dalam respon terhadap LPS. Hal ini ditunjukkan dengan mutasi pada gen TLR-4 menunjukkan adanya penurunan hiperresponsifitas saluran pernafasan (Schwartz, 2002).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1. Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan Gambar :

- : Variabel bebas
- : Variabel tergantung
- : Menghambat
- ↑↓ : Pengaruh pemberian terapi ekstrak daun putri malu
- : Patomekanisme
- ↑↓ : Pengaruh akibat tikus mengalami asma (peningkatan/ penurunan)
- : injeksi / pemberian

Paparan LPS pada tikus asma akan direspon oleh *Toll-Like Receptor-4* (TLR-4) dan protein ekstraseluler, yaitu *LPS Binding Protein* (LBP), CD-14, dan *Myeloid Differentiation Protein* (MD-2). Kemudian sel inflamatori teraktivasi akan memasuki saluran pernapasan melalui migrasi yang diinisiasi oleh faktor kemoantraktan serta melalui mekanisme seluler yang spesifik dan terkoordinasi di setiap tahapan ekstravasasi termasuk adesi, kemotaksis, dan aktivasi. Sel inflamatori, khususnya eosinofil, akan melepaskan molekul radikal bebas sehingga mengakibatkan kerusakan epitel saluran napas serta degranulasi basofil dan sel *mast*. Radikal bebas tersebut akan berinteraksi dengan molekul radikal bebas yang terbentuk saat proses inflamasi akibat pemberian OVA. Interaksi antar molekul radikal bebas menimbulkan molekul radikal bebas yang semakin reaktif, seperti nitrogen dioksida dan peroksinitrit sehingga menyebabkan saluran pernapasan mengalami kondisi stres oksidatif. Kondisi stres oksidatif merupakan manifestasi dari tidak seimbangnya molekul radikal bebas dengan enzim antioksidan karena enzim antioksidan mengalami inaktivasi. Hal ini akan mengakibatkan penurunan aktivitas enzim SOD. Sel-sel inflamatori yang teraktivasi akan menghasilkan enzim proteolitik yang bersifat toksik sehingga mampu menyebabkan kerusakan sel epitel, hipertropi otot polos dan hiperplasia sel goblet.

Pemberian terapi ekstrak *Mimosa pudica*, *L* bertujuan untuk meningkatkan antioksidan di dalam tubuh. Antioksidan yang paling banyak ditemukan pada daun puteri malu adalah flavonoid. Flavonoid didalam tubuh akan berikatan dengan radikal bebas menjadi radikal fenoksil flavonoid

sehingga kondisi radikal bebas tidak reaktif. Kondisi ini akan menurunkan kondisi stress oksidatif dalam tubuh berkurang, sehingga aktivitas enzim SOD meningkat. Flavonoid dalam tubuh dapat berfungsi untuk mengurangi pelepasan sel-sel inflamasi. Berkurangnya sel-sel inflamasi di dalam tubuh mengakibatkan berkurangnya mediator inflamasi seperti histamin, leukotrien, prostaglandin dan enzim proteolitik, sehingga akan terjadi perbaikan histopatologi otot polos bronkiolus paru.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut ini: Ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*, Linn) mampu menaikkan aktivitas enzim *superoksida dismutase* (SOD) pada hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang telah di papar dengan Lipopolisakarida dan ovalbumin serta akan terjadi perubahan gambaran histopatologi paru yaitu terjadi perbaikan otot polos bronkiolus.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus–Oktober 2013 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar berumur 8-12 minggu. Berat badan tikus antara 150-250 gram. Hewan coba diadaptasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008).

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

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

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \approx 5$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan dari rumus Kusriningrum tersebut, maka untuk 4 macam kelompok perlakuan, masing-masing diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 5 kali. sehingga dapat disimpulkan bahwa dibutuhkan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) sebanyak 20 ekor.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana dimana subyek dibagi menjadi empat kelompok secara random, dimana tiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Kelompok pertama adalah tikus yang tidak diberi perlakuan apapun (kontrol negatif), kelompok kedua adalah tikus diberi OVA + LPS (kontrol positif), kelompok ketiga adalah tikus diberi OVA+LPS+ekstrak daun *Mimosa pudica, L* dengan dosis sebesar 500 mg/kg BB, dan kelompok terakhir adalah tikus diberi OVA+LPS+ekstrak daun *Mimosa pudica, L* dengan dosis 1000 mg/kg BB.

Tabel 4.1 Variabel penelitian yang dilakukan

Variabel yang Diamati	Ulangan				
	1	2	3	4	5
Kadar SOD dan Gambaran Histopatologi paru					
Kelompok A (kontrol)					
Kelompok B (Asma/Positif)					
Kelompok C (terapi dosis 500 mg/kg BB)					
Kelompok D (terapi dosis 1000 mg/kg BB)					

4.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : kombinasi OVA dan LPS serta Dosis ekstrak daun *Mimosa pudica, L*.

Variabel tergantung : Aktivitas enzim SOD dan histopatologi paru.

Variabel kendali : jenis kelamin, strain, pakan, minum, kandang, berat badan, suhu, kelembaban, umur.

4.5 Materi Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), ovalbumin (Sigma-Aldrich), AlOH_3 , PBS, lipopolisakarida dari bakteri *Porphyromonas gingivalis*, Na Phys, *Superoxide Dismutase Assay Kit* (Biovision, Cat K335-100), TCA 100%, HCl, Na-Thio 1%, NaCl fisiologis 0,9%, *washing buffer*, alkohol 70%, alkohol 90%, alkohol 95%, alkohol absolut, xilol, parafin, aquades, pewarna histologi hematoxilin eosin, akuades steril, dan ekstrak *Mimosa pudica*, L.

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain bak pemeliharaan hewan coba, seperangkat alat bedah, gelas objek, labu takar (10 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL), pipet tetes, gelas ukur 100 mL, gelas kimia (50 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL), pengaduk kaca, tabung reaksi, corong gelas), mortar, mikro pipet (10 μL , 20 μL , 200 μL , 1000 μL), rak tabung reaksi, penangas air, *waterbath*, *stirer*, kuas, botol semprot, *mikrotube*, tabung polipropilen, lemari pendingin, penjepit, seperangkat alat sentrifugasi (Denley tipe BR 401), inkubator (Memmert), vortex (Guo-Huq), Sonikator (Branson 200), spektrofotometri UV-VIS, mikroskop cahaya (Nikon), *autoclave*, plastik klip, toples, tisu, botol film plastik, sarung tangan, *Omron CompAir Compressor Nebulizer*

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Percobaan

Tikus yang digunakan untuk penelitian diadaptasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian makanan berupa

ransum basal pada semua tikus. Tikus dibagi dalam 4 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor tikus. Komposisi ransum basal disusun berdasarkan standar *Association of Analytical Communities* (AOAC) (2005) yaitu mengandung karbohidrat, protein 10%, lemak 3%, mineral, vitamin, dan air 12%.

Tikus dikandangkan dalam kandang yang berukuran 17.5 x 23.75 x 17.5 cm. Kandang terbuat dari bahan plastik dan ditutup dengan kawat *stainless steel*. Kandang tikus diletakkan di daerah yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

4.6.2 Persiapan Hewan Model Asma dengan Ovalbumin

Perlakuan pada tikus dilakukan pada hari ke-0 dengan injeksi ovalbumin (OVA I) (Sigma-Aldrich) 10 µg/ml secara intraperitoneal dalam AlOH₃ dalam PBS (*phosphate buffer saline*) dan injeksi ovalbumin (OVA II) dilakukan pada hari ke-14. Pemaparan ovalbumin (OVA III) secara aerosol dilakukan pada hari ke-21 menggunakan tabung transparan yang dihubungkan dengan *Omron CompAir Compressor Nebulizer*. Perlakuan pemicu asma dilakukan dengan nebulasi OVA dalam NaCl steril dengan dosis 1 mg/ml selama 20 menit.

4.6.3 Tatalaksana Injeksi Lipopolisakarida (LPS)

Injeksi lipopolisakarida (LPS) intrasulkuler dilakukan dengan dosis 1 $\mu\text{g/ml}$ pada sulkus gingiva molar rahang atas kiri tikus (Stephanie *et al.*, 2002). LPS yang digunakan adalah LPS1435/1450 dari *Porphyromonas gingivalis* (Astarte Biologics) yang berfungsi sebagai agen infeksi rongga mulut dan memodulasi respon imun. Injeksi LPS intrasulkuler dilakukan berturut-turut pada hari ke 10 dan 11 dengan mengacu pada penelitian sebelumnya.

4.6.4 Metode Ekstraksi *Mimosa pudica, L.*

Metode pembuatan ekstrak air putri malu (*Mimosa pudica, L.*) berdasarkan metode Ramadani (2013). *Mimosa pudica, L.* yang sudah kering ditimbang sebanyak 500 mg (kelompok C) dan 1000 mg (kelompok D) dan dimasukkan kedalam gelas kimia dengan menambahkan 100 mL akuades pada kelompok C dan Kelompok D. Masing-masing kelompok tersebut kemudian akan direbus di atas *hotplate* pada temperatur 70° C dengan dilakukan pengadukan hingga air rebusan menjadi 10 mL. Air rebusan kemudian disaring menggunakan kertas saring sehingga didapatkan ekstrak air *Mimosa pudica, L.* dan didinginkan. Sediaan ekstrak air daun *Mimosa pudica, L.* untuk kelompok C (terapi dosis 500 mg/kg BB) dan D (terapi dosis 1000 mg/kg BB) dipersiapkan setiap hari.

4.6.5 Pemberian Terapi Ekstrak *Mimosa pudica*, L.

Metode pemberian volume terapi per oral tiap ekor tikus berdasarkan Bekow *and* Baumans (2003) dalam Ramadani (2013) sebanyak 2 mL pada kelompok tikus (C) terapi ekstrak air *Mimosa pudica*, L dosis 500 mg/kg BB dan (D) ekstrak air *Mimosa pudica*, L dengan dosis 1000 mg/kg BB diterapi pada hari ke-22 sampai dengan ke-35 dengan ekstrak air *Mimosa pudica*, L selama 2 minggu berturut-turut (Ramadani, 2013).

4.6.6 Pengambilan Organ Paru

Pengambilan organ paru pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-21 pada kontrol positif dan hari ke-35 pada tikus terapi setelah seluruh perlakuan dilakukan. Langkah awal yang dilakukan adalah dislokasi hewan coba pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan. Tikus diletakkan secara rebah dorsal pada papan pembedahan. Pembedahan dilakukan dari daerah abdomen sampai ke bagian thorax. Bagian paru-paru diambil dengan menggunakan pinset dan pisau. Organ paru-paru mula-mula dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9% dingin yang berfungsi untuk membersihkan dari berbagai kotoran yang ikut pada saat pembedahan. Kemudian paru-paru dimasukkan dalam larutan *Phospate Buffer Saline*-azida (PBS-azida) pH 7,4 dan larutan PFA. Organ paru pada larutan PBS digunakan untuk isolasi protein yang kemudian digunakan pada penghitungan aktivitas enzim superoksida dismutase menggunakan KIT

SOD, sedangkan pada larutan PFA digunakan untuk pembuatan gambar histopatologi paru.

4.6.7 Pengukuran Aktivitas *Superoksida Dismutase* (SOD)

4.6.7.1 Persiapan Sampel

Persiapan sampel menggunakan teknik isolasi protein, dimana organ paru dipotong kecil-kecil, kemudian ditambah larutan PBS-Tween PMSF (9 : 1) sebanyak 1 mL. Setelah itu ditambah sedikit pasir kuarsa, dan digerus dengan mortar dingin yang sudah di sterilisasi menggunakan *autoclave*, diletakkan diatas blok es. Organ digerus sampai halus, kemudian ditambah dengan larutan PBS-Tween : PSMF (9 :1) sebanyak 2 mL dan dipindahkan ke dalam tabung polipropilen yang telah disterilisasi dengan *autoclave*. Kemudian dihomogenkan dengan vorteks selama 10 menit, disonikasi dengan sonikator selama 10 menit dan disentrifugasi selama 15 menit (6000 rpm). Selanjutnya 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 dengan perbandingan volume 1:1 (Walter, 1984).

4.6.7.2 Penentuan Aktivitas *Superoksida Dismutase* (SOD)

Penentuan aktivitas SOD sampel dilakukan menggunakan *Superoxide Dismutase Assay Kit* (Biovision, Cat K335-100). Larutan sampel dan larutan komponen *Superoxide Dismutase Assay Kit* dimasukkan dalam *well. Plate* diinkubasi pada suhu 37° C selama 20 menit, kemudian dibaca absorbansi pada 450 nm menggunakan *microplate reader*. Penghitungan aktivitas SOD menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas SOD} = \frac{(\text{Ablanko1} - \text{A blanko3}) - (\text{Asampel} - \text{A blanko2}) \times 100}{(\text{Ablanko1} - \text{Ablanko3})}$$

4.6.8 Pembuatan Preparat Histologi

a. Pengambilan Sampel (*Sampling*), Fiksasi, dan Pematangan Organ

Tikus dimatikan dengan cara dislokasi leher setelah diberikan perlakuan perlakuan nebulasi ovalbumin selama 30 menit. Tikus dibedah dan diambil organ paru-parunya. Sampel paru-paru dicuci dengan menggunakan NaCl fisiologis 0.9% untuk menghilangkan darah dan kotoran yang melekat pada organ, lalu dipotong kecil berbentuk dadu berukuran 1x1x1 mm³. Organ kemudian direndam dalam larutan PFA.

b. Dehidrasi dan Infiltrasi

Dehidrasi bertujuan untuk mengeluarkan air dari dalam jaringan dengan menggunakan larutan etanol secara bertingkat dari konsentrasi 80% sampai dengan absolut. Lama jaringan dalam larutan etanol berkisar antara 10 menit hingga 30 menit. Proses dehidrasi berjalan dalam kondisi teragitasi dan pada suhu 4°C. Proses infiltrasi

menggunakan perbandingan larutan etanol absolute dan propylene oxide secara bertingkat hingga hanya menggunakan larutan propylene murni. Infiltrasi dilakukan dalam kondisi teragitasi dan pada suhu ruang selama 30 menit untuk setiap tahapannya.

c. Penjernihan (*Clearing*)

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

d. Infiltrasi Parafin

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

e. Penanaman Jaringan (*Embedding*)

Embedding dilakukan dengan cetakan yang di dalamnya diisi paraffin cair. Blok paraffin yang sudah membeku tersebut dipasang pada mikrotom dan diatur agar posisinya 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 diwarnai dengan pewarnaan HE.

f. Pewarnaan Hematoksilin – Eosin (HE)

Pewarnaan Hematoksilin–Eosin dilakukan menggunakan zat pewarna hematoksilin. Zat pewarna hematoksilin berfungsi untuk memberi warna biru pada inti sel (basofilik). Eosin merupakan counterstaining hematoksilin, digunakan untuk memulas sitoplasma sel dan jaringan penyambung dan memberikan warna merah muda.

Tahapan pewarnaan diawali dengan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol lalu dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol absolut I, II dan III masing-masing 5 menit, alkohol 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit. Sediaan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dan dilanjutkan dengan aquades selama 5 menit. Setelah itu diwarnai dengan pewarna Hematoksilin selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dilanjutkan dengan air aquades selama 5 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna Eosin selama 5 menit dan bilas menggunakan air selama 30 menit dilanjutkan dengan 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 2 menit. Setelah itu dilakukan proses *Clearing* dengan xylol I, II dan III selama 3 menit dan ditutup dengan gelas penutup (Dewi, 2011).

g. Pengamatan Preparat HE

Pengamatan preparat organ paru dilakukan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus BX51) dengan perbesaran 200 X. Bagian yang diamati adalah perubahan struktur otot polos bronkiolus paru untuk melihat keparahan asma akibat paparan lipopolisakarida.

4.7 Analisis Data

Parameter yang diamati dalam penelitian ini meliputi perubahan morfologi jaringan organ paru yaitu perubahan struktur epitel bronkiolus dan perubahan kadar enzim superoxide dismutase (SOD). Perubahan struktur epitel bronkiolus diamati secara deskriptif dan perubahan aktivitas SOD diamati secara kuantitatif menggunakan *Superoxide Dismutase Assay Kit* (Biovision, Cat K335-100). Data yang diperoleh dari hasil perlakuan dianalisis dengan menggunakan Microsoft Office Excel dan SPSS for Windows dengan analisis ragam ANOVA dan uji lanjutan *Lower Significant Different* (LSD) $\alpha = 5\%$.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) Terhadap aktivitas enzim Superoksida Dismutase (SOD)

Enzim SOD merupakan enzim antioksidan didalam tubuh yang berfungsi sebagai *scavenger* radikal bebas. Pengaruh pemberian ekstrak daun *Mimosa pudica, L* terhadap aktivitas enzim SOD ditunjukkan pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Rata-rata aktivitas enzim *superoksida dismutase* (SOD)

Perlakuan	Rata-rata Aktivitas enzim SOD	Penurunan (%)	Peningkatan (%)
Kelompok A (kontrol)	91,04 ± 3,59 ^d	-	-
Kelompok B (Asma/Positif)	35,95 ± 4,28 ^a	51,55	-
Kelompok C (terapi dosis 500 mg/kg BB)	63,80 ± 5,07 ^b	20,96	7,45
Kelompok D (terapi dosis 1000 mg/kg BB)	79,88 ± 4,97 ^c	3,30	34,87

Keterangan : notasi a,b,c dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan ($p < 0,05$)

Tabel 5.1 menunjukkan adanya perbedaan rata-rata aktivitas enzim SOD yang signifikan antar perlakuan ($p < 0,05$). Pada kondisi asma terjadi penurunan aktivitas enzim SOD sebesar 51,55% terhadap tikus kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa paparan alergen dapat meningkatkan kondisi stress oksidatif dengan ditandai berkurangnya aktivitas enzim SOD. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang membuktikan bahwa paparan LPS dosis rendah dapat memperparah asma dengan ditandai aktivasi sitokin Th2,

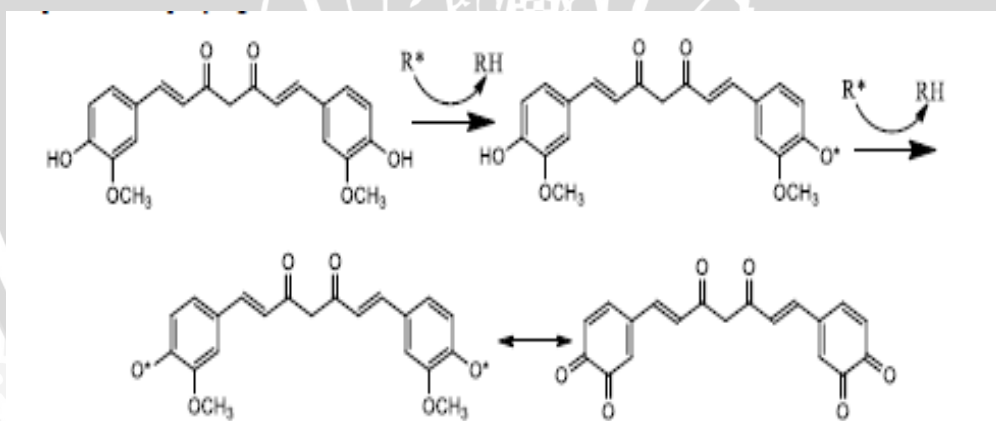
hiperesponsivitas saluran pernapasan, inflamasi eosinofil, dan peningkatan regulasi IgE spesifik alergen (Yoon *et al.*, 2007 ; Eisenbarth *et al.*, 2002).

Kecepatan reaksi *nitrit oxide* dan superoksida yang lebih besar dibandingkan reaksi pembentukan H_2O_2 yang dikatalis oleh SOD (Bowler dan Crapo, 2002; Kinnula dan Crapo, 2003) mengakibatkan SOD kekurangan substrat dan menjadi inaktif. Produk ROS dan RNS berupa Hidrogen peroksida (H_2O_2), Radikal Hidroksil ($\cdot OH$), Radikal Superoksida ($\cdot O_2^-$) dan Nitrit Oksida ($\cdot NO$). Radikal bebas memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan, bersifat sangat reaktif dan terbentuk secara bebas didalam tubuh. Tingginya jumlah radikal bebas mengakibatkan terjadinya penurunan aktivitas enzim antioksidan seperti enzim *Superoxide Dismutase* (SOD) yang berfungsi sebagai *scavenger* radikal bebas. Enzim antioksidan tersebut tidak mampu menetralkan adanya radikal bebas di dalam tubuh sehingga terjadi ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan yang mengakibatkan terjadinya stres oksidatif.

Pemberian terapi ekstrak daun putri malu dengan dosis 500 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB pada Tabel 5.1 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas enzim SOD sebesar 7,48% dan 34,87% terhadap tikus asma. Peningkatan aktivitas SOD dikarenakan adanya antioksidan didalam ekstrak daun putri malu. Hal ini dibuktikan dengan uji LCMS (Lampiran 3) bahwa putri malu memiliki kandungan bioaktif berupa flavonoid yang tinggi. Hal ini sesuai dengan penelitian Anggrainingsih (2013) dan Zafar (2011), bahwa daun putri malu memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi sehingga mampu menurunkan stres oksidatif dalam tubuh ditandai dengan peningkatan

aktivitas enzim SOD. Hasil terbaik ditunjukkan pada tikus asma yang diterapi dengan dosis 1000 mg/Kg BB ekstrak daun putri malu, dimana aktivitas enzim SOD mendekati normal, namun LD₅₀ putri malu adalah 2000 mg/kg BB sehingga memungkinkan untuk ditingkatkan dosis pemberian terapi di bawah LD₅₀ (Jenova, 2009).

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat reaksi oksidasi atau menetralkan radikal bebas di dalam tubuh (Widjaya, 2003). Antioksidan eksogen diperlukan oleh penderita asma karena terjadi kondisi stress oksidatif di dalam tubuhnya. Flavonoid merupakan antioksidan yang banyak ditemukan pada ekstrak daun putri malu (Lampiran 3). Flavonoid berfungsi untuk menggantikan peran antioksidan endogen dalam tubuh dimana akan mengikat radikal bebas seperti pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Reaksi Pengikatan Radikal Bebas oleh Flavonoid (Rahmah, 2012).

Flavonoid mampu mendonasikan atom hidrogen (H) dari gugus hidroksil (OH) kepada radikal bebas (R•) sehingga radikal bebas berubah menjadi radikal fenoksil flavonoid (FIO•). Radikal fenoksil flavonoid yang pertama terbentuk akan diserang kembali oleh radikal bebas (R•) sehingga

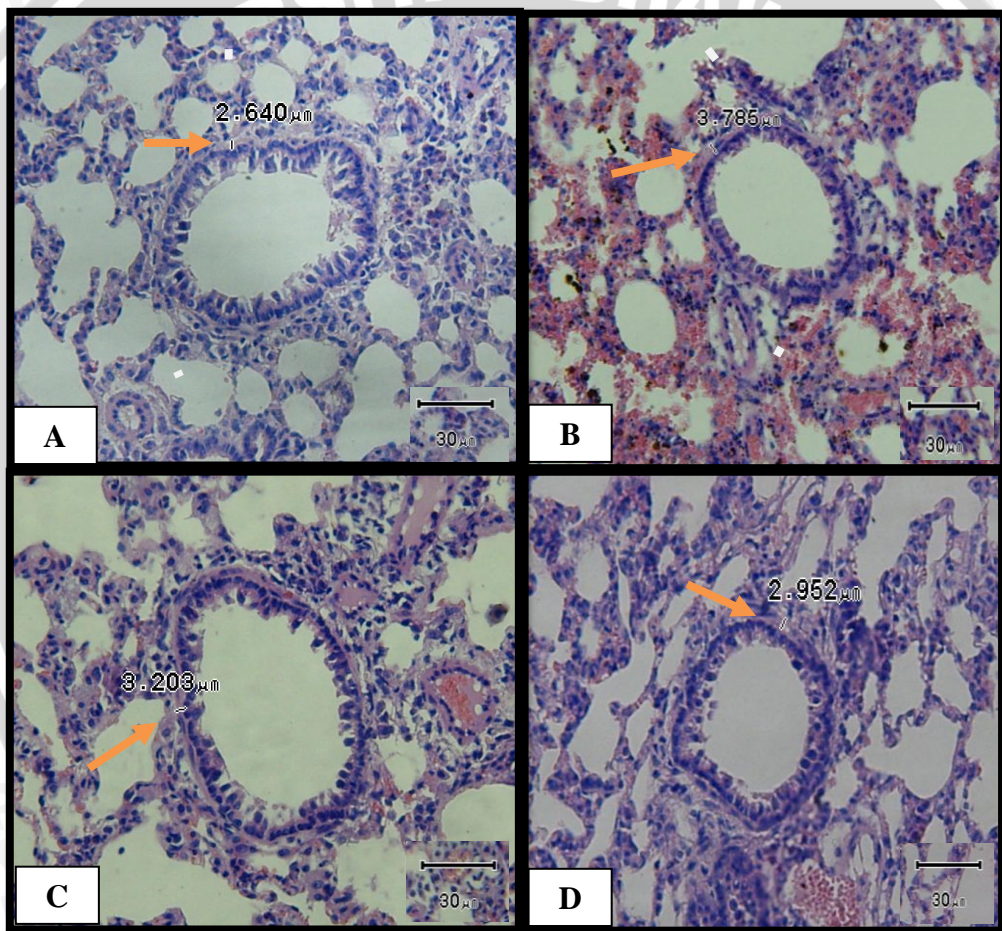
membentuk radikal fenoksil flavonoid yang kedua (FIO[•]) (Rahmah, 2012). Radikal fenoksil flavonoid. Radikal fenoksil flavonoid memiliki ikatan rangkap terkonjugasi sehingga dapat menyeimbangkan strukturnya dengan cara delokalisasi elektron sehingga menghilangkan efek radikal bebas (Sofia, 2003). Efek radikal bebas yang hilang akan diikuti dengan penurunan stress oksidatif dalam tubuh. Penurunan tingkat stress oksidatif akan meningkatkan aktivitas enzim SOD.

5.2 Pengaruh Pemberian Terapi Daun Putri Malu terhadap Gambaran Histopatologi Otot Polos Bronkiolus

Pada tikus asma terjadi inflamasi dan kerusakan jaringan saluran pernapasan termasuk pada otot polos bronkiolus. Otot polos merupakan penyusun pada bronkiolus paru dimana otot polos berfungsi untuk mengontrol diameter bronkiolus dengan cara berkontraksi dan relaksasi. Kerusakan yang terjadi pada otot polos bronkiolus tikus putih (*Rattus norvegicus*) akibat paparan ovalbumin dan lipopolisakarida (LPS) dapat diketahui melalui pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE). Hasil pewarnaan ini menunjukkan adanya perbedaan gambaran histologis pada sel penyusun bronkiolus paru yaitu antara tikus kontrol, tikus asma, tikus terapi putri malu 500 mg/kg BB dan tikus terapi putri malu 1000 mg/kg BB (Gambar 5.2).

Gambar 5.2 menunjukkan perbandingan kondisi otot polos bronkiolus normal, sakit dan terapi dengan ekstrak daun putri malu. Hasil luas potongan melintang otot polos bronkiolus pada kelompok tikus kontrol atau sehat

didapatkan (Gambar 5.2 A) sebesar 2,640 μm sedangkan pada otot polos tikus asma sebesar 3,785 μm (Gambar 5.2 B). Terjadi peningkatan ukuran otot polos terhadap otot polos bronkiolus tikus normal. Hal ini membuktikan bahwa pemaparan OVA dan LPS pada tikus model asma mampu menyebabkan inflamasi saluran pernafasan sehingga merubah struktur histologi atau *remodeling* saluran pernafasan (Palmans, 2002; Utomo, 2006).



Gambar 5.2 Gambaran Histopatologi Bronkiolus Paru Perbesaran 200 X

Keterangan: (A) Kelompok A (kontrol), (B) Kelompok B (Asma/Positif), (C) Kelompok C (terapi dosis 500 mg/kg BB), (D) Kelompok D (terapi dosis 1000 mg/kg BB).

→ : Menunjuk pada Ukuran Ketebalan BSM (Bronchioles Smooth Muscle)

Proses inflamasi saluran pernafasan diawali oleh terbentuknya sel Th2 pada tikus asma. Sel Th2 akan menginduksi sel B untuk produksi imunoglobulin E (IgE) yang berperan sebagai pengikat antigen dalam tubuh. Menurut Rifa'i (2011) IgE dalam sirkulasi darah akan memberikan sinyal kepada sel mast untuk teraktivasi. IgE kemudian akan berikatan dengan sel mast pada reseptor FcεRI pada sel mast. Kompleks sel mast IgE akan memicu terjadinya produksi sitokin pro inflamasi dimana akan menyebabkan terjadinya inflamasi pada saluran pernafasan. Hasil pengamatan pada Gambar 5.2 B diketahui bahwa terjadi hipertropi otot polos akibat adanya enzim proteolitik yang dihasilkan oleh sitokin pro inflamasi.

Sitokin pro inflamasi akan merangsang sekresi asetilkolin dari saraf parasimpatis yang akan menyebabkan terjadinya hipertropi melalui interaksi dengan *muscarinic acetylcholin receptors* (mAChRs) (Belmonte, 2005). mAChRs merupakan reseptor yang berfungsi meregulasi sekresi asetilkolin. Asetilkolin akan berikatan dengan M3 mAChRs pada otot polos saluran pernafasan, sehingga menyebabkan hipertropi. M3 merupakan reseptor muskarinik yang berfungsi untuk menginduksi kontraksi otot polos saluran pernafasan.

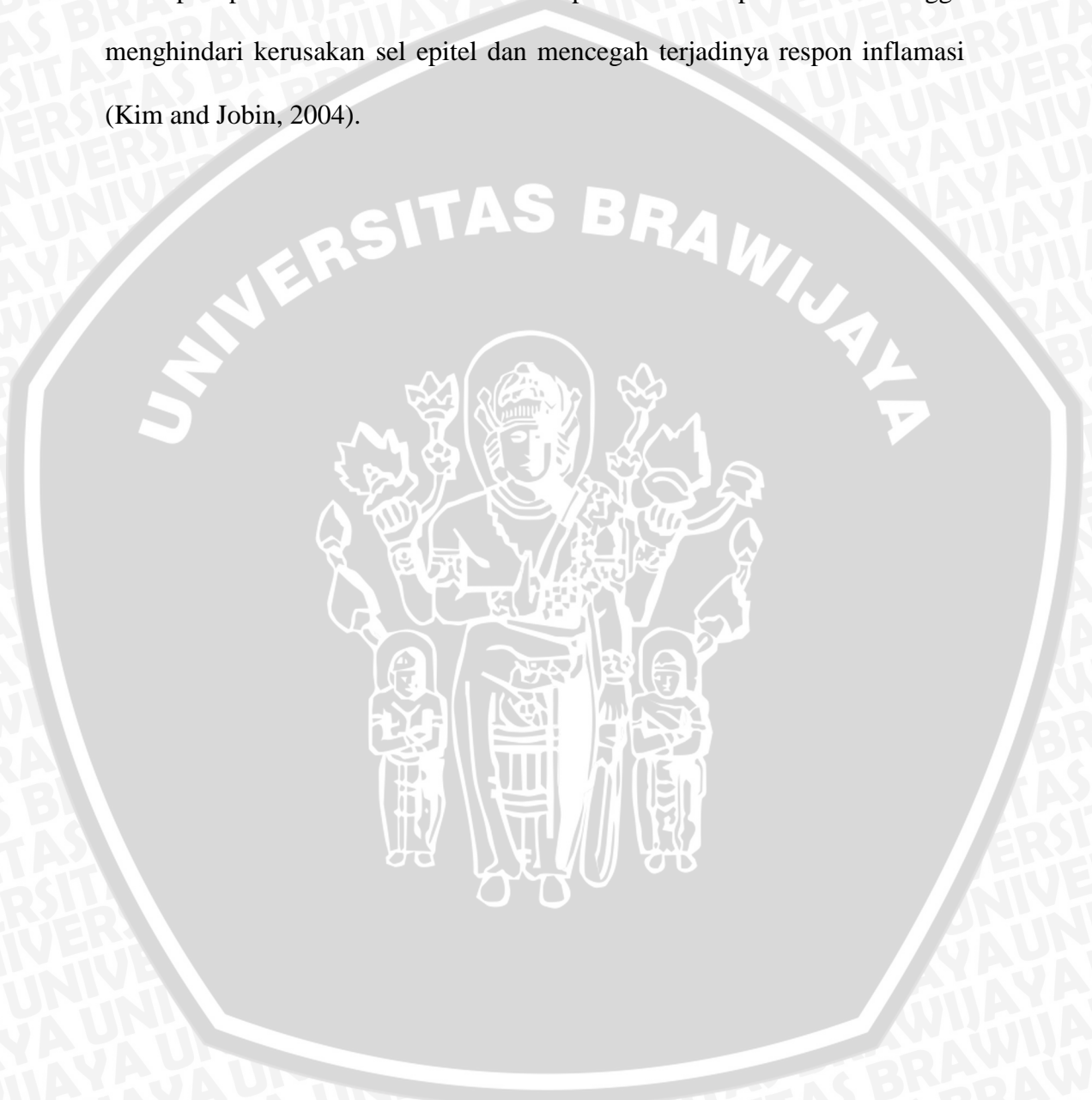
Kelompok tikus asma dengan terapi ekstrak daun putri malu dosis 500 mg/kg BB (Gambar 5.2 C) juga masih terlihat hipertropi otot polos bronkiolus paru, namun mulai terlihat adanya perbaikan kondisi otot polos. Hasil luas potongan melintang otot polos bronkiolus pada Gambar 5.2 C sebesar 3,203 μm . Kelompok tikus dengan terapi ekstrak daun putri malu

dengan dosis 1000 mg/kg BB (Gambar 5.2 D) mengalami penurunan ukuran otot polos bronkiolus paru terhadap kelompok tikus asma. Hasil luas potongan melintang otot polos bronkiolus pada kelompok tikus Gambar 5.2 D sebesar 2,952 μm . Penurunan ukuran otot polos terjadi karena ekstrak daun putri malu yang memiliki kandungan bioaktif tinggi berperan sebagai antiinflamasi pada jaringan berdasarkan hasil uji LCMS (Lampiran 3). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa senyawa flavonoid dari daun putri malu merupakan senyawa fenolik antiinflamasi, antioksidan, penangkap radikal bebas, antialergi dan bersifat hepatoprotektif (Middleton *et al.*, 2000). Flavonoid akan memperbaiki otot polos yang mengalami hipertropi akibat inflamasi, sehingga terjadi penurunan ukuran otot polos seperti yang terlihat pada Gambar 5.2 C dan D.

Berdasarkan penelitian Kashiwara dan Asano (2013), flavonoid yang diberikan pada hewan model asma dapat menghambat aktivasi IL-5 sehingga jumlah eosinofil pada tubuh akan berkurang. Berkurangnya jumlah eosinofil di dalam tubuh akan memberikan pengaruh terhadap jumlah enzim proteolitik pada kondisi asma. Jumlah enzim proteolitik akan berkurang sehingga hipertropi otot polos bronkiolus akan berkurang dan menyebabkan perbaikan gambaran histopatologi paru.

Flavonoid diketahui juga dapat menghambat proliferasi sel T sehingga tidak menginduksi sel B untuk menghasilkan IgE. Tidak diproduksinya IgE, maka tidak terjadi degranulasi sel mast dan produksi enzim protease. Flavonoid juga dapat memblokir transkripsi NF-Kb yang diinduksi oleh LPS,

menghambat IL-12, dan ekspresi TNF-alfa melalui sel epitel dan sel dendritik. Hal tersebut akan meminimalisir sel-sel sitokin dan kemokin yang mencapai permukaan lumen melalui epitel saluran penafasan sehingga menghindari kerusakan sel epitel dan mencegah terjadinya respon inflamasi (Kim and Jobin, 2004).



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

1. Terapi asma menggunakan ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*, Linn.) dengan dosis 500 mg/Kg BB dan 1000 mg/Kg BB dapat meningkatkan aktivitas enzim *Superoksida Dismutase* (SOD) hasil isolasi organ paru tikus putih (*Rattus norvegicus*) model asma. Hasil terbaik ditunjukkan dengan pemberian dosis terapi 1000 mg/kg BB ekstrak daun putri malu.
2. Terapi asma menggunakan ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*, Linn.) dengan dosis 500 mg/Kg BB dan 1000 mg/Kg BB dapat menyebabkan perbaikan gambaran histologi organ paru tikus putih (*Rattus norvegicus*) model asma berupa penurunan ukuran otot polos bronkiolus. Hasil terbaik ditunjukkan dengan pemberian dosis terapi 1000 mg/kg BB ekstrak daun putri malu.

6.2 Saran

Perlu dikaji lebih lanjut mengenai dosis optimal pemberian terapi putri malu sebagai bahan terapi asma.

DAFTAR PUSTAKA


- Allen, R.G. and M. Tressini. 2000. *Oxidative stress and gene regulation*. Free Radical Biol Med 28 :463-99.
- Annisa, Y. S. 2009. *Aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol herba putri malu (Mimosa pudica L) pada tikus putih*. http://lib.farmasi.unpad.ac.id/media_detail.aspx?id=1828. Diakses pada tanggal 15 mei 2013.
- Anonymous. 2011. *Pedoman Pengendalian Penyakit Asma*. Departemen Kesehatan : Jakarta.
- Anonymous. 2007. *In: Global Initiative For Asthma*. Bethesda: National Institutes of Health; p. 50-9.
- Barnes, P.J., K.F. Chung, and C.P. Page. 1998. Inflammatory Mediators of Asthma: An Update. *Pharmacological Reviews* 50(4) : 515 – 596.
- Begueret, H., P. Berger and J.M. Vernejoux. 2007. *Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma*. Thorax.62: 8–15.
- Besselsen, D. G. 2004. *Biology of laboratory rodent*. [terhubung berkala]. <http://www.ahsc.arizona.edu/> [23 Juni 2013].
- Beumer, C., W. Marty, R. Willem, R. Danielle, B. Ruud and S. Willem. 2003. *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, A Novel Therapeutic Drug For Lipopolysaccharide (Lps)- Mediated Diseases, Attenuates Lps Toxicity In Mice And Piglets*, The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics, 307(2):737-744.
- Bowler, R.P. and J.D. Crapo. 2002. *Oxidative Stress in Airways*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166: S38-S43.
- Brown, R.H., W. Mitzner, Y. Bulut and E.M. Wagner. 1997. *Effect of lung inflation in vivo on airways with smooth muscle tone or edema*. J Appl Physiol. 82: 491–499.
- Busse, W.W. and R.F. Lemanske, Jr. 2001. *Asthma*. The New England Journal of Medicine 344(5) : 350-362.
- Caramori, G. and A. Papi. 2004. *Oxidants and Asthma*. Thorax 59 (2): 170-173.
- Carroll, A. E., D. G. Marrero and S.M. Downs. (2007). *The HealthPia GlucoPack™ Diabetes phone: a usability study*. Diabetes Technology and Therapeutics.

- Comhair, S. A., Xuw, S. Ghosh, F. B. Thunnissen, A. Almasan, W. J. Calhoun, A. J. Janocha, L. Zheng, S. L. Hazen dan S. C. Erzurum. 2005b. *Superoxide Dismutase Inactivation in Pathophysiology of Asthmatic Airway Remodeling and Reactivity*. Am. J. Pathol. 166: 663–674.
- Donno, M. D., D. Bittesnich, A. Chetta, D. Olivieri and M. T. Lopez-Vidriero. 2000. *The effect of inflammation on mucociliary clearance in asthma*. Chest; 118: 1142-9.
- Feulner, J. A. 2003. *Identification of Acyloxyacyl Hydrolase, a Lipopolysaccharide-Detoxifying Enzyme, in the Murine Urinary Tract*. Disertation Doctor of Philosophy Faculty of the Graduate School of Biomedical Sciences The University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas.
- Guenther, E. 1987. *Minyak Atsiri, Jilid I, (diterjemahkan oleh Kateren. S.)*. Universitas Jakarta. Jakarta.
- Hedrich, H.J. 2006. Taxonomy stock and strains. *J The laboratory Rat*:71-92
- Huntington J.A. and P.E. Stein. 2001. *Structure and Properties Of Ovalbumin*. Journal of Chromatography B 756(1-2): 189-198.
- Jayani, Yulia, 2007, *Morfologi, Anatomi, Dan Fisiologi Mimosa Pudica, Tanaman Obat Indonesia*, http://toiusd.bmultiply.com/journal/item/279/Morfologi_Anatomi_dan_Fisiologi_Mimosa_pudica_L. Diakses tanggal 29 maret 2013.
- Jenova, Rika. 2009. *Uji Toksisitas Akut yang Diukur Dengan Penentuan LD50 Ekstrak Herba Putri Malu (Mimosa pudica L.) Terhadap Mencit Balb/C*. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang.
- Juliet, Faridah. 2007. *Putri Malu*. <http://eprints.undip.ac.id/view/year/2009.html>. diakses tanggal 19 januari 2013.
- Kumar, R. K., C. Herbert and P. S. Foster. 2008. *The ‘Classical’ Ovalbumin Challenge Model of Asthma in Mice*. Curr. Drug Targets 9, 485–494.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko and J. Parker. 2003. *Brock Biology of Microorganism Pearson Education*. Inc. New Jersey. Hal. 79-80.
- Malole, M.B.M., dan C.S.U. Pramono. 1989. *Penggunaan Hewan-Hewan Percobaan di Laboratorium*. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB.

- Palmans, E., N.J. Vanacker., R.A. Pauwels and J.C. Kips. 2002. *Effect of Age on Allergen Induced Structural Airway Changes in Brown Norway Rats*. Am J Respir Crit Care Med Vol 165: 1280–1284.
- Rogayah, R. *Penatalaksanaan asma bronkial prabedah*. J Respir Indo 1995;15:177-81.
- Saetta, M. and G. Turato. 2001. *Airway Pathology in Asthma*. Eur Respir J (18): Suppl. 34: 18s–23s.
- Schwartz, D. A. 2002. *The Genetics of Innate Immunity*. Chest Journal 121 : 62S–68S.
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine : Principles and Procedures*. United States of America: Mosby, Inc.
- Smith, J. B. and S. Mangkoewidjojo. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakkan, dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Sundaru, H. 2002. *Respons Imun Pada Asma Bronkial. Dalam: Naskah Lengkap Pit Ipd*. Alwi F, Setiati S, Kasjmir YI, Bawazier LA, Syam AF, Mansjoer A, Suprahoita, eds. Jakarta: Pusat Informasi dan Penerbitan Bagian IPD FKUI. p. 1-6.
- Surjanto, E., S. Hambali dan H. Subroto. 1998. *Pengobatan jalan untuk asma*. J Respir Indo 1988;8:30-5.
- Utomo, H. 2006. *Management Of Oral Focal Infection In Patients With Asthmatic Symptoms*. Dent. J. (Maj. Ked. Gigi) 39(3) :120–125.
- Wang, Xiaoyuan and P.J. Quinn. 2010. *Lipopolysaccharide: Biosynthetic Patway and Structure Modification*. Progress in Lipid Research 49: 97–107.
- Zhang, H. and Z. Jin. 2011. *Preparation of resistant starch by hydrolysis of maize starch with pullulanase*. J Carbohy Polymers. 83: 865–867.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 208-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**


**PENELITIAN BERJUDUL : PENGARUH TERAPI EKSTRAK DAUN PUTRI MALU
(*Mimosa pudica*) BERDASARKAN PADA
PENGUKURAN KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA)
SERTA GAMBARAN HISTOPATOLOGI EPITEL
BRONKIOLUS TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA**

PENELITI : RIZY AHMADA

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 3 Maret 2014
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



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

Lampiran 2. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman



LABORATORIUM TAKSONOMI, STRUKTUR DAN
PERKEMBANGAN TUMBUHAN
JURUSAN BIOLOGI, FAKULTAS MIPA
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
JALAN VETERAN, MALANG 65145
Telepon/faks: 0341-575841

KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0102/Takso.Identifikasi/03/2013

Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

Nama : Rizy Ahmada (NIM. 105130101111075)
Anita Wanda S (NIM. 105130101111063)
Nisa Mufidah (NIM. 105130101111062)
Adekhantari Y (NIM. 105130101111064)
Yehuda Laksana A (NIM. 105130101111011)
Hadlrotus Okvianty M P (NIM. 105130107111013)

Instansi : Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume I, halaman 561, diidentifikasi sebagai:

Familia : Fabaceae
Genus : *Mimosa*
Species : *Mimosa pudica* L.

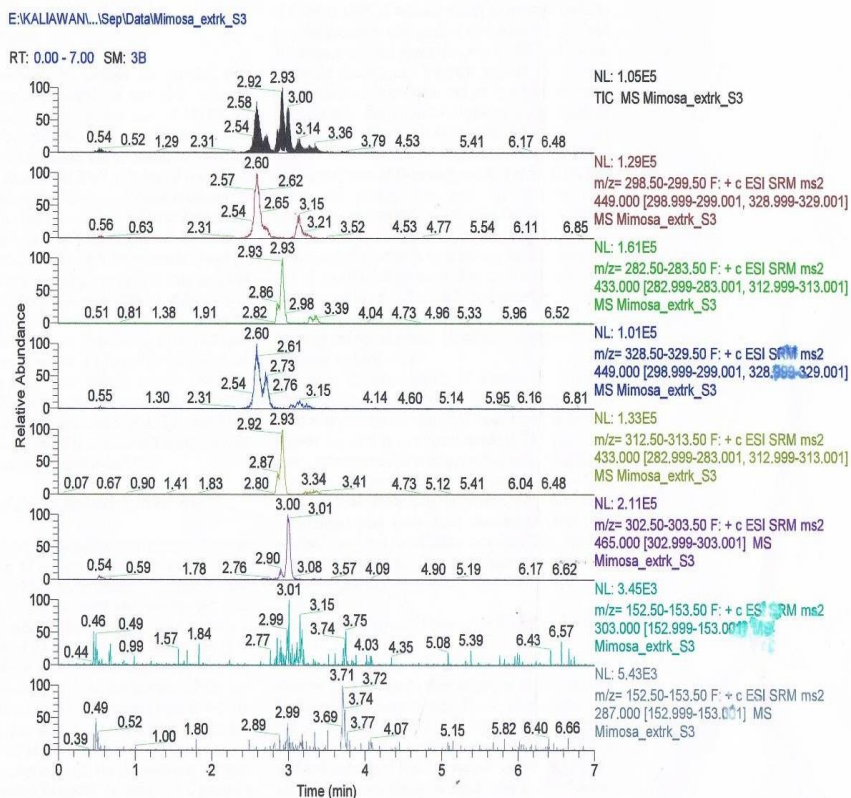
Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 26 Agustus 2013

Kepala Laboratorium
Taksonomi, Struktur dan
Perkembangan Tumbuhan,

Dr. Serafinah Indriyani, M.Si.
LABORATORIUM TAKSONOMI TUGS 0909-198802 2 001

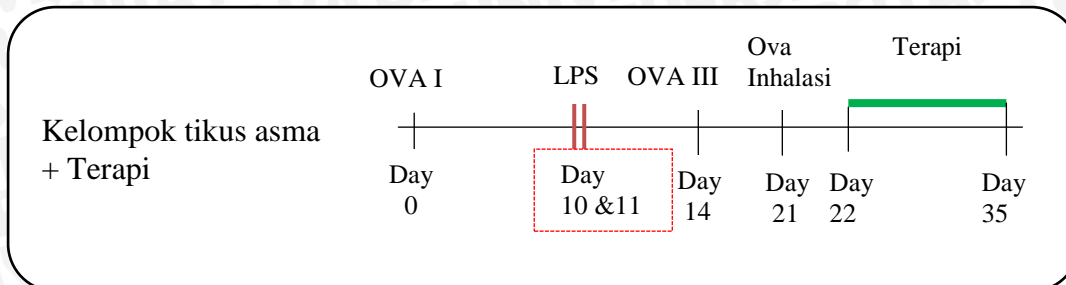
Lampiran 3. Hasil Uji LCMS



- 1) Isoorientin : Molar mass 299 g/mol
- 2) Isovitexin : Molar mass 283 g/mol
- 3) Orientin : Molar mass 329 g/mol
- 4) Vitexin : Molar mass 313 g/mol
- 5) Isoquercetin : Molar mass 303 g/mol
- 6) Quercetin : Molar mass 153 g/mol
- 7) Kaempferol : Molar mass 153 g/mol

Lampiran 4. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian

A. Rancangan Perlakuan

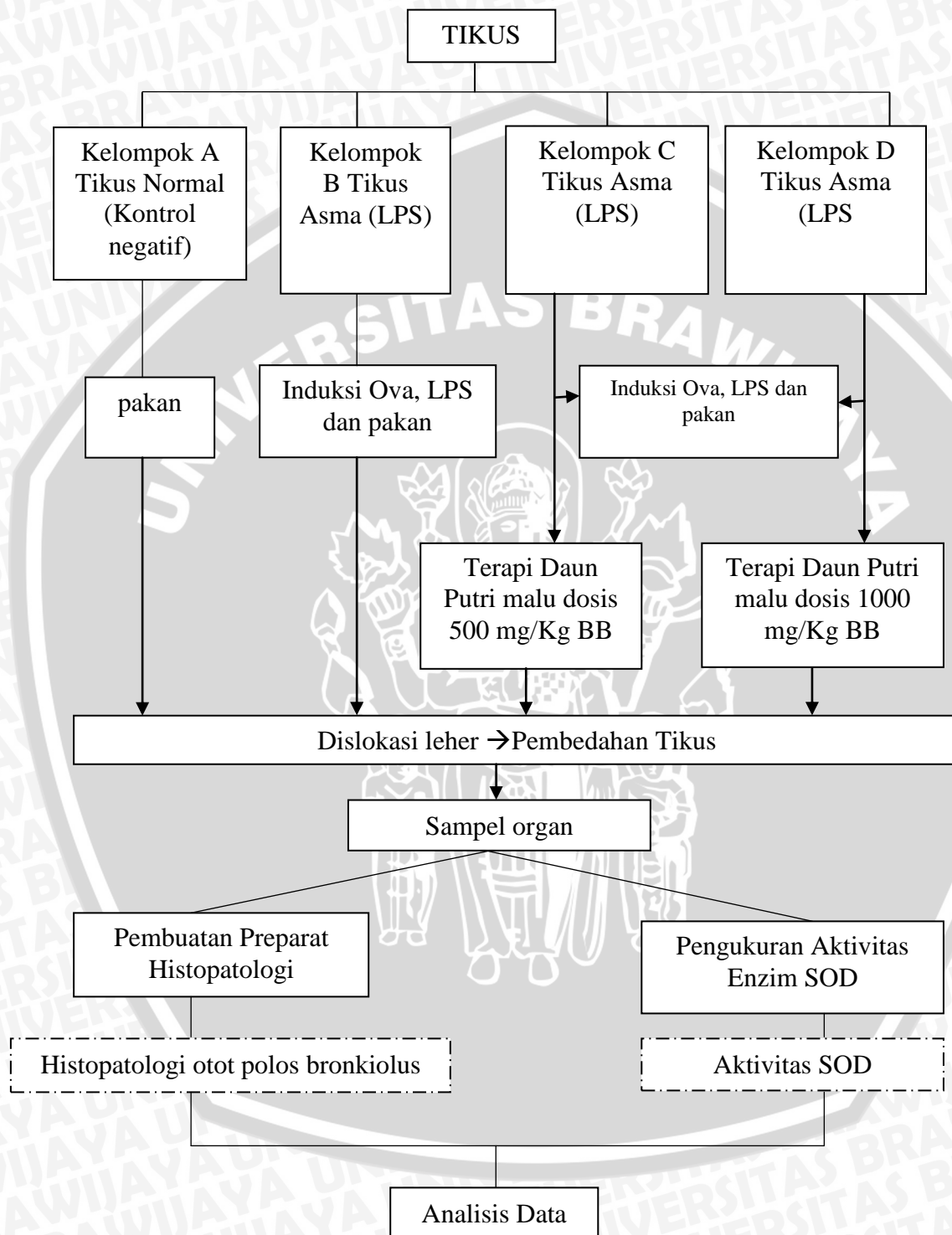


Keterangan

1. Injeksi OVA I dan OVA II dilakukan secara intraperitoneal dengan dosis 10 μg dengan ajuvan AlOH_3 dalam larutan 200 μl PBS
2. Injeksi LPS dilakukan secara intrasulkuler di sulkus ginggiva tikus sebesar 1 μg dalam 200 μl PBS
3. Inhalasi OVA dilakukan dengan nebulasi OVA dalam larutan NaCl steril dengan dosis 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ selama 20 menit
4. Pada hari ke-21 untuk tikus kontrol positif (asma), dilakukan pembedahan pada tikus 30 menit setelah paparan OVA secara inhalasi untuk mengisolasi organ paru yang digunakan untuk pengukuran aktivitas SOD dan pembuatan preparat histopatologi bronkiolus dengan pewarnaan HE
5. Pada kelompok tikus C dan D pada hari ke-22 sampai hari ke-35 dilakukan terapi dengan dosis 500 mg/Kg BB dan 1000 mg/Kg BB



B. Kerangka Operasional



Keterrangan :



: Parameter yang diamati

Lampiran 5. Perhitungan Dosis

Dosis experimental ditentukan berdasarkan penelitian Rajendran, 2010.

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 500 mg/Kg BB dan 1000 mg/Kg BB, hal ini dikarenakan dosis yang sering dipakai dalam penelitian menggunakan ekstrak daun putri malu antara 200 mg/Kg BB sampai 2000 mg/Kg BB. Pemberian dosis lebih dari 2000 mg/Kg BB diduga merupakan dosis yang toksik.

Kelompok C (Dosis terapi = 500 mg/kg BB)

Perhitungan untuk dosis 500 mg/Kg BB

Diketahui :

- Rata-rata berat badan tikus adalah 200 g,

$$\text{Dihitung :} = \frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 500 \text{ mg}$$

$$= 100 \text{ mg berat kering daun putri malu/ ekor tikus}$$

Perhitungan berat kering daun putri malu untuk satu kelompok perlakuan terapi

500 mg/Kg BB

Diketahui :

- Banyaknya daun putri malu yang dibutuhkan per ekor adalah 100 mg
- Jumlah kelompok terapi 500 mg/Kg BB adalah 5 ekor

Dihitung :

$$\text{Berat kering daun putri malu} = \text{jumlah pemberian/ekor} \times \text{jumlah tikus}$$

$$= 100 \text{ mg} \times 5$$

$$= 500 \text{ mg/ 5 ekor tikus}$$

Perhitungan = 500 mg --- 100 ml → 500 mg/ 10 ml

100 mg/ 2 ml

Dosis terapi = 500 mg, untuk tikus berat 200 gr = 100 mg/ekor tikus

Volume pemberian 2 ml/ekor tikus

Diagram :

Daun Putri malu (*Mimosa pudica*)

- Ditimbang sebanyak 0,5 gram (500 mg)
- Dimasukkan ke labu ukur
- Ditambahkan aquades hingga 100 ml
- Direbus pada temperatur 70°C
- Disisihkan air rebusan hingga 10 ml
- Disaring menggunakan kertas saring

Ekstrak Air daun Putri malu

Kelompok D (Dosis terapi = 1000 mg/kg BB)

Perhitungan untuk dosis 1000 mg/Kg BB

Diketahui :

- Rata-rata berat badan tikus adalah 200 g,

Dihitung : = $\frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 1000 \text{ mg}$

= 200 mg berat kering daun putri malu/ ekor tikus

Perhitungan berat kering daun putri malu untuk satu kelompok perlakuan terapi

1000 mg/Kg BB

Diketahui :

- Banyaknya daun putri malu yang dibutuhkan per ekor adalah 200 mg
- Jumlah kelompok terapi 1000 mg/Kg BB adalah 5 ekor

Dihitung :

Berat kering daun putri malu = jumlah pemberian/ekor x jumlah tikus

$$= 200 \text{ mg} \times 5$$

$$= 1000 \text{ mg} / 5 \text{ ekor tikus}$$

Perhitungan = 1000 mg --- 100 ml \rightarrow 1000 mg/ 10 ml

$$200 \text{ mg} / 2 \text{ ml}$$

Dosis terapi = 1000 mg, untuk tikus berat 200 gr = 200 mg/ekor tikus

Volume pemberian 2 ml/ ekor tikus

Diagram :

Daun Putri malu (*Mimosa pudica*) Kering

- Ditimbang sebanyak 1 gram (1000 mg)
- Dimasukkan ke labu ukur
- Ditambahkan aquades hingga 100 ml
- Direbus pada temperatur 70°C
- Disisihkan air rebusan hingga 10 ml
- Disaring menggunakan kertas saring

Ekstrak Air Daun Putri malu

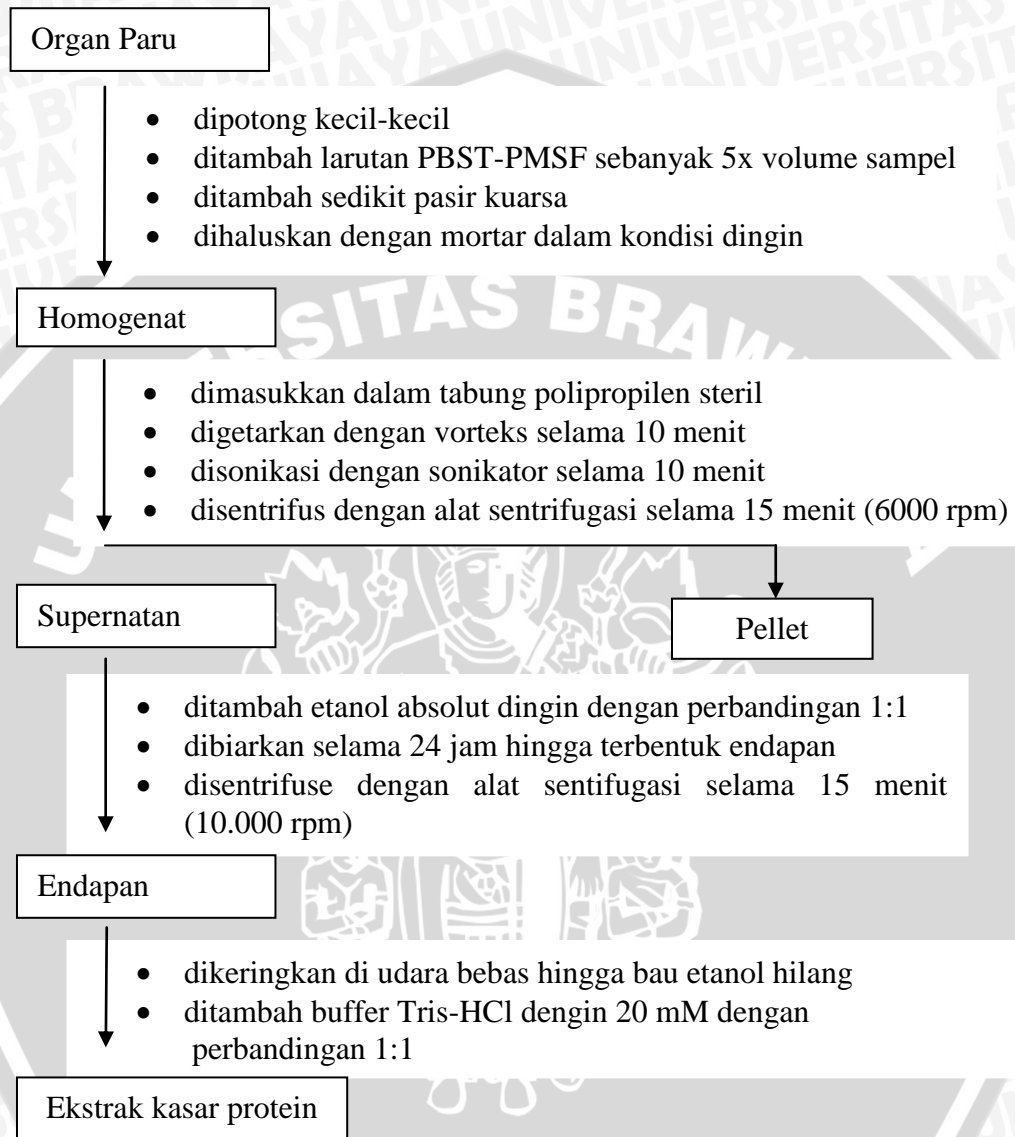
Lampiran 6. Komposisi Larutan

Tabel L6.1 Komposisi Larutan

No	Larutan	Bahan-Bahan
1	100 ml NaCl fisiologis 0,9 %	4,5 gram garam NaCl Akuades
2	PBS pH 7,4	0,2 gram KCl 0,2 gram KH_2PO_4 8 gram NaCl 2,16 gram $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
3	Larutan OVA injeksi	10 μg Ovalbumin 1,5 mg AlOH_3 Dilartukan dalam 200 μl PBS
4	TCA 10 %	TCA 10 g Akuades 100 ml
5	Na-Thio 1 %	Asam thiobarbiturat 0,868 g NaOH 0,241 Akuades 100 ml
6	HCl 1 N	HCL 37 % 7,780 ml Akuades 100 ml
7	Buffer formalin 10 %	100 ml formaldehida 40 % 4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 6,5 g Na_2HPO_4 900 ml Akuades

Lampiran 7. Diagram Kerja Penelitian

7.1 Isolasi Protein



LAMPIRAN 8. Perhitungan Aktivitas SOD

8.1 Rumus Perhitungan

Misal : Pengukuran aktivitas protease kontrol 1

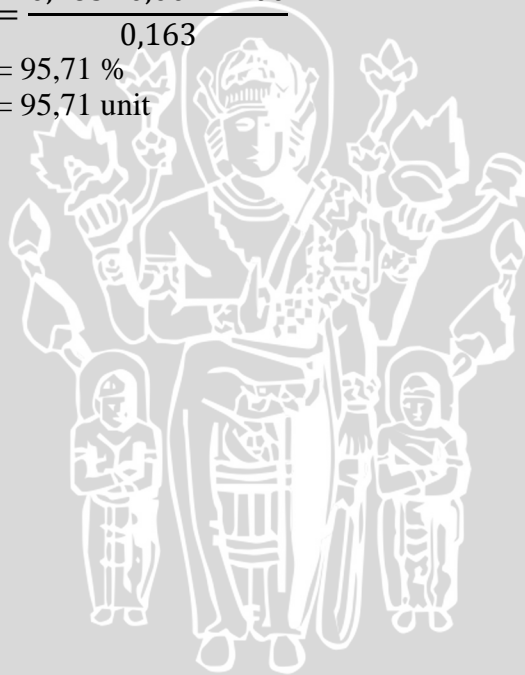
Diketahui nilai absorbansi sampel sebesar 2,034, absorbansi blanko 1 sebesar 0,236, absorbansi blanko 2 sebesar 2,027, dan absorbansi blanko 3 sebesar 0,073.

Perhitungan aktivitas Enzim SOD dapat dilakukan dengan rumus :

$$\text{Aktivitas SOD} = \frac{(\text{Ablanko1} - \text{A blanko3}) - (\text{Asampel} - \text{A blanko2}) \times 100}{(\text{Ablanko1} - \text{Ablanko3})}$$

Maka Aktivitas SOD pada Kontrol 1 adalah :

$$\begin{aligned}\text{Aktivitas SOD} &= \frac{(0,236 - 0,073) - (2,034 - 2,027) \times 100}{(0,236 - 0,073)} \\ \text{Aktivitas SOD} &= \frac{0,163 - 0,007 \times 100}{0,163} \\ &= 95,71 \% \\ &= 95,71 \text{ unit}\end{aligned}$$



LAMPIRAN 9. Tabel Perhitungan Aktivitas Enzim SOD

Kode Sampel	Absorbansi Sampel	Absorbansi B 1	Absorbansi B 2	Absorbansi B 3	Absorbansi (B 1- B 3)	Absorbansi (Sampel -B 2)	Aktivitas SOD (%)	Aktivitas SOD (unit)	Rata-rata	Standard Deviasi
K 1	2,034	0,236	2,027	0,073	0,163	0,007	95,71	95,71		
K 2	1,325	0,236	1,310	0,073	0,163	0,015	90,80	90,80		±
K 3	1,591	0,236	1,569	0,073	0,163	0,022	86,50	86,50	91,04	3,593
K 4	1,439	0,236	1,421	0,073	0,163	0,018	88,96	88,96		02
K 5	2,031	0,236	2,020	0,073	0,163	0,011	93,25	93,25		
A 1	2,032	0,236	1,919	0,073	0,163	0,113	30,67	30,67		
A 2	1,211	0,236	1,111	0,073	0,163	0,1	38,65	38,65		±
A 3	1,269	0,236	1,17	0,073	0,163	0,099	39,26	39,26	35,95	4,285
A 4	1,467	0,236	1,356	0,073	0,163	0,111	31,90	31,90		71
A 5	2,034	0,236	1,935	0,073	0,163	0,099	39,26	39,26		
T ₁ 1	1,594	0,236	1,539	0,073	0,163	0,055	66,26	66,26		
T ₁ 2	1,593	0,236	1,542	0,073	0,163	0,051	68,71	68,71		±
T ₁ 3	1,366	0,236	1,295	0,073	0,163	0,071	56,44	56,44	63,80	5,077
T ₁ 4	1,456	0,236	1,392	0,073	0,163	0,064	60,74	60,74		59
T ₁ 5	1,674	0,236	1,62	0,073	0,163	0,054	66,87	66,87		
T ₂ 1	1,018	0,236	0,989	0,073	0,163	0,029	82,21	82,21		
T ₂ 2	1,228	0,236	1,185	0,073	0,163	0,043	73,62	73,62		±
T ₂ 3	1,222	0,236	1,196	0,073	0,163	0,026	84,05	84,05	79,88	4,972
T ₂ 4	1,313	0,236	1,273	0,073	0,163	0,04	75,46	75,46		73
T ₂ 5	1,265	0,236	1,239	0,073	0,163	0,026	84,05	84,05		

Keterangan Tabel :

- K = tikus kontrol (tanpa perlakuan)
- A = tikus asma
- T₁ = tikus asma dengan diberikan terapi ekstrak daun putri malu sebanyak 500 mg/Kg BB
- T₂ = tikus asma dengan diberikan terapi ekstrak daun putri malu sebanyak 1000 mg/Kg BB
- B 1 = Blanko 1
- B 2 = Blanko 2
- B 3 = Blanko 3



LAMPIRAN 10. Data dan Uji Statistik Aktivitas SOD

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Perlakuan	,169	20	,139	,863	20	,009
AktivitasSOD	,155	20	,200*	,905	20	,051

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

AktivitasSOD

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,927	3	16	,450

ANOVA

AktivitasSOD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8583,052	3	2861,017	139,894	,000
Within Groups	327,220	16	20,451		
Total	8910,272	19			



Multiple Comparisons

Dependent Variable: AktivitasSOD

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
	Perlakuan	Perlakuan				Lower Bound	Upper Bound
LSD	Kontrol	Asma	55,09600*	2,86016	,000	49,0327	61,1593
		Terapi 500 mg/Kg BB	27,24000*	2,86016	,000	21,1767	33,3033
		Terapi 1000 mg/Kg BB	11,16600*	2,86016	,001	5,1027	17,2293
	Asma	Kontrol	-55,09600*	2,86016	,000	-61,1593	-49,0327
		Terapi 500 mg/Kg BB	-27,85600*	2,86016	,000	-33,9193	-21,7927
		Terapi 1000 mg/Kg BB	-43,93000*	2,86016	,000	-49,9933	-37,8667
	Terapi 1000 mg/Kg BB	Kontrol	-27,24000*	2,86016	,000	-33,3033	-21,1767
		Asma	27,85600*	2,86016	,000	21,7927	33,9193
		Terapi 1000 mg/Kg BB	-16,07400*	2,86016	,000	-22,1373	-10,0107
	Terapi 1000 mg/Kg BB	Kontrol	-11,16600*	2,86016	,001	-17,2293	-5,1027
		Asma	43,93000*	2,86016	,000	37,8667	49,9933
		Terapi 500 mg/Kg BB	16,07400*	2,86016	,000	10,0107	22,1373

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

AktivitasSOD

	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Tukey B ^a	Asma	5	35,9480			
	Terapi 500 mg/Kg BB	5		63,8040		
	Terapi 1000 mg/Kg BB	5			79,8780	
	Kontrol	5				91,0440

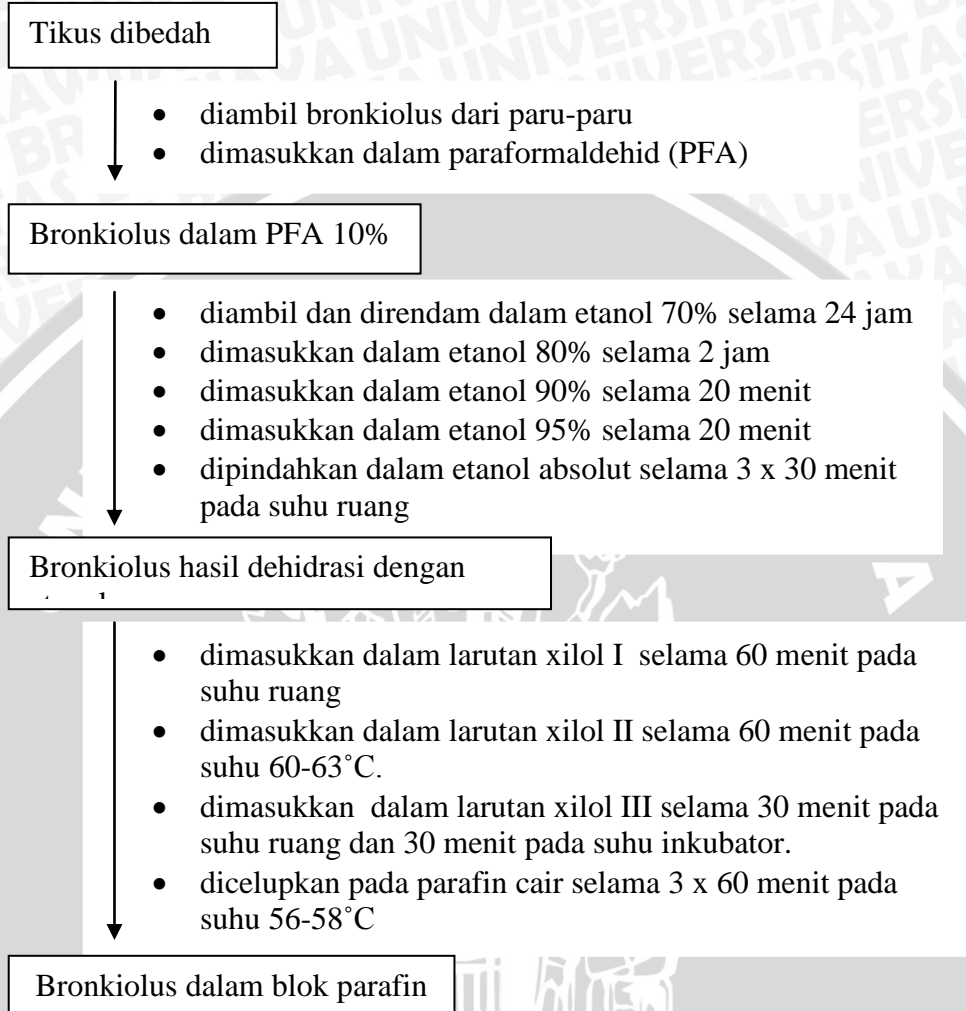
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

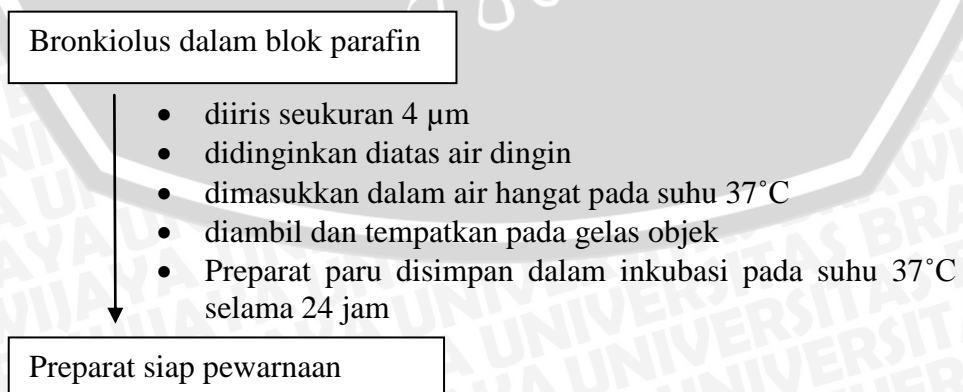


Lampiran 11. Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE)

11.1 Embedding Bronkiolus



11.2 Pembuatan preparat organ



11.3 Pewarnaan Hematosilin-Eosin

Preparat

- dideparafinasi dengan xilol selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol absolut selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 95% selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 90% selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 80% selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 70% selama 5 menit
- dicuci dengan air mengalir selama 15 menit
- direndam dalam akuades steril selama 5 menit

Preparat

- diwarnai dengan Hematoksilin selama 10 menit atau sampai diperoleh hasil terbaik
- dicuci dengan air mengalir selama 30 menit
- dibilas dan direndam dengan akuades selama 5 menit
- diwarnai dengan Eosin selama 5 menit
- dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit
- dicuci air dengan akuades selama 5 menit
- dimasukkan dalam etanol 70% selama 5 detik
- dimasukkan dalam etanol 80% selama 5 detik
- dimasukkan dalam etanol 90% selama 5 detik
- dimasukkan dalam etanol 95% selama 5 detik
- dimasukkan kedalam etanol absolut 3 x 2 menit
- dimasukkan dalam larutan xilol 3 x 3 menit
- dikering anginkan dan ditutup dengan *cover glass*
- *dimounting* dengan menggunakan entellan
- ditutup dengan *cover glass*

Preparat Bronkiolus