

PENGARUH PEMBERIAN HERBAL *SPRAY* BERBASIS BIOAKTIF DARI SPIRULINA (*Spirulina* sp.) TERHADAP EKSPRESI iNOS PADA SEL β -PANKREAS DAN AKTIVITAS PROTEASE PADA LUKA TIKUS DM TIPE 1

Rachmawati Dwi Agustin, Aulanni'am*, Chanif Mahdi

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran Malang 65145

*Alamat korespondensi, Tel : +62-341-575838, Fax : +62-341-575835
Email: aulani@ub.ac.id

ABSTRAK

Diabetes Melitus (DM) merupakan penyakit yang disebabkan oleh gangguan metabolisme karbohidrat. DM juga dapat disebabkan oleh rusaknya sel-sel β dari pulau-pulau Langerhans pada pankreas yang berfungsi sebagai penghasil insulin. Penderita DM yang sedang terluka akan lebih sulit dalam proses penyembuhan lukanya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian herbal *spray* Spirulina terhadap perubahan luka sayatan, penurunan ekspresi iNOS pada sel β -pankreas dan aktivitas protease pada luka tikus hasil induksi MLD STZ (*Multi Low Dose Streptozotocin*) dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari berturut-turut. Pada penelitian ini menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) dibagi dalam 3 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor, tiga kelompok tersebut adalah kelompok tikus sehat dengan luka sayatan di punggung, kelompok tikus DM dengan luka sayatan dan kelompok tikus DM dengan luka sayatan yang diberi terapi herbal *spray* Spirulina selama 14 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian herbal *spray* Spirulina dapat mengurangi panjang luka sayatan pada tikus DM tipe 1 dari 4,28 cm menjadi 0,5 cm, mampu menurunkan ekspresi iNOS pada sel β -pankreas tikus DM tipe 1 serta mampu menurunkan aktivitas protease pada luka tikus DM tipe 1 sebesar 48,23%.

Kata kunci: aktivitas protease, DM tipe 1, ekspresi iNOS, herbal *spray* Spirulina, luka.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a disease caused by disorders of carbohydrate metabolism. DM can also be caused by the destruction of β cells of the islet of Langerhans in the pancreas that functions as an insulin-producing. In patients with DM when injured will be more difficult in the wound healing process. This study aims to determine the effect of Spirulina herbal *spray* against changes cuts, reduction in iNOS expression in β -cells of the pancreas and protease activity in wound induction results MLD STZ rats (*Multi Low Dose Streptozotocin*) at a dose of 20 mg / kg for 5 consecutive days in a row. In this study using rats (*Rattus norvegicus*) were divided into three groups with each group consisting of 5 rats, the three groups are groups of healthy mice with skin wound on his back, a group of diabetic rats with wound and groups diabetic rats with wound and to get therapy of Spirulina herbal *spray* during 14 days. The results showed that administration of Spirulina herbal *spray* can reduce the length of incision wounds in diabetic rats from 4,28 cm until 0,5 cm, able to decrease the expression of iNOS in pancreatic β -cells of DM type 1 rats and also able to decrease of 48,23% protease activity in wound DM type 1 rats.

Keywords: protease activity, DM type 1, iNOS expression, herbal *spray* Spirulina, wound.

PENDAHULUAN

Penderita Diabetes Melitus (DM) semakin meningkat, tercatat pada tahun 1995 jumlah penderita DM di Indonesia mencapai 5 juta jiwa, tahun 2005 diperkirakan akan mencapai 12 juta penderita [1]. Penderita DM yang sedang terluka akan lebih sulit dalam proses penyembuhan

lukanya akibat kadar glukosa darah yang tinggi dapat mengganggu fungsi kekebalan tubuh dalam menghadapi masuknya virus atau kuman serta memicu produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebih. Sehingga dapat memicu terjadinya peningkatan aktivitas enzim protease yang berlebih yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan tidak lagi berperan dalam penyembuhan luka untuk membunuh bakteri pada sel yang mengalami inflamasi [2]. Peningkatan produksi ROS dapat dilakukan dengan menginduksi hewan coba tikus dengan MLD-STZ sehingga dapat menghasilkan radikal nitrogen oksida (NO) dalam jumlah banyak yang akan bereaksi dengan superoksida membentuk peroksinitrit (ONOO^-) [3]. Pembentukan NO berperan dalam penghancuran sel β -pankreas, maka dapat digunakan sebagai parameter untuk mengetahui kerusakan yang terjadi pada sel β -pankreas melalui ekspresi iNOS dengan metode imunohistokimia.

Pemanfaatan *Spirulina* sp. sebagai obat DM tipe 1 dikarenakan *Spirulina* sp. memiliki kandungan antioksidan sebanyak 76% berpotensi besar untuk mengobati luka sayatan pada penderita diabetes, serta dapat berpotensi menurunkan kadar glukosa darah [4]. Kandungan antioksidan yang tinggi dapat memperbaiki sel β pankreas dan dapat bertindak sebagai *scavenger* ROS yang akan menghambat aktivitas protease pada organ kulit. Cairan hasil semprotan Herbal *spray* akan masuk ke dalam tubuh melalui luka. Berdasarkan uraian tersebut, maka perlu dilakukan penelitian mengenai herbal *spray* berbasis bioaktif *Spirulina* dalam menghambat protease berlebih dalam tubuh serta dapat memperbaiki kerusakan pankreas yang ditunjukkan melalui ekspresi iNOS pada organ pankreas untuk tikus DM T1.

METODA PENELITIAN

Bahan dan Alat

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan umur 3 bulan dengan berat badan rata-rata 130-230 gram yang diperoleh dari Universitas Brawijaya. Tikus dibunuh dengan cara dislokasi leher dan diambil organ pankreas dan kulit. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapat sertifikat laik etik No: 175-KEP-UB dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya.

Bahan-bahan yang digunakan adalah *Spirulina*, Streptozotocin (STZ), asam sitrat, natrium sitrat, KCl, NaCl, alkohol 70%, akuades, pereaksi Wagner, NaOH 1N, HCl 1N, CHCl_3 , H_2SO_4 pekat, NH_3 0,05 M, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , NaN_3 , formaldehid 37%, parafin cair, xilol 1, 2, 3, PBS pH 7,4, H_2O_2 3%, BSA, antibodi primer *anti rat iNOS* 2, antibodi sekunder *anti rabbit biotin*, SA-HRP, DAB, entellan, tirosin, kasein, PBS Tween-PMSF, pasir kuarsa, etanol absolut 99%, buffer Tris-HCl, TCA 4%, akuades steril.

Peralatan yang digunakan adalah seperangkat alat gelas (cawan petri, gelas objek, labu takar, pipet tetes, gelas ukur 10 mL dan 100 mL, gelas kimia, pengaduk kaca, corong gelas), mortar, pipet tetes, pipet mikro, penangas air, *waterbath*, pengaduk magnet, botol semprot, *eppendorf*, tabung polipropilen, lemari pendingin, pH meter digital (Inolab-WTW), penjepit, pisau *scalpel*, neraca analitik, seperangkat alat sentrifugasi (tabung sentrifugasi, alat sentrifugasi) Denley tipe BR 401, inkubator, vortex (Guo-Huq), Spektrofotometer UV, autoclaf, seperangkat kandang tikus, gunting, pinset, spuit, glukometer, glukotest strip, plastik, penggaris, spidol, seperangkat alat kromatografi cair-spektrometri massa, mikroskop cahaya (Olympus CX-31), sonikator (Branson 200), tisu, toples, sarung tangan.

Pembuatan Herbal *Spray* Berbasis Bioaktif *Spirulina* (*Spirulina* sp.)

Spirulina (*Spirulina* sp.) dicuci dengan akuades sampai bersih dan dipotong dengan ukuran ± 2 cm. Kemudian dikeringanginkan selama 2-3 hari lalu dikeringkan di dalam oven pada suhu $\leq 45^{\circ}\text{C}$ selama 1 hari. Sebanyak 5 gram *Spirulina* yang telah kering ditambahkan akuades sebanyak 100 mL, kemudian dipanaskan pada suhu $\leq 70^{\circ}\text{C}$ hingga diperoleh volume ekstrak sebanyak 5 mL. Ekstrak *Spirulina* yang telah disaring ditampung dalam *eppendorf* 1,5 mL, selanjutnya disimpan pada suhu 4°C . Konsentrasi ekstrak yang diperoleh sebesar 853,9 g/L. Pembuatan herbal *spray* dibuat dengan komposisi 60% ekstrak *Spirulina* dan 40% *ringer solution* jenis NaCl-Fisiologi 0,9% dengan konsentrasi *spray* sebesar 34 μL dalam satu kali semprotan. Pemberian herbal *spray* diberikan sebanyak 6 kali semprotan yaitu sebesar 204 μL .

Isolasi Protease dari Organ Kulit

Organ kulit dipotong kecil-kecil kemudian ditambahkan dengan larutan PBS-tween PMSF sebanyak 5x volume dari sampel. Setelah itu, ditambah sedikit pasir kuarsa. Organ digerus dengan mortar dingin. Setelah diperoleh homogenat dimasukkan ke dalam tabung polipropilen yang telah disterilisasi dengan *autoclaf*. Kemudian dihomogenkan selama 10 menit, selanjutnya disonikasi selama 10 menit dan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Supernatan yang diperoleh diambil dan ditambahkan dengan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 pada pendingin -20°C kemudian didiamkan hingga terbentuk endapan. Setelah itu disentrifugasi kembali selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Kemudian endapan diambil dan dikeringanginkan sampai bau etanol menghilang. Endapan yang diperoleh ditambahkan dengan larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,5 dengan perbandingan 1:1, selanjutnya diperoleh ekstrak kasar dari protein.

Pengukuran Aktivitas Protease

Kasein 500 ppm sebanyak 200 μL , 300 μL larutan buffer fosfat pH, dan 100 μL enzim protease dicampurkan lalu didiamkan selama 60 menit pada suhu 37°C di atas penangas air.

Kemudian ditambahkan 400 μ L larutan TCA 4% secepatnya, lalu didiamkan selama 30 menit pada suhu 27°C. Setelah itu, disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Supernatan diambil 100 μ L dan diencerkan sebanyak 5x volume sampel dengan buffer fosfat lalu diukur nilai absorbansinya pada λ maks tirosin sebesar 275 nm. Satu unit aktivitas enzim protease didefinisikan sebagai banyaknya satu mikromol tirosin per menit pada kondisi optimal enzim tersebut pada reaksi enzimatik.

Ekspresi iNOS dengan Metode Imunohistokimia

Imunohistokimia diawali dengan tahapan merendam preparat pada xilol 1, xilol 2, etanol bertingkat (99%, 90%, 80%, 70%), dan akuades masing-masing selama 5 menit. Slide preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit. Preparat ditetesi dengan 3% H₂O₂ selama 20 menit, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3x. Kemudian diblok dengan 5% FBS (*Fetal Bovine Serum*) yang mengandung 0.25% teilon x-100 selama 45 menit. Preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3x. Preparat kemudian diinkubasi dengan antibodi primer *anti rat iNOS 2* selama 4 jam pada suhu ruang, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3x. Diinkubasi menggunakan antibodi sekunder *anti rabbit biotin* (Santa Cruz) selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3x. Ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin-horse radin peroxidase*) diinkubasi selama 45 menit. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3x. Ditetesi dengan DAB (*Diamino Benzidine*) dan diinkubasi selama 7 menit kemudian dicuci dengan akuades selama 5 menit sebanyak 3x. *Counterstaining* menggunakan *Mayer Hemotoxilen* selama 10 menit. Preparat dicuci dengan akuades selama 5 menit sebanyak 3x dan dikeringanginkan. Preparat dimounting dengan *entellan* dan ditutup dengan *cover glass*. Preparat positif mengekspresikan iNOS apabila terdapat warna coklat pada preparat.

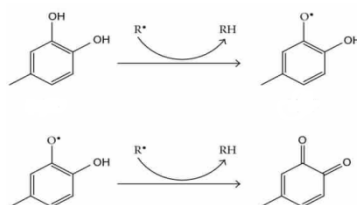
HASIL DAN PEMBAHASAN

Terapi Hewan Coba terhadap Panjang Luka Tikus

Hasil penelitian menunjukkan pemberian herbal *spray* Spirulina digunakan sebagai terapi tikus yang diinduksi dengan MLD-STZ secara intraperitoneal (i.p) [5] dengan dosis 20 mg/kg BB/hari selama 5 hari menyebabkan tikus menderita DM tipe 1 kemudian diinsisi. DM tipe 1 ditandai peningkatan kadar glukosa darah, sulitnya dalam penyembuhan luka, rusaknya sel β -pankreas dan meningkatnya aktivitas protease akibat semakin meningkatnya ROS.

Pemberian terapi herbal *spray* Spirulina memberikan hasil penurunan kadar glukosa darah dan penciutan panjang luka tikus. Hal ini dikarenakan adanya perbaikan sel β -pankreas dan tercukupinya asupan antioksidan pada tikus terapi sehingga terjadi penurunan kadar

radikal bebas dan memperlancar aliran darah serta asupan oksigen menuju luka yang mengalami inflamasi sehingga mempercepat proses penyembuhan luka, ditunjukkan pada Tabel 1. Senyawa-senyawa polifenol yang terkandung dalam herbal *spray* Spirulina yaitu flavonoid jenis kuersetin berfungsi sebagai *scavenger* (penangkap) dikarenakan adanya gugus hidroksil pada cincin aromatis akan mendonasikan atom H pada radikal bebas. Kemudian mengalami stabilitas resonansi oleh sistem ikatan rangkap terkonjugasi sehingga radikal tersebut bersifat kurang reaktif. Perbaikan sel β -pankreas ini melalui masuknya herbal *spray* ke dalam tubuh melalui luka kemudian dibawa oleh aliran darah hingga menuju ke sel β pankreas, kandungan antioksidan dalam herbal *spray* Spirulina akan menambah asupan antioksidan dalam tubuh sehingga terjadi keseimbangan antara jumlah antioksidan dan radikal bebas dalam tubuh, maka akan terjadi penurunan kadar glukosa darah dan penciutan panjang luka tikus.



Gambar 1. Reaksi *scavenging* radikal bebas (R^*) oleh senyawa polifenol

Tabel 1. Panjang Luka Rata-rata Tikus Sehat, Tikus Sakit, dan Tikus Terapi

Panjang Luka Rata-rata (cm)	Tikus Sehat	Tikus Sakit	Tikus Terapi
Hari ke-0	4,5	3,16	4,28
Hari ke-2	4,1	3,11	3,82
Hari ke-4	3,64	2,98	3,16
Hari ke-6	3,08	2,88	2,74
Hari ke-8	2,74	2,8	2,2
Hari ke-10	1,84	2,72	1,67
Hari ke-12	1,3	2,54	1,08
Hari ke-14	0,4	2,38	0,5

Pengaruh Pemberian Herbal *Spray* Spirulina terhadap Aktivitas Protease pada Luka

Aktivitas enzim protease pada luka tikus (*Rattus norvegicus*) akibat paparan MLD-STZ dan terapi herbal *spray* Spirulina diamati melalui uji aktivitas protease hasil isolasi organ kulit luka tikus (*Rattus norvegicus*) diukur pada kondisi optimum yaitu pH 6,5, suhu 37°C dan waktu inkubasi 60 menit.

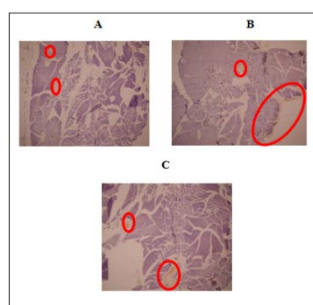
Tabel 2. Rataan Aktivitas Protease Hasil Isolasi dari Kulit Luka Tikus (*Rattus norvegicus*)

Perlakuan	Rataan Aktivitas Protease ($\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$)	Peningkatan Aktivitas Protease (%)
Tikus Sehat	0,0437 \pm 0,0013	0
Tikus Sakit	0,0962 \pm 0,0078	54,61
Tikus Terapi	0,0649 \pm 0,0021	48,23

Induksi MLD-STZ dosis 20 mg/kg BB dapat meningkatkan aktivitas protease sebesar 54,61% pada tikus sakit dibandingkan dengan tikus sehat. Pemberian terapi herbal *spray* Spirulina mampu menurunkan aktivitas protease sebanyak 48,23%. Penurunan aktivitas rata-rata protease hasil isolasi dari organ kulit luka tikus DM T1 yang diterapi dengan herbal *spray* Spirulina dikarenakan adanya senyawa antioksidan yang terkandung dalam ekstrak Spirulina yang mampu menurunkan banyaknya protease serin yang dihasilkan oleh sel neutrofil sehingga kinerja neutrofil dan enzim protease kembali normal dalam fagositosis bakteri, memperbaiki, mencegah dan menjaga kondisi sel sehingga kerusakan pada organ kulit luka tikus DM T1 tidak terjadi terus menerus. Organ kulit pada keadaan normal terlindungi dari aktivitas protease, namun pada kondisi DM memicu banyaknya jumlah protease pada jaringan luka yang mengalami inflamasi sehingga dapat menyebabkan aktivitas tak terkontrol dari protease yang pada akhirnya menyebabkan kerusakan jaringan.

Pengaruh Herbal *Spray* Spirulina terhadap Ekspresi iNOS pada Sel β -Pankreas

Ekspresi iNOS menunjukkan banyaknya sel yang mengalami inflamasi. Pada preparat yang positif akan mengekspresikan iNOS apabila terdapat warna coklat pada preparat.



Gambar 2. Ekspresi iNOS pada pulau langerhans pankreas. Perbesaran 400x

Keterangan :

- A. Tikus Sehat
- B. Tikus Sakit
- C. Tikus Terapi

O = sel β pankreas yang mengekspresikan iNOS

Gambar 2. menunjukkan bahwa pada pulau Langerhans pankreas tikus sehat (A), terdapat ekspresi iNOS ditunjukkan dengan warna coklat namun dalam jumlah yang sedikit sel yang mengalami inflamasi memiliki persen area sebesar 0,287%. Pada tikus sakit (B) sebesar 1,952%. Sedangkan pada tikus terapi (C) sebesar 0,497%. Pemberian terapi herbal *spray* Spirulina pada tikus DM T1 menyebabkan ekspresi iNOS berkurang. Ekstrak Spirulina mampu menghambat iNOS untuk membentuk radikal bebas NO endogen. Dikarenakan adanya kandungan senyawa-senyawa metabolit sekunder antara lain terpenoid, alkaloid dan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan penangkap radikal bebas. Penangkapan radikal bebas misalnya radikal NO* oleh senyawa yang terkandung pada *Spirulina* menyebabkan kerusakan sel beta berkurang, sehingga kemungkinan infiltrasi sel mononuklear ke dalam jaringan pankreas untuk proses fagositosis sel beta yang rusak juga berkurang.

KESIMPULAN

Pemberian terapi herbal *spray* berbasis bioaktif *Spirulina* mampu mengurangi panjang luka sayatan pada tikus DM T1 dari 4,28 cm menjadi 0,5 cm, menurunkan ekspresi iNOS pada sel β -pankreas tikus DM T1 dengan persen area sebesar 1,952% menjadi 0,497% pada tikus terapi, serta menurunkan aktivitas protease sebesar 48,23% pasca pemberian terapi herbal *spray*.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO Departement of Noncommunicable Disease Surveillance Geneva Definition, 1999, *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications*, Report of a WHO Consultation Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.
2. Bobadilla Norma A, and G. Gamba., 2007, *New Insights into the Pathophysiology of Cyclosporine Nephrotoxicity A Role of Aldosterone*. *Molecular Physiology Unit, Instituto de Investigaciones Biome'dicas*, Universal Nacional Auto nomade and Instituto Nacional de Ciencias Me'dicas y Nutricio'n, Salvador, Mexico.
3. Qiu, Z., A.H. Kwon, Y. Kamiyama, 2007, Effects Of Plasma Fibronectin On The Healing Of Full- Thickness Skin Wounds In Streptozotocin-Induced Diabetic Rat, 138 (1): 64-70, *J. Surg Res*.
4. Santosa, A., 2010, *Produksi Spirulina sp. yang Dikultur dengan Perlakuan Manipulasi Fotoperiod*, Skripsi, Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
5. Aulanni'am, 2005, *Protein dan Analisisnya*, Citra Mentari Group Malang.