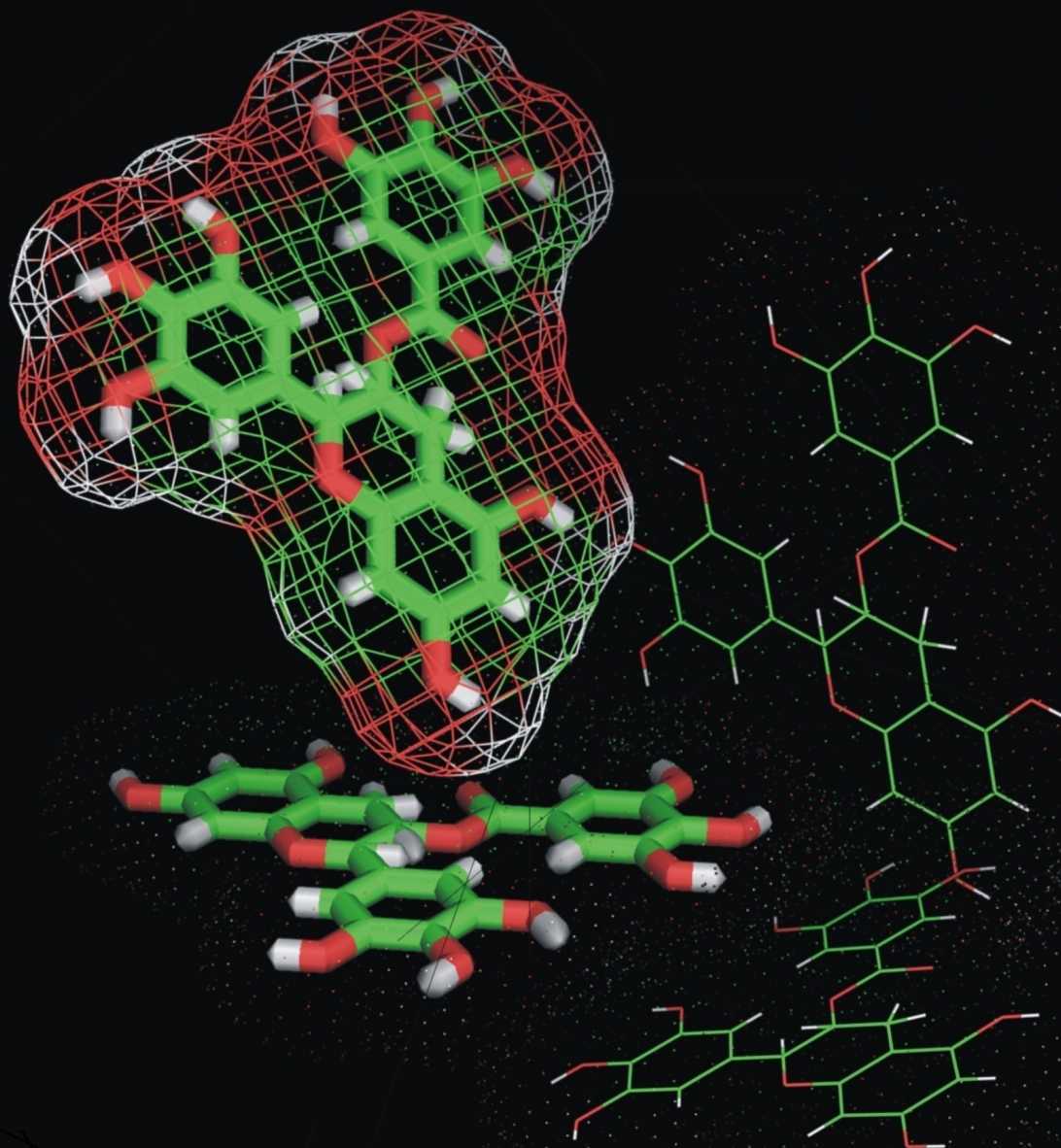


ISSN 2087-2852

The Journal of Experimental

Life Science

Discovering Living System Concept through Nano, Molecular and Cellular Biology



J. Exp. Life. Sci.

Vol. 2

No. 2

pages. 56-102

December 2012

Published by

Graduate Program, University of Brawijaya
in Cooperation With
Masyarakat Nano Indonesia (MNI)

The Journal of **Experimental** Life Science

Discovering Living System Concept through Nano, Molecular and Cellular Biology

Editorial Board

Chief Editor

Dr. Ir. M. Sasmito Djati, MS.

Editorial Team

Aida Sartimbul, M.Sc. Ph.D - UB
Adi Santoso, M.Sc. Ph.D - LIPI
Nurul Taufiq, M.Sc. Ph.D - BPPT
Arifin Nur Sugiharto, M.Sc. Ph.D -UB

Sukoso, Prof. MSc. Ph.D-UB
Etik Mardiyati, Dr. - BPPT
Soemarno, Ir., MS., Dr., Prof. - UB
Dr. Bagyo Yanuwadi

Reviewer

Ahmad Faried, MD. Ph.D – UNPAD
Trinil Susilawati, Ir., MS., Dr., Prof. - UB
Muhaimin Rifai, Ph.D - UB
Rer.nat. Ronny Martien, Dr. – UGM
Moch. Ali, Dr. - UNRAM
Widodo, S.Si., M.Si., Ph.D MED Sc - UB
Irwandi Jaswir, Prof. – UII Malaysia
Sarjono, Dr. - ITB
Muhammad Askari, Dr. – UTM Malaysia
Sutiman Bambang S., Dr., Prof. - UB
Moh. Aris Widodo, Sp.FK., Ph.D., Prof. - UB
Yanti, Dr. – UNIKA ATMAJAYA

Brian Yulianto, Dr. - ITB
Bambang Prijambudi, Dr. - ITB
Arief Boediono, drh., PhD., Prof. - IPB
M. Yedi Sumaryadi, Ir., Dr., Prof. - UNSOED
Wasmen Manalu, Dr., Prof. - IPB
Moch. Syamsul Arifin Zein, Ir., M.Si. - LIPI
Gono Semiadi, Ir. MSc. PhD. - LIPI
Yaya Rukayadi, MS., Dr. – Yonsei University Seoul
Muhaimin Rifa'i, Ph.D - UB
Widjiati, drh.,MS.,Dr. – UNAIR
Amin Setyo Leksono, S.Si.,M.Si.,Ph.D - UB

Editor Pelaksana

Afidatul Muji Astuti, S.Si.

Illustrator

M. Qomaruddin, S.Si.

Address

The Journal of Experimental Life Science
Building E, 2nd Floor, Graduate Program, University of Brawijaya
Jl. Mayor Jenderal Haryono 169, Malang, 65145
Telp: (0341) 571260 ; Fax: (0341) 580801
Email: jels@ub.ac.id
Web: <http://www.jels.ub.ac.id>

Table of Content

Efek Proteksi Kombinasi Minyak Wijen (Sesame Oil) dengan α-Tocopherol terhadap Steatosis melalui Penghambatan Stres Oksidatif pada Tikus Hiperkolesterolemia (Nur Khoma Fatmawati, Mulyohadi Ali, Edi Widjajanto)	56-64
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2012.002.02.01	
Kajian Penggunaan Ciprofloxacin terhadap Hematologi Ikan Botia (<i>Botia macracanthus</i>, Bleeker) yang Diinfeksi Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> (Maftuch Maftuch, Happy Nursyam, Sukarni Sukarni)	65-69
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2012.002.02.02	
Pengaruh Terapi Suplementasi Fitosterol pada Profil Lemak Plasma, Kadar Apolipoprotein (Apo) B-48, dan Penghitungan Sel Busa Aorta Tikus Pascadiet Atherogenik (Rahma Triliana, Djoko W. Soeatmadji, Handono Kalim)	70-81
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2012.002.02.03	
Efek Konsentrasi Sublethal Fenol Terhadap Total Haemocyte Count (THC) dan Histologi Insang Kepiting Bakau (<i>Scylla serata</i>) (Alfi Hermawati Waskita Sari, Yenny Risjani, Agung Pramana Warih Mahendra)	82-88
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2012.002.02.04	
Pengaruh Sari Seduh Teh Hitam (<i>Camellia sinensis</i>) terhadap Ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPARγ pada Jalur MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) Jaringan Lemak Viseral Tikus Wistar dengan Diet Tinggi Lemak (Hendra Susanto, M. Rasjad Indra, Setyawati Karyono)	89-97
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2012.002.02.05	
Analisis Sekuensing Nucleotida pada Mutasi Gen MTHFR C677T pada Kondisi Premature Cardio Infarction (Muizzuddin Muizzuddin, Tinny Endang H., I Ketut Muliarta, Liliek Sulistyowati, Djanggan Sargowo)	98-102
DOI: http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2012.002.02.06	

Efek Proteksi Kombinasi Minyak Wijen (*Sesame Oil*) dengan α -Tocopherol terhadap Steatosis melalui Penghambatan Stres Oksidatif pada Tikus Hiperkolesterolemia

Nur Khoma Fatmawati ^{1*}, Mulyohadi Ali ², Edi Widjajanto ²

¹Program Studi Pascasarjana S2 Biomedik, Universitas Brawijaya, Malang

²Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Minyak wijen (MW) yang banyak mengandung *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) berfungsi menurunkan kadar lipid serum melalui induksi β oksidasi di mitokondria. Proses ini menghasilkan produk sampingan berupa radikal bebas. Vitamin E (α -tocopherol) diketahui menghambat aktifitas radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek sinergisme MW dan α -tocopherol dalam menghambat steatosis yang diakibatkan keadaan hiperkolesterol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa diperoleh perbedaan bermakna ($p < 0,05$) terutama dosis MW 1,2 ml pada semua parameter antara kelompok hiperkolesterol, MW dan MW+ α -tocopherol. Kadar kolesterol kelompok hiperkolesterol ($140,925 \pm 10,5$) mg/dl; kelompok MW ($93,845 \pm 4,37$) mg/dl dan kelompok MW+ α -tocopherol ($92,90 \pm 8,5$) mg/dl. Kadar trigliserida kelompok hiperkolesterol ($154,78 \pm 11,09$) mg/dl; kelompok MW ($184,64 \pm 3,87$) mg/dl dan kelompok MW+ α -tocopherol ($66,89 \pm 6,03$) mg/dl. Pada kelompok MW kadar MDA ($0,257 \pm 0,013$) nmol/mg protein, kelompok hiperkolesterol ($0,847 \pm 0,036$) nmol/mg protein dan kelompok kombinasi MW dengan α -tocopherol ($0,092 \pm 0,006$) nmol/mg protein. Kadar SOD pada kelompok kombinasi MW dengan α -tocopherol ($253,82 \pm 16,63$) U/mg protein, kelompok MW ($208,7 \pm 11,27$) U/mg protein, kelompok hiperkolesterol ($139,7 \pm 2,82$) U/mg protein. Dari gambaran histologis steatosis lebih banyak didapatkan pada kelompok hiperkolesterol yang disertai dengan peradangan, sedangkan pada kelompok kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol memiliki gambaran histologis terendah mengalami steatosis.

Kata kunci: hiperkolesterol, minyak wijen, steatosis

Abstract

Sesame oil (MW) contains great numbers of *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) that functioned to decrease the level of serum lipid by induction of β oxidize in mitochondria. This process produce secondary product, i.e. free radical. Vitamin E (α -tocopherol) was known as the inhibitor of free radical activity. This study was aimed to verify the synergism effect of sesame oil and α -tocopherol in inhibiting steatosis which caused by hypercholesterol condition. The results showed that there is significant difference ($p < 0,05$) especially for MW doses of 1,2 ml on all parameters among hypercholesterol groups, MW and MW+ α -tocopherol. Cholesterol level of hypercholesterol group is 140.925 ± 10.5 mg/dl, while MW group is 93.845 ± 4.37 mg/dl and MW+ α -tocopherol group for 92.90 ± 8.5 mg/dl. Triglyceride level of hypercholesterol groups is 154.78 ± 11.09 mg/dl, MW group for 184.64 ± 3.87 mg/dl, and MW+ α -tocopherol group for 66.89 ± 6.03 mg/dl. Level of MDA in MW groups is 0.257 ± 0.013 nmol/mg protein, hypercholesterol group for 0.847 ± 0.036 nmol/mg protein and MW+ α -tocopherol group combination is 0.092 ± 0.006 nmol/mg protein. Level of SOD on MW+ α -tocopherol treatment was 253.82 ± 16.63 U/mg protein, MW treatment of 208.7 ± 11.27 U/mg protein, and hypercholesterol treatment for 139.7 ± 2.82 U/mg protein. Histology of steatosis was found more in hypercholesterol group along with inflammation, while on combination group of MW+ α -tocopherol showed the lowest steatosis in the histology.

Keywords: hypercholesterol, sesame oil, steatosis

PENDAHULUAN

Pola diet tinggi karbohidrat dan lemak dapat menyebabkan keadaan hiperlipidemia, yang salah satu tandanya adalah peningkatan kadar kolesterol (hiperkolesterol) [1]. Hasil penelitian [2], yang dilakukan mulai tahun 1994 sampai 1997 pada 11.489 orang Indonesia yang berumur 20-70 tahun 32,4% dengan kadar kolesterol <200 mg/dl, 32,8% mempunyai kadar kolesterol 200-240 mg/dl dan 34,8% mempunyai kadar kolesterol >240 mg/dl.

Salah satu akibat hiperkolesterol adalah terjadinya *steatosis*. *Steatosis* merupakan suatu keadaan di mana lebih dari 5% hepatosit yang mengalami akumulasi lemak [3]. Faktor utama yang mempengaruhi *steatosis* adalah intake alkohol berlebih, diabetes, hiperlipidemia dan malnutrisi [4]. Pada penderita hiperlipidemia ditemukan 86% mengalami *steatosis*, 74% mengalami fibrosis, dan 24% mengalami *steatohepatitis* [5]. Pada keadaan lanjut *steatosis* ini dapat mengalami fibrosis, nekrosis, infiltrasi sel-sel radang dan pada tahap akhir dapat terjadi sirosis [6], bahkan sampai terjadi *hepato cellular carcinoma* (HCC) [7]. Usaha preventif akan lebih efektif untuk mencegah terjadinya sirosis. Beberapa teori mengemukakan bahwa *steatosis* terjadi akibat ketidakseimbangan antara sintesis dan sekresi trigliserida yang dapat diakibatkan peningkatan intake asam lemak dari diet, peningkatan mobilisasi asam lemak dari jaringan adiposa, peningkatan sintesis asam lemak atau bisa akibat penurunan oksidasi asam lemak di mitokondria [3]. Selain itu [8], juga berpendapat bahwa *steatosis merupakan keadaan* dimana terjadi kelainan metabolisme lemak termasuk di dalamnya adalah kelainan *up-take*, sintesa, degradasi atau sekresi lemak. Pada keadaan normal asam lemak yang di *up-take* hepar sebagian besar akan disintesis menjadi trigliserida dan dioksidasi di mitokondria [9]. Trigliserida yang terbentuk ini akan disekresi ke sirkulasi dalam bentuk *very low density lipoprotein* (VLDL). Yang sebelumnya trigliserida harus berikatan dengan protein apoB-100, disamping itu juga melibatkan protein-protein lain seperti *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP) yang berfungsi sebagai pengatur utama dalam pembentukan VLDL. *Microsomal*

triglyceride transfer protein menstabilkan apoB sehingga dapat berfusi dengan trigliserida dan memungkinkan terbentuknya VLDL [10].

Patogenesis *steatosis* diketahui juga berhubungan dengan meningkatnya aktivitas stres oksidatif [8]. Stres oksidatif merupakan suatu keadaan dimana terjadi ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan [11]. Radikal bebas ini bersifat magnetik dan sangat reaktif [12]. Oksigen merupakan komponen utama dalam proses respirasi aerobik oleh sistem enzim dalam tubuh dapat diubah menjadi radikal bebas, diantaranya, radikal superoksid, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil [11]. Peningkatan kadar asam lemak intra hepatik dapat menjadi sumber stres oksidatif. Hal ini disebabkan asam lemak merupakan asam lemah dan berada dalam keseimbangan antara bentuk ionisasi (RCOO⁻) dan bentuk tidak bermuatan (R-COOH). Mitokondria merupakan sumber dari ROS seluler yang dapat mencetuskan terjadinya *steatosis* [8]. Pada keadaan fisiologis normal, konsentrasi ROS dalam mitokondria sebesar 8×10^{-12} M [11]. Nicholls and Budd [13] melaporkan bahwa ROS yang terbentuk pada proses oksidasi fosforilasi terjadi pada saat molekul oksigen direduksi menjadi H₂O pada kompleks IV dan juga pada saat reduksi molekul oksigen dengan penambahan elektron pada kompleks I dan II. Proses oksidasi fosforilasi di mitokondria melibatkan 5 kompleks protein yang sangat spesifik yang ada di dalam membran mitokondria bagian dalam. Selama proses transfer elektron memungkinkan elektron bereaksi dengan oksigen yang ada sehingga timbullah radikal bebas [14]. Radikal bebas dapat menghasilkan peroksida lipid yang akhirnya dapat menyebabkan kematian sel dan pelepasan MDA serta HNE [8].

Radikal bebas juga menginduksi pembentukan sitokin *tumor necrosis factor α* (TNF- α), *transforming growth factor β* (TGF- β) dan interleukin-8. Sitokin ini menyebabkan aktivasi kaspase dan kematian sel hepatosit. *Transforming growth factor β* mengaktifkan sintesis kolagen oleh sel *stellate* dan mengaktifkan transglutaminase jaringan dan *cross-link* protein sitoskeleton kemudian mempromosikan pembentukan *Mallory's hyaline* [8]. Berbagai sitokin tersebut ber peran dalam patogenesis terjadinya inflamasi pada *steatosis* terutama disebabkan oleh sel kupfer yang berinteraksi dengan radikal bebas. Sel kupfer fungsi khusus antara lain untuk fagositosis, presentasi antigen, menghasilkan beberapa produk sitokin, *prostanoid*, dan *nitric oxide* [15].

* Alamat korespondensi:

Nur Khoma Fatmawati

Email : Fatmawati@ub.ac.id

Alamat : Program Studi Pascasarjana S2 Biomedik
Universitas Brawijaya

Aktivasi sel kupfer tersebut akan mengakibatkan sekresi prostaglandin E_2 (PGE_2) melalui jalur *Cyclooxygenase-2* (COX-2) dengan berinteraksi dengan reseptor spesifik, sehingga dapat meningkatkan akumulasi trigliserida di hepatosit melalui mekanisme peningkatan *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) [16].

Sebagai upaya preventif masyarakat biasanya menggunakan bahan makanan yang sudah dikenal dapat menurunkan kadar kolesterol plasma, yakni minyak wijen. Hampir 85% asam lemak minyak wijen berupa asam lemak tak jenuh yang berupa linoleat [17]. Nakai [18] dan Winarno [19] mengemukakan bahwa minyak wijen memiliki beberapa kelebihan yakni bersifat stabil dan terdapat beberapa antioksidan alami yang berupa *sesamin*, *episesamin* dan lignan lainnya. Akan tetapi minyak wijen dalam bentuk *roasted* lebih bersifat stabil dibandingkan bentuk lainnya. Hal ini disebabkan adanya proses *roasting sesamol* dirubah menjadi *sesamol*, sehingga memiliki kandungan lignan yang lebih banyak [20]. Oleh karena linoleat mengandung ikatan rangkap sehingga akan mudah mengalami oksidasi yang dapat mengakibatkan terjadinya stres oksidatif [21]. *Alfa-tocopherol* diketahui sebagai antioksidan yang dapat mencegah terjadinya propagasi reaksi radikal bebas. Sampai saat ini belum diketahui bagaimana efek kombinasi α -tocopherol dan minyak wijen dalam tubuh, terutama efeknya pada pencegahan *steatosis* melalui mekanisme stres oksidatif. Sehingga diperlukan suatu penelitian mengenai pengaruh kombinasi minyak wijen dan α -tocopherol dibandingkan minyak wijen sendiri dalam menghambat *steatosis* pada tikus hiperkolesterolemia.

METODOLOGI

Pembuatan Tikus Hiperlipidemia

Komposisi pakan untuk mendapatkan kondisi tikus menjadi hiperlipidemia yaitu menggunakan diet normal yang terdiri dari confeed PAR-S dan tepung terigu dengan perbandingan 2:1, ditambah kolesterol 2%, asam kolat 0,2% dan minyak babi 10% [22].

Pengambilan Sampel Darah dan Jaringan

Hewan coba (*Rattus norvegicus* strain wistar) dianastesi dengan menggunakan eter. Rongga dada dibuka melebar hingga tampak organ jantung, dan dengan menggunakan spuit 5 mL ditusukkan menembus ventrikel jantung. Darah diaspirasi hingga 5 mL dan ditampung dalam tabung *ependorf*. Kemudian rongga perut

dibuka. Selanjutnya organ hepar dimasukkan disimpan dalam *cold storage* dengan suhu -70°C .

Pengukuran Kadar Kolesterol Serum

Pengukuran kadar kolesterol dilakukan dengan menggunakan metode CHO-PAP, enzimatik photometrik test dengan menggunakan sampel serum yang dilakukan pada pada akhir minggu ke-10. Inkubasi selama 20 menit pada suhu $20-25^{\circ}\text{C}$ atau 10 menit pada suhu 37°C . Ukur absorban (A std) dan sampel (A spl) terhadap blangko reagen (RB) dalam waktu 60 menit. Reagen yang digunakan adalah "*Dia Sys Cholesterol FS*" yang dibaca dengan menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 500 dL. Penentuan kadar menggunakan rumus:

$$\text{Kolesterol (mg/dl)} = \frac{\text{Abs.sampel}}{\text{Abs.standar}} \times \text{konsentrasi standar}$$

Pengukuran Trigliserida

Pengukuran trigliserida dilakukan dengan menggunakan metode GPO-PAP, enzimatik kolorimetrik test. Inkubasi selama 10 menit pada suhu $20-25^{\circ}\text{C}$ atau 10 menit pada suhu 37°C . ukur absorban (A std) dan sampel (A spl) terhadap blangko reagen (RB) dalam waktu 60 menit. Penentuan kadar menggunakan rumus:

$$\text{Trigliserida (mg/dl)} = \frac{\text{Abs.sampel}}{\text{Abs.standar}} \times \text{konsentrasi standar}$$

Isolasi Mitokondria Hepar

Sebanyak 100 mg hepar segar yang sudah diperfusi dengan PBS digerus menggunakan pasir kuarsa. Kemudian dilakukan sentrifugasi dingin dan kecepatan tinggi secara bertingkat dengan menggunakan larutan TE dan sukrosa 15% [23].

Pemeriksaan Kadar Protein Mitokondria Hepar

Sampel mitokondria yang didapat kemudian ditambahkan larutan NaCl 0,9% sampai 1 cc, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil ditambahkan *dye* dan dibaca menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm (Biomedik UB).

Pemeriksaan SOD Mitokondria Hepar

Sampel mitokondria direaksikan dengan *xantin* dan *xantin oxidase* serta KCN 10mM. Kemudian ditambahkan NBT sebagai pewarna, dan dibaca menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm [24].

Pemeriksaan Kadar MDA Mitokondria Hepar

Pada pengujian kadar MDA mitokondria hepar digunakan dua sampel mitokondria untuk tes dan kontrol. Masing-masing diuji dengan menggunakan TCA dan HCl untuk menghentikan reaksi yang berlangsung kemudian diwarnai

menggunakan Na-THIO dan dispektrofotometer pada panjang gelombang 531 nm (Biomedik, UB).

Pembuatan Sediaan Histologi

Jaringan hepar difiksasi dengan formalin 10% selama 6 jam, kemudian secara bertingkat direndam dalam alkohol 80, 95 dan 100%. Setelah itu dilakukan *embedding paraffin* dan dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5-6 nm. Setelah terpotong dilakukan deparafinisasi dengan merendamnya dalam *xylol* dan alkohol [25].

Pemeriksaan Histologi Hepar

Pemeriksaan histologi hepar dilakukan dengan proses parafin blok serta menggunakan pewarnaan HE. Selain itu juga digunakan pengecatan *Oil-Red O* untuk konfirmasi adanya akumulasi lemak di sel hepar.

Prosedur Pewarnaan HE

Sediaan histologi di rendam dalam *Haris Haematoxylin*, selanjutnya secara bertahap direndam dalam larutan alkohol dan dilakukan *counter staining* menggunakan eosin [25].

Pewarnaan Oil-Red O

Sediaan histologi yang dipotong dengan menggunakan *cryo-staat* kemudian diinkubasi dengan menggunakan propilen glikol dan *oil-red O*. Setelah itu dilakukan *counter staining* dengan menggunakan cat *Mayer Haematoxylin* [25].

Analisis Statistika

Pengaruh kombinasi minyak wijen dengan α -*tocopherol*, pengukuran kadar kolesterol total, trigliserida, MDA, SOD dan jumlah sel yang mengalami *steatosis* dianalisa dengan MANOVA dan bila ada perbedaan bermakna ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan *Post Hoc Tukey HSD*. Sedangkan pengujian toksisitas dilakukan secara deskriptif dan dikuantifikasi.

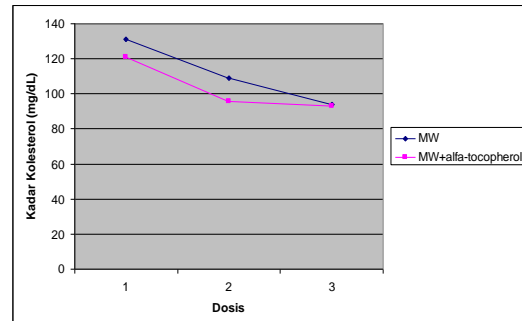
HASIL PENELITIAN

Pengaruh Kombinasi Minyak Wijen dengan α -Tocopherol Pada Kadar Kolesterol Serum

Hasil pengukuran efek kombinasi minyak wijen dengan α -*Tocopherol* pada kadar kolesterol serum dengan menggunakan metode CHO-PAP, enzimatik photometrik test diperoleh data pada Gambar 1.

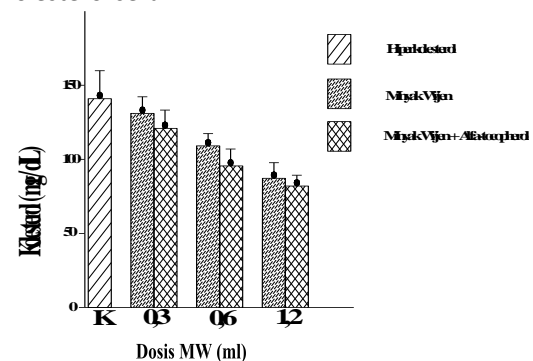
Hasil pengukuran kadar kolesterol serum pada Gambar 1 menunjukkan bahwa pemberian minyak wijen dengan α -*tocopherol* mampu menurunkan kadar kolesterol serum tikus hiperlipidemia secara signifikan ($p < 0,039$). Hal ini juga didukung dengan pengukuran kadar

kolesterol pada semua kelompok yang dibandingkan dengan kelompok hiperkolesterol yang menunjukkan bahwa kadar kolesterol serum pada kelompok hiperkolesterol.



Gambar 1. Efek sinergistik minyak wijen dengan α -*tocopherol* terhadap kadar kolesterol serum ($p < 0,05$).

Hasil analisis statistika menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara kelompok hiperkolesterol dengan kelompok minyak wijen. Kadar kolesterol pada kelompok kombinasi minyak wijen dengan α -*tocopherol* juga mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kelompok minyak wijen. Kondisi ini menunjukkan bahwa terapi dengan kombinasi antara minyak wijen dengan α -*tocopherol* terbukti memiliki efek sinergis yang berfungsi dalam menurunkan kadar kolesterol serum.

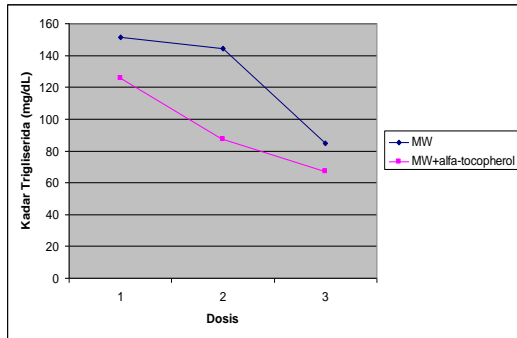


Gambar 2. Perubahan kadar kolesterol serum pada berbagai kelompok perlakuan.

Rata-rata pemberian berbagai dosis kombinasi minyak wijen dengan α -*tocopherol* pada kelompok perlakuan terbukti mampu menurunkan kadar kolesterol jika dibandingkan dengan pemberian minyak wijen pada dosis yang sama (Gambar 2). Penurunan absorpsi kolesterol diduga akibat penurunan solubilitas *micellar* kolesterol. Penurunan kolesterol juga diakibatkan penurunan aktifitas *HMG-CoA reductase* oleh *sesamin* [26].

Kombinasi Minyak Wijen dengan α Tocopherol pada Kadar Trigiserida Serum

Hasil pengukuran kadar trigliserida serum dari kelompok minyak wijen dan kelompok kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol GPO-PAP, enzimatik kolorimetrik test diperoleh data pada Gambar 3.



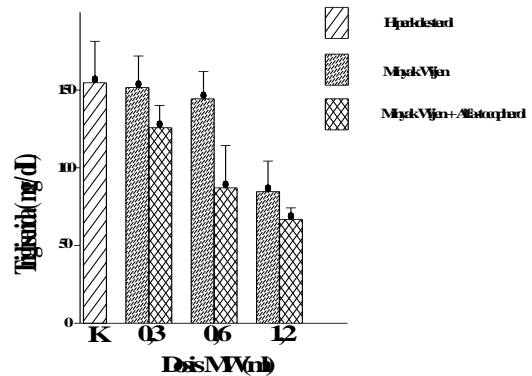
Gambar 3. Efek sinergistik minyak wijen dengan α -tocopherol terhadap kadar trigliserida serum. Tampak bahwa kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol dapat lebih menurunkan kadar trigliserida serum ($p < 0,05$).

Hasil pengukuran kadar trigliserida serum pada kelompok minyak wijen dan kelompok kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol Gambar 3 menunjukkan bahwa kadar trigliserida serum terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok minyak wijen (MW) dan kelompok kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol pada berbagai dosis. Rata-rata hasil pengukuran menunjukkan bahwa kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol dapat lebih menurunkan kadar trigliserida serum ($p < 0,05$).

Sedangkan pengukuran kadar trigliserida pada kelompok minyak wijen dan kombinasi minyak wijen dibandingkan dengan kelompok hiperkolesterol, diperoleh bahwa kadar trigliserida kelompok hiperkolesterol ($154,782 \pm 11,09$) mg/dl. Kadar kolesterol kelompok minyak wijen dosis 1,2 mL adalah ($84,648 \pm 3,87$) mg/dl sedang pada kelompok perlakuan kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol dosis 1,2 mL ($66,890 \pm 6,03$) mg/dl (Gambar 4). Penurunan trigliserida ini diduga disebabkan karena peningkatan fungsi mitokondria dalam proses β oksidasi. Peningkatan β oksidasi akan menyebabkan penurunan proses esterifikasi pembentukan trigliserida [8].

Berdasarkan analisis statistika diperoleh perbedaan secara signifikan ($p < 0,016$) kadar trigliserida antara kelompok hiperkolesterol dengan kelompok minyak wijen. Kadar trigliserida kelompok kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol terdapat penurunan tetapi

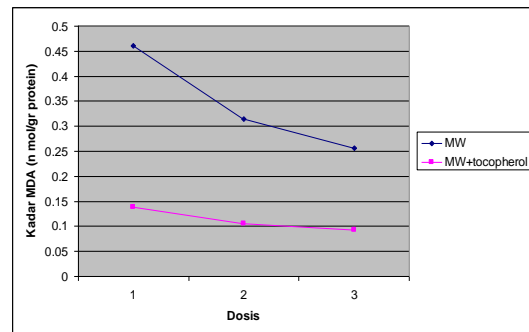
kurang bermakna apabila dibandingkan dengan kelompok minyak wijen. Hal ini menunjukkan bahwa minyak wijen dengan α -tocopherol mempunyai efek sinergistik dalam menurunkan kadar trigliserida serum.



Gambar 4. Perubahan kadar trigliserida serum pada berbagai kelompok.

Pengaruh Kombinasi Minyak Wijen dengan α -Tocopherol pada Kadar MDA

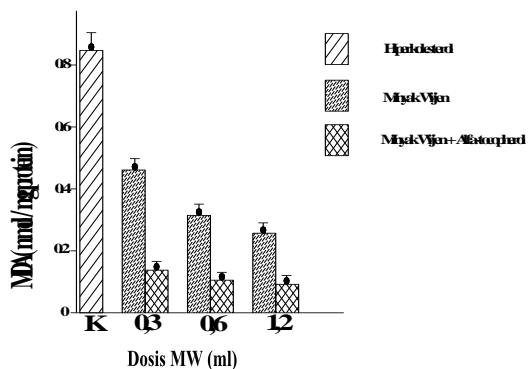
Pengukuran kadar MDA pada mitokondria hepar dengan menggunakan metode TBA (*Trichloro Barbiturate Acid*) diperoleh data pada Gambar 5.



Gambar 5. Efek sinergistik minyak wijen dengan α -tocopherol terhadap kadar MDA mitokondria.

Hasil pengukuran kadar MDA pada kelompok minyak wijen dan kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol pada Gambar 5 menunjukkan bahwa kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol dapat lebih menurunkan kadar MDA mitokondria hepar ($p < 0,05$).

Pada hasil pengukuran kadar MDA antara semua kelompok perlakuan dengan kelompok hiperkolesterol diperoleh data seperti pada Gambar 6. Hasil pengukuran kadar MDA pada kelompok perlakuan menunjukkan adanya penurunan kadar MDA mitokondria hepar dibandingkan dengan kelompok hiperkolesterol.



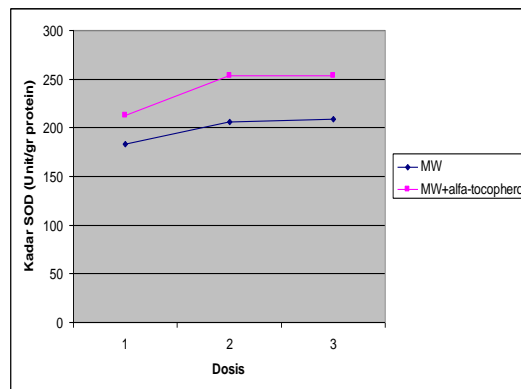
Gambar 6. Perubahan Kadar MDA Mitokondria Hepar Pada Berbagai Kelompok Perlakuan ($p < 0.00$).

Pada kelompok hiperkolesterol didapatkan kadar MDA ($0,847 \pm 0,036$) nmol/mg protein. Kadar MDA kombinasi minyak wijen α -tocopherol dosis 1,2 mL ($0,092 \pm 0,01$) nmol/mg protein sedang kelompok minyak wijen dosis 1,2 ml ($0,257 \pm 0,01$) nmol/mg protein (Gambar 5). Hasil analisis statistika diperoleh bahwa kadar MDA mitokondria hepar antara kelompok hiperkolesterol dengan kelompok minyak wijen terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0.00$). Hal ini juga terjadi antara kelompok kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol dengan kelompok minyak wijen yang menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan kadar MDA mitokondria hepar pada masing-masing kelompok tersebut. Myung-Hwa *et al.* [27] menyatakan bahwa minyak wijen berpotensi sebagai antioksidan.

Kombinasi Minyak Wijen dengan α -Tocopherol pada Kadar SOD

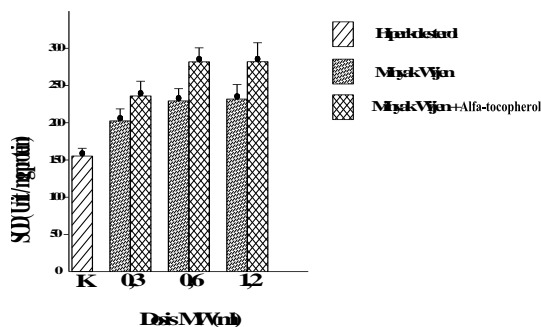
Pengukuran kadar SOD mitokondria hepar dengan menggunakan metode reaksi *xantin* dan *xantin oxidase* diperoleh seperti data pada Gambar 7.

Hasil pengukuran kadar SOD pada mitokondria hepar pada kelompok pemberian minyak wijen dan kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol menunjukkan bahwa pemberian kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol dapat lebih meningkatkan kadar SOD secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok pemberian minyak wijen. Sehingga untuk mengetahui apakah minyak wijen dan kombinasi minyak wijen mempunyai efek meningkatkan kadar SOD mitokondria hepar dibandingkan dengan kelompok hiperkolesterol, maka diukur kadar SOD pada semua kelompok dan didapatkan hasil seperti tampak pada Gambar 8.



Gambar 7. Efek sinergistik minyak wijen dengan α -tocopherol terhadap kadar SOD mitokondria ($P < 0.05$).

Hasil pengukuran kadar SOD mitokondria hepar diperoleh yakni, pada kelompok perlakuan kombinasi minyak wijen dan α -tocopherol dosis 1,2 mL diperoleh hasil kadar SOD mitokondria hepar sebanyak $253,825 \pm 16,64$ U/mg protein sedangkan pada kelompok minyak wijen dosis 1,2 ml kadar SOD mitokondria hepar sebanyak $208,700 \pm 11,27$ U/mg protein. Adapun kadar SOD kelompok hiperkolesterol sebanyak $139,7 \pm 2,82$ U/mg protein (Gambar 8).



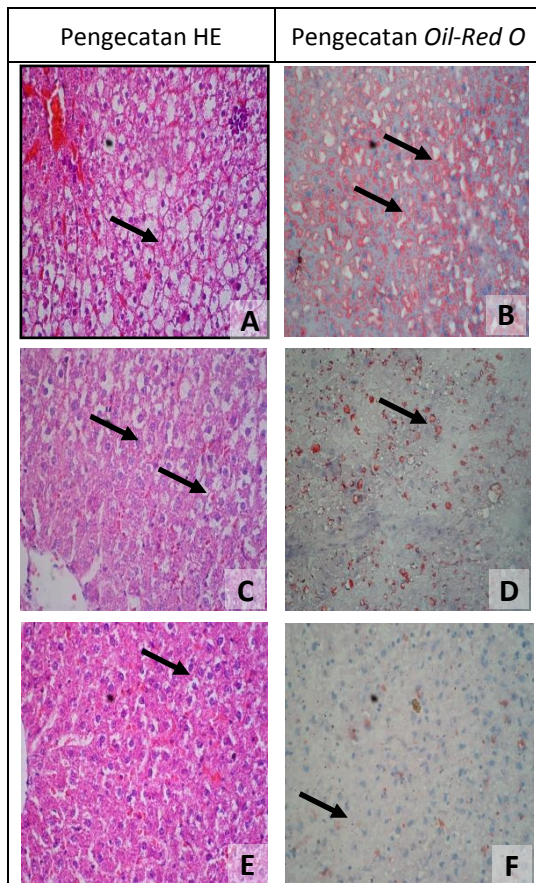
Gambar 8. Perubahan kadar SOD mitokondria hepar pada berbagai kelompok perlakuan ($p < 0,02$).

Hasil analisis statistikan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,02$) kadar SOD mitokondria hepar antara kelompok hiperkolesterol dengan kelompok dengan pemberian minyak wijen saja. Hal ini mengindikasikan bahwa minyak wijen dengan α -tocopherol mempunyai efek sinergistik dalam meningkatkan kadar SOD mitokondria hepar.

Perubahan Histopatologi Hepar setelah Pemberian Diet Aterogenik, Minyak Wijen dan Kombinasi Minyak Wijen dengan α -Tocopherol

Minyak wijen memiliki kandungan PUFA yang bersifat stabil disebabkan adanya kandungan senyawa antioksidan alami yang sangat tinggi yakni berupa *sesamin*, *sesamolin*, *sesaminol*, *episesamin* [19]. Pengujian efek

kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol dan minyak wijen pada tikus model dilakukan dengan menggunakan metode pewarnaan *Hematoxilin Eosin* (HE) terhadap kondisi *steatosis*. Sedangkan konfirmasi terhadap kondisi adanya lemak pada hepatosit digunakan metode pengecatan *Oil-Red O* diperoleh data pada Gambar 9.



Gambar 9. Perubahan histopatologi pada hepar setelah pemberian diet aterogenik (a,b), minyak wijen (c,d) dan kombinasi minyak wijen dengan α -Tocopherol (e,f). Perbesaran 400x. Tanda panah menunjukkan sel yang mengalami infiltrasi lemak.

Hasil pengecatan dengan metode HE maupun *oil-red O*, menunjukkan bahwa sel yang mengalami *steatosis* lebih banyak didapatkan pada kelompok hiperkolesterol dibandingkan dengan kelompok terapi. Struktur *stroma* pada kelompok hiperkolesterol (A dan B) lebih padat, yakni adanya penebalan jaringan ikat. Pada bagian sinusoid diperoleh gambaran yang lebih sempit. Hal ini diduga disebabkan adanya desakan oleh sel hepatosit yang membesar. Pada kelompok hiperkolesterol ditemukan adanya peradangan lokal yang ditandai adanya infiltrasi sel-sel inflamasi ke dalam parenkim hepar.

Pada Gambar 9c-d kondisi *steatosis* ditemukan lebih sedikit, susunan lebih radier dan tidak didapatkan peradangan. Sedangkan pada Gambar 9e-f, menunjukkan bentukan sitoplasma yang lebih lebih padat, sinusoid tampak jelas, susunan lebih radier, tidak didapatkan peradangan lokal. Kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol dapat mencegah terjadinya *steatosis*. Hal ini dibuktikan dengan menurunnya jumlah sel yang mengalami *steatosis* pada kelompok kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol, serta adanya perbaikan struktur hepar mulai dari menurunnya fibrosis, peradangan lokal, sinusoid yang tampak lebih jelas, susunan hepatosit yang radier, bentuk hepatosit kembali ke bentuk polihedral, dan inti berada di tengah. kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol. Perubahan gambaran histologis berkorelasi dengan perubahan kadar MDA. Semakin sedikit persentase *steatosis*, maka semakin sedikit juga kadar MDA.

Kondisi tersebut diatas mengindikasikan bahwa perbaikan gambaran histologis diakibatkan karena menurunnya aktifitas stres oksidatif di mitokondria. Hal ini dapat diterangkan dengan pemberian α -tocopherol dapat menurunkan aktifitas stres oksidatif yang ditandai dengan menurunnya kadar MDA miokondria dan peningkatan SOD mitokondria. Oleh karena aktifitas stres oksidatif dihambat oleh α -tocopherol maka kerusakan sel dan organela sel terutama mitokondria dapat dicegah, sehingga tidak terjadi akumulasi lipid di hepatosit [8].

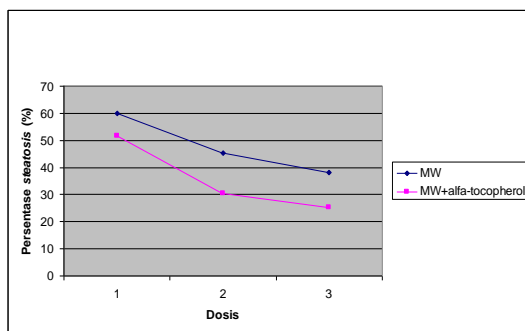
Kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol Perubahan gambaran histologis berkorelasi dengan perubahan kadar MDA. Semakin sedikit persentase *steatosis*, maka semakin sedikit juga kadar MDA. Hal ini dapat disimpulkan bahwa perbaikan gambaran histologis diakibatkan karena menurunnya aktifitas stres oksidatif di mitokondria. Adanya ketidakseimbangan antara MDA dan SOD ini menimbulkan terjadinya stres oksidatif [9]. SOD merupakan antioksidan enzimatik yang pertama kali bekerja ketika ROS dihasilkan. SOD bekerja dengan cara merubah radikal superoksid menjadi radikal H_2O_2 , yang selanjutnya oleh GSH akan dirubah menjadi H_2O [12].

Efek Kombinasi Minyak Wijen (MW) dengan α -Tocopherol pada Presentase Steatosis

Presentase *steatosis* hasil pengamatan dengan menggunakan metode HE dan *oil-Red O*,

secara nyata menunjukkan adanya lubang-lubang putih (akumulasi lemak).

Pada perhitungan persentase terjadinya steatosis diperoleh data yakni sebanyak $68 \pm 1,32\%$ pada kelompok hiperkolesterol. Sedangkan pada kelompok kombinasi minyak wijen dan α -tocopherol dosis 1,2 ml kondisi steatosis sebanyak $38 \pm 0,53\%$. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan presentase steatosis pada kelompok hiperkolesterol dengan kelompok minyak wijen. selain itu perbedaan secara signifikan ($p < 0,05$) presentase steatosis juga terjadi pada kelompok kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol dengan kelompok minyak wijen.



Gambar 10. Efek sinergistik kombinasi minyak wijen dengan α -tocopherol dapat lebih menurunkan persentase steatosis ($p < 0,05$).

Pada perhitungan ini juga diperoleh tingkat *grading* yang paling rendah didapatkan pada kelompok kombinasi minyak wijen dan α -tocopherol pada dosis 0,6 ml dan 1,2 ml. Hal ini mengindikasikan bahwa gambaran perubahan histologi berkaitan dengan perubahan pada kadar MDA. Semakin rendah presentase steatosis maka semakin sedikit jumlah kadar MDA.

KESIMPULAN

Minyak wijen dan α -tocopherol mempunyai efek sinergistik terhadap penghambatan steatosis melalui mekanisme penghambatan aktifitas stres oksidatif di mitokondria hepar. Selain itu juga menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida serum. Minyak wijen dan α -tocopherol memiliki efek sinergis menghambat stres oksidatif pada mitokondria hepar.

DAFTAR PUSTAKA

[1] Glew R.H. 1997. Lipid metabolism II: pathways of metabolism of special lipids. In Devlin T.M. (Ed). Textbook of biochemistry with clinical correlations. Wiley-Liss, Inc. New York.

[2] Wijaya A. 1997. Parameter biokimia untuk sindrom koroner akut. Forum Diagnostikum. 1.

[3] Alpers D.H., Sabesin S.M., and White H.M. 1993. Fatty liver: biochemical and clinical aspects. In: Schiff L. and Schiff E.R. (Eds). Diseases of the liver. JB Lippincort Company. Philadelphia. 825-840.

[4] Rehnmark S., Giometti C.S., Slavin B.G., Doolittle M.H., and Reue K. 1998. The fatty liver dystrophy mutant mouse: microvesicular steatosis associated with altered expression levels of peroxisome Proliferator-Regulated Proteins. *The Journal of Lipid Research*. 39 (11): 2209-2217.

[5] Marceau P., Biron S., Hould F.S., Marceau S., Simard S., Thung S.N., and Kral J.G. 1999. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 84 (5): 1513-1517.

[6] Pessayre D., Mansouri A., and Fromenty B. 2002. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 282: G193-G199.

[7] Yang S., Lin H.Z., Hwang J., Chacko V.P., and Diehl A.M. 2001. Hepatic hyperplasia in noncirrhotic fatty livers: Is obesity-related hepatic steatosis or premalignant condition? *Cancer Research*. 61 (13): 5016-5023.

[8] Angulo P. and Lindor K.D. 2002. Nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 17: 186-190.

[9] Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L., and Saunders W.B. 1994. Pathologic basis of disease. John Wiley and Sons, Ltd. New York.

[10] Perlemuter G., Sabile A., Letteron P., Vona G., Topilco A., Chretien Y., Koike K., Pessayre D., Chapman J., Barba G., and Brechot C. 2002. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 16: 185-194.

[11] Gutteridge J.M.C. and Halliwell B. 1995. Antioxidants in nutrition, health, and disease. Oxford University Press Inc. New York. 246-249.

[12] Tjokrowiro A. 1993. Radikal bebas, aspek klinik dan kemungkinan aplikasi terapi. Simposium Persatuan Ahli Penyakit DALAM Cabang Surabaya. Oksidan dan Antioksidan: Peranan-nya Dalam Mencegah

- Progresifitas Kelainan Pembuluh Darah. Surabaya. 11-36.
- [13] Nicholls D.G. and Budd S.L. 2000. Mitochondria and neural survival. *Physiol. Rev.* 80: 315-360.
- [14] Widodo M.A. 2003. Calcium dan generasi spesies oksigen reaktif pada fungsi mitokondria. *Basic Molecular Biology comes on mitochondrial medicine.* 1-2: 15-31.
- [15] Diehl A.M. 2002. IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology.* 282: G15.
- [16] Enomoto N., Ikejima K., Yamashina S., Enomoto A., Nishiura T., Nishimura T., Brenner D.A., Schemmer P., Bradford B.U., Rivera C.A., Zhong Z., and Thurman R.G. 2000. Kupffer cell-derived prostaglandin E₂ is involved in alcohol-induced fat accumulation in rat liver. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology.* 279: G100-G106.
- [17] Handajani S., Astuti I., Kusnandar, and Chamdi A.N. 2002. The potency of products based on sesame on agriculture sustainability system in Sukoharjo District, Central Java Province. Proceeding International Conference on Redesigning Sustainable Development on Food and Agriculture System for Developing Countries. Gadjah Mada University. Yogyakarta.
- [18] Nakai M., Harada M., Nakahara K. 2003. Novel antioxidative metabolites in rat liver with ingested sesamin. *J. Agric. Food. Chem.* 51(6): 1666-1670
- [19] Winarno F.G. 1999. Minyak goreng dalam menu masyarakat. Balai Pustaka. Jakarta.
- [20] Mohamed H.M.A. and Awatif I.I. 1998. The use of sesame oil unsaponifiable matter as a natural antioxidant. *Food Chemistry.* 62 (3): 269-276.
- [21] Mayumi T., Tsuboyama-Kasaoka N., Nakatani T., Ishi M., Tsutsumi S., Aburatani H., and Ezaki O. 2002. Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPAR α activation and ROS production. *American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology.* 282: G338-G348.
- [22] Ali M. 2002. Vaksinasi LDL-yang dioksidasi pada aterosklerosis fase awal: studi penelitian eksperimental laboratorium pada tikus. Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Malang.
- [23] Rabyt J.F. and White B.J. 1987. Biochemical techniques: theory and practice. Brooks/cole Publishing Company. California.
- [24] Hoshida S., Kuzuya T., Fuji H., Yamashita N., Oe H., Hori M., Suzuki K., Taniguchi N., and Tada M. 1993. Sublethal ischemia alters myocardial antioxidant activity in canine heart. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology.* 264: H33-H39.
- [25] Luna L.G. 1968. Manual of histologic staining of the armed forces institute of pathology. Third Edition. Mc Graw Hill Book Company. New York.
- [26] Hirose N., Inoue T., Nishihara K., Sugano M., Akimoto K., Shimizu S., and Yamada H. 1991. Inhibition of cholesterol absorption and synthesis in rats by sesamin. *J. Lipid Res.* 32: 629-638.
- [27] Myung – Hwa K., Yoshichika K., Michitaka N., and Toshihiko O. 1999. Dietary defatted sesame flour decreases susceptibility to oxidative stress in hypercholesterolemic rabbits. *Journal of Nutrition.* 129: 1885-1890.

Kajian Penggunaan Ciprofloxacin terhadap Hematologi Ikan Botia (*Botia macracanthus*, Bleeker) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Maftuch¹, Happy Nursyam^{1*}, Sukarni²

¹Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya

¹Stasiun Karantina Ikan Sulthan Thaha Jambi

Abstrak

Uji hematologi sangat bermanfaat sebagai alat diagnostik didalam menetapkan status kesehatan ikan. Salah satu aspek dari infeksi adalah terjadinya perubahan gambaran darah. Pemeriksaan darah dapat digunakan sebagai indikator keparahan suatu penyakit tertentu. Beberapa parameter yang dapat memperlihatkan perubahan patologi pada darah meliputi jumlah leukosit, deferensial leukosit, eritrosit. Dari hasil penelitian diketahui jumlah rata-rata sel darah merah dalam darah ikan botia sehat pada masing-masing perlakuan K-, K+, A, B, C, D berturut-turut adalah 2.470.000, 2.500.000, 2.560.000, 2.350.000, 2.440.000, dan 2.430.000. Sementara itu pada ikan botia yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* diketahui jumlah rata-rata eritrosit pada masing-masing perlakuan K-, K+, A, B, C, dan D berturut-turut adalah 2.420.0000, 1.770.000, 1.780.000, 1.890.000, 1.780.000, dan 1.870.000. jumlah rata-rata eritrosit ikan botia yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*, dan kemudian diobati dengan ciprofloxacin pada masing-masing perlakuan K-, K+, A, B, C, dan D berturut-turut adalah 2.420.000, 1.630.000, 2.090.000, 2.280.000, 2.500.000, dan 2.540.000. Sementara jumlah rata-rata sel darah putih dalam darah ikan botia yang sehat pada masing-masing perlakuan K-, K+, A, B, C, D berturut-turut adalah 97.000, 90.000, 88.000, 87.000, 93.000 dan 88.000. Sementara itu jumlah rata-rata sel darah putih pada ikan botia yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*, pada masing-masing perlakuan K-, K+, A, B, C, D berturut-turut adalah 97.000, 174.000, 174.000, 179.000, 185.000 dan 185.000. Sedangkan dari hasil penelitian terhadap ikan botia yang terinfeksi *A. hydrophila* dan kemudian diobati dengan ciprofloxacin diperoleh hasil perhitungan rata-rata leukosit pada masing-masing perlakuan berturut-turut adalah sebagai berikut 980.000, 189.000, 125.000, 137.000, 133.000, dan 136.000.

Kata Kunci : *Aeromonas hydrophila*, eritrosit, hemotologi, ikan botia, leukosit

Abstract

Hematology test is very useful as a diagnostic tool in determining the fish health status. An aspect of the infection is the change in blood figure. Blood tests can be used as an indicator of severity on a particular disease. Some parameters that show pathological changes in the blood include the number of leukocytes, deferential of leukocytes, and erythrocytes. The results showed the average number of red blood cells in the blood of healthy Botia fish in each treatment of K-, K+, A, B, C, D are 2.470.000, 2.500.000, 2.560.000, 2.350.000, 2.440.000, and 2.430.000, respectively. Otherwise, in the *A. Hydrophila*-infected botia has the average number of erythrocytes in each treatment of K-, K+, A, B, C, and D are 2.420.0000, 1.770.000, 1.780.000, 1.890.000, 1.780.000, and 1.870.000, respectively. The average number of erythrocytes in *A. Hydrophila*-infected botia which treated by ciprofloxacin in each treatment of K-, K+, A, B, C, and D are 2.420.000, 1.630.000, 2.090.000, 2.280.000, 2.500.000, and 2.540.000, respectively. Otherwise, the average number of leukocytes in health botia in each treatment of K-, K+, A, B, C, D are 97.000, 90.000, 88.000, 87.000, 93.000 and 88.000, respectively. Whereas, the average number of leukocytes in *A. Hydrophila*-infected botia in each treatment of K-, K+, A, B, C, D are 97.000, 174.000, 174.000, 179.000, 185.000 and 185.000, respectively. The result also show that *A. Hydrophila*-infected botia which treated by ciprofloxacin has the average number of leukocytes in each treatment respectively are 980.000, 189.000, 125.000, 137.000, 133.000, and 136.000.

Keywords : *Aeromonas hydrophila*, erythrocyte, hematology, botia fish, leukocytes

PENDAHULUAN

Penyakit bakterial pada ikan merupakan salah satu penyakit yang dapat menimbulkan kerugian yang tidak sedikit. Selain dapat mematikan ikan, penyakit yang disebabkan oleh bakteri juga dapat menurunkan kualitas daging ikan yang terinfeksi. Penyakit akibat bakteri di Indonesia ternyata dapat mengakibatkan kematian sekitar 50-100% Hematologi sangat erat kaitannya dengan patologi, terutama untuk memperoleh gambaran ikan tersebut dalam keadaan sehat atau sakit. [1]. Darah terdiri dari dua kelompok besar yaitu sel dan plasma. Adapun sel darah terdiri dari sel darah merah (eritrosit) dan sel darah putih (leukosit). Berdasarkan warnanya sel darah dibagi menjadi sel darah merah dan sel darah putih. Darah mengandung sel-sel yang dirancang untuk mencegah infeksi, menghentikan pendarahan dan mengangkut hormon. Sel darah mempunyai peranan sangat penting dalam system kekebalan, terutama leukosit atau sel darah putih. Jenis-jenis leukosit mempunyai beberapa fungsi dalam melawan benda asing yang berhasil masuk kedalam tubuh [1]. Pada ikan yang normal, jumlah sel darah merah berkisar antara 1.050.000- 3.000.000 sel/mm³ darah [2].

Pada ikan yang normal, jumlah sel darah merah berkisar antara 1.050.000- 3.000.000 sel/mm³ darah [2]. Rendahnya jumlah sel darah merah (eritrosit) menandakan ikan dalam keadaan stress [3]. Apabila jumlah eritrosit berkurang maka keadaan tersebut ada indikasi masuknya benda asing ke dalam tubuh. menyatakan bahwa eritrosit ikan mempunyai inti dengan sel lonjong, berwarna merah kekuningan dan berukuran 12 – 13 µm dengan diameter 4 – 5 µm.

Leukosit memiliki bentuk khas, nukleus, sitoplasma dan organel, semuanya bersifat mampu bergerak pada keadaan tertentu. Eritrosit bersifat pasif dan melaksanakan fungsinya dalam pembuluh darah, sedangkan leukosit mampu keluar dari pembuluh darah menuju jaringan dalam menjalankan fungsinya. Jumlah seluruh leukosit jauh di bawah eritrosit, dan bervariasi tergantung jenis hewannya. Fluktuasi dalam jumlah leukosit pada tiap individu cukup besar pada kondisi tertentu, misalnya: stress, aktivitas fisiologis, gizi, umur,

dan lain-lain. Jumlah leukosit yang menyimpang dari keadaan normal mempunyai arti klinik penting untuk evaluasi proses penyakit. Setelah dibentuk sel-sel ini diangkut dalam darah menuju berbagai bagian tubuh untuk digunakan. Kebanyakan sel darah putih ditranspor secara khusus ke daerah yang terinfeksi dan mengalami peradangan serius [4]. Jumlah sel darah putih pada ikan berkisar antara 20.000-150.000 sel/mm³ darah [5].

Penelitian ini bertujuan untuk Mengetahui gambaran hematologi pada eritrosit, leukosit dan deferensial leukosit ikan sehat, ikan saat terinfeksi dan ikan sesudah pengobatan. Analisa hasil penelitian dengan menggunakan uji statistik sesuai dengan pola percobaan adalah RAL dan tiap perlakuan diulang 3 kali. Selanjutnya dilakukan analisa keragaman dengan uji F (ANOVA) dengan program SPSS 18 oneway, yaitu meliputi Descriptives, Test of homogeneity, ANOVA, Post Hoc Tests (Interpolasi), hasil akhir dianalisa pada Homogeneous subsets, dan Paired T-Test. Hal ini untuk membuktikan adanya Beda nyata, atau tidak terhadap perlakuan.

METODE PENELITIAN

Pengambilan sample darah

Darah ikan diambil pada bagian depan sirip ekor, sirip punggung, menggunakan spuit suntik yang terlebih dahulu diberi anti koagulan dengan Na Citrate atau Na₂EDTA sebanyak 0,1 ml, jarum suntik dibuat dengan kemiringan 45°. Darah yang diambil dimasukan dalam tube dan langsung disimpan pada refrigator.

Perhitungan jumlah leukosit

Darah diencerkan dalam pipet leukosit, kemudian dimasukkan ke dalam kamar hitung. Jumlah leukosit dihitung dengan volume tertentu dengan mengenakan faktor konversi jumlah leukosit per µl darah dapat. Larutan TURK digunakan sebagai larutan pengencer dengan komposisi larutan gentionviolet 1% dalam air 1 ml, asam asetat glasial 1 ml, aquadest ad 100 ml. Disaring sebelum dipakai.

Penghitungan Jumlah Eritrosit

Darah diencerkan dalam pipet eritrosit, kemudian dimasukkan kedalam kamar hitung. Jumlah eritrosit dihitung dalam volume tertentu dengan menggunakan faktor konversi, jumlah eritrosit per µl darah. Larutan pengencer yang dipakai adalah larutan HAYEM, dengan komposisi natrium sulfat (berair kristal) 5 g; natrium klorida 1 g; merkuri klorida 0,5 g, aquadest ad 200 ml.

* Alamat korespondensi:

Happy Nursyam

Email : happy_nsy@ub.ac.id

Alamat : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya

Juga dapat dipakai larutan GOWERS : natrium sulfat 12,5 g; asam asetat glasial 33,3 ml; aquadest ad 200 ml. Disaring sebelum dipakai.

HASIL DAN PEMBAHASAN

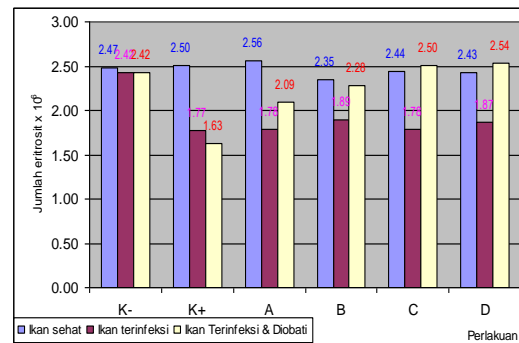
Eritrosit

Jumlah rata-rata sel darah merah dalam darah ikan botia sehat pada masing-masing perlakuan K-, K+, A, B, C, D berturut-turut adalah 2.470.000, 2.500.000, 2.560.000, 2.350.000, 2.440.000, dan 2.430.000. Kondisi ini masing normal dikarenakan ikan tidak memperoleh stressing dan didukung dengan kondisi lingkungan yang kondusif untuk kehidupan ikan botia.

Sementara itu pada ikan botia yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* diketahui jumlah rata-rata eritrosit pada masing-masing perlakuan K-, K+, A, B, C, dan D berturut-turut adalah 2.420.000, 1.770.000, 1.780.000, 1.890.000, 1.780.000, dan 1.870.000. Dari hasil perhitungan pada jumlah eritrosit ikan botia yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* mengalami penurunan yang drastis dibandingkan dengan jumlah eritrosit pada ikan botia yang sehat, hal ini dikarenakan adanya diduga diakibatkan adanya kontak dengan bakteri. Kontak tersebut mengakibatkan organ insang mengalami iritasi dan mengeluarkan mucus (lendir) sebagai perlindungan terhadap serangan bakteri. Akan tetapi mucus yang dihasilkan justru menutup permukaan lamella insang sehingga pertukaran O₂ dengan CO₂ terhambat, akibatnya tidak ada pengikatan oksigen oleh hemoglobin darah. Hal ini menyebabkan transportasi oksigen ke seluruh tubuh tidak ada, akibatnya ikan akan mengalami hypoksia (kekurangan oksigen).

Dari hasil penelitian terhadap jumlah rata-rata eritrosit ikan botia yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*, dan kemudian diobati dengan ciprofloxacin pada masing-masing perlakuan K-, K+, A, B, C, dan D berturut-turut adalah 2.420.000, 1.630.000, 2.090.000, 2.280.000, 2.500.000, dan 2.540.000. Jumlah eritrosit ikan botia yang diobati dengan ciprofloxacin cenderung naik dibandingkan dengan jumlah eritrosit ikan botia yang terinfeksi, dan jumlahnya mendekati normal. Kontrol positif (K+), yaitu ikan botia yang terinfeksi *A. hydrophila* dan tidak diobati, jumlah eritrosit justru semakin menurun jumlahnya. Jumlah eritrosit pada kondisi sehat adalah 2.500.000, kondisi terinfeksi 1.770.000, dan kondisi ikan terinfeksi tanpa diobati adalah 1.630.000. hal ini disebabkan kondisi insang semakin buruk, dan infeksi bakteri juga semakin

parah, sehingga menyebabkan kerja insang terganggu, yang berimbas pada kesulitan Hb mengikat oksigen. Berkurangnya jumlah eritrosit juga diduga disebabkan karena terjadinya anemia pada ikan. Anemia berdampak pada terhambatnya pertumbuhan ikan, karena rendahnya jumlah eritrosit mengakibatkan suplai makanan ke sel, jaringan dan organ akan berkurang sehingga proses metabolisme ikan akan terhambat.



Gambar 1. Jumlah Rata-rata Eritrosit

Dari hasil uji *Paired Samples T-Test* diketahui bahwa jumlah eritrosit ikan botia sehat berbeda nyata dengan jumlah eritrosit ikan botia yang terinfeksi, ini dibuktikan dengan hasil probabilitas *Pair 1* lebih kecil dibandingkan dengan α , yaitu $0.00 < 0.005$. Sedangkan untuk *Pair 2* yaitu perbandingan jumlah eritrosit ikan botia sehat dengan jumlah eritrosit ikan botia diobati adalah tidak berbeda nyata, ini dibuktikan dengan hasil probabilitasnya lebih besar dibandingkan dengan α , yaitu $0.030 > 0.005$. Dan hasil dari *Pair 3* yaitu perbandingan jumlah eritrosit ikan botia diobati dengan jumlah eritrosit ikan botia sakit adalah berbeda nyata, hal ini terlihat pada hasil probabilitasnya lebih kecil dibandingkan dengan α , yaitu $0.001 < 0.005$.

Leukosit (Sel Darah Putih)

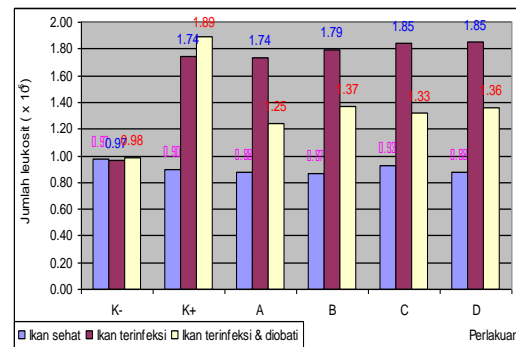
Jumlah rata-rata sel darah putih dalam darah ikan botia yang sehat pada masing-masing perlakuan K-, K+, A, B, C, D berturut-turut adalah 97.000, 90.000, 88.000, 87.000, 93.000 dan 88.000. Jumlah leukosit pada ikan botia sehat berada dalam kisaran normal. Hal ini dikarekan kondisi lingkungan yang mendukung hidup ikan, yaitu tidak adanya stressing dan kualitas air yang layak. Jumlah seluruh leukosit jauh di bawah eritrosit, dan bervariasi tergantung jenis hewannya. Fluktuasi dalam jumlah leukosit pada tiap individu cukup besar pada kondisi tertentu, misalnya: stress, aktivitas fisiologis, gizi, umur, dan lain-lain. Jumlah leukosit yang menyimpang

dari keadaan normal mempunyai arti klinik penting untuk evaluasi proses penyakit, itu jumlah rata-rata sel darah putih pada ikan botia yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila*, pada masing-masing perlakuan K-, K+, A, B, C, D berturut-turut adalah 97.000, 174.000, 174.000, 179.000, 185.000 dan 185.000. Jumlah leukosit pada ikan botia yang terinfeksi jumlahnya cenderung naik dengan drastis. Hal ini diduga karena ikan dalam kondisi stress akibat adanya infeksi bakteri *A. hydrophila* pada darah ikan dan organ lainnya. Jumlah leukosit pada ikan kontrol cenderung normal jika dibandingkan dengan ikan perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa ikan kontrol tidak dalam keadaan stress atau hidup pada lingkungan yang normal. Sedangkan pada ikan perlakuan, jumlah leukosit terus meningkat, ini disebabkan karena ikan perlakuan berusaha mempertahankan diri dari kondisi buruk akibat pemaparan bakteri yang dapat dilihat dari jumlah sel darah putih yang terus meningkat serta tubuh ikan tersebut akan membentuk antibodi. Leukosit merupakan sel yang berperan penting dalam sistem pertahanan seluler tubuh, sehingga peningkatan leukosit merupakan reaksi untuk meningkatkan daya tahan ikan uji. Selain itu naiknya jumlah leukosit ikan botia yang terinfeksi diduga juga karena sifat leukosit yang bersifat aktif atau mobile, yaitu leukosit akan bergerak menuju pada organ yang terinfeksi atau mengalami gangguan.

Sedangkan dari hasil penelitian terhadap ikan botia yang terinfeksi *A. hydrophila* dan kemudian diobati dengan ciprofloxacin diperoleh hasil perhitungan rata-rata leukosit pada masing-masing perlakuan berturut-turut adalah sebagai berikut 980.000, 189.000, 125.000, 137.000, 133.000, dan 136.000. Jumlah rata-rata leukosit pada ikan yang diobati dengan ciprofloxacin terlihat menurun, hal ini disebabkan adanya aktifitas ciprofloxacin yang membuat bakteri mati, sehingga infeksi berhenti, dan ikan tidak dalam kondisi stress. Karena infeksi berhenti maka keberadaan leukosit sebagai fagosit tidak diperlukan lagi, dengan demikian jumlah leukosit kembali mendekati jumlah normal.

Berbeda dengan jumlah leukosit pada ikan botia yang terinfeksi tetapi tidak diobati dengan antibiotik, jumlahnya terus meningkat sampai akhir penelitian, hal ini disebabkan ikan berusaha meningkatkan daya tahan tubuhnya dari serangan bakteri, sehingga leukosit bergerak aktif menuju daerah yang terkena infeksi. Selain itu ikan juga dalam keadaan stress yang mengakibatkan metabolisme ikan terganggu,

sehingga pembentukan energi juga terganggu, hal inilah yang membuat ikan terlihat lemah dan tidak mau berenang.



Gambar 3. Jumlah Rerata Leukosit Ikan Botia

Dari hasil uji *Paired Samples T-Test* diketahui bahwa jumlah leukosit ikan botia sehat berbeda nyata dengan jumlah leukosit ikan botia yang terinfeksi, ini dibuktikan dengan hasil probabilitas *Pair 1* lebih kecil dibandingkan dengan α , yaitu $0.00 < 0.005$. Sedangkan untuk *Pair 2* yaitu perbandingan jumlah leukosit ikan botia sehat dengan jumlah leukosit ikan botia diobati adalah berbeda nyata, ini dibuktikan dengan hasil probabilitasnya lebih kecil dibandingkan dengan α , yaitu $0.000 < 0.005$. Dan hasil dari *Pair 3* yaitu perbandingan jumlah leukosit ikan botia diobati dengan jumlah leukosit ikan botia sakit adalah berbeda nyata, hal ini terlihat pada hasil probabilitasnya lebih kecil dibandingkan dengan α , yaitu $0.000 < 0.005$.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian ciprofloxacin mampu mengendalikan infeksi bakteri *A. hydrophila* pada ikan botia, terlihat dari penurunan jumlah leukosit dan meningkatnya kembali jumlah eritrosit.

SARAN

Berdasarkan penelitian maka disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai gambaran hematologi lainnya, seperti Hb, hematokrit, makrofag dan lainnya. Dan perlu dilakukan pengujian terhadap antibiotik lainnya sehingga diperoleh antibiotik yang benar-benar efektif untuk mengendalikan *A. hydrophila* yang menyerang ikan botia.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Johny F., Zafran, Roza D. dan Ketut M. 2003. Hematologi beberapa spesies ikan laut

- budidaya. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia. 9 (4): 63-41.
- [2] Roberts R.J. 1978. Fish pathology. A Bailliere Tindall Book, Publ. Cassell Ltd.
- [3] Wedemeyer G.A. dan Yasutake W.T. 1977. Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress on fish health. US Dept. *Interior Fish Wildl. Ser. Tech. Pap.* 89: 18p.
- [4] Adair T.H. dan Guyton A.C. 1983. Modification of lymph by lymph nodes. II. Effect of increased lymph node venous blood pressure. *Am. J. Physiol.* 245 (4): H616-622.
- [5] Rastogi R.K., Saxena P.K. dan Iela L. 1977. Hydroxysteroid dehydrogenase activity in the ovary of *Lacerta sicula* Raf. during the annual cycle. *Monit. Zool. Ital. (N.S.)*. 11: 33-46.

Pengaruh Terapi Suplementasi Fitosterol pada Profil Lemak Plasma, Kadar Apolipoprotein (Apo) B-48, dan Penghitungan Sel Busa Aorta Tikus Pascadiet Atherogenik

Rahma Triliana¹, Djoko W. Soeatmadji², Handono Kalim³

¹ Pasca sarjana Universitas Brawijaya

² Kepala Bagian Lab. Ilmu Penyakit Dalam Rumah Sakit Syaiful Anwar

³ Staf Bagian Lab. Ilmu Penyakit Dalam Rumah Sakit Syaiful Anwar

Abstrak

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh terapi suplementasi fitosterol pada profil lemak, kadar apolipoprotein B-48, dan mengetahui jumlah sel busa pada tikus pasca diet atherogenik. Penelitian ini dilakukan menggunakan tikus wistar (34 ekor), umur 6-8 minggu, berat 100-160 g, diperlakukan diet atherogenik selama 8 minggu, dilanjutkan dengan diet standar (n=5), diet standar dengan suplementasi tablet fitosterol 0,1% (n=5), 1% (n=6), dan 2% (n=6) dalam total makanan selama 6 minggu. Tikus diet standar 14 minggu sebagai kontrol negatif (n=5) dan tikus diet atherogenik 14 minggu sebagai kontrol positif (n=6). Profil lemak (*Kolesterol Total, Trigliserida dan HDL-Kolesterol*) dianalisis dengan kit (*Diasys*), kadar LDL-kolesterol dihitung dengan rumus *friedwall* sedangkan kadar non HDL-kolesterol dihitung dengan mengurangi kadar kolesterol total dengan kadar HDL-Kolesterol. Kadar Apo-B-48 dianalisis dengan elektroforesis, elektroelusi, dialisa dan spektrofotometri diuret atau laury. Perhitungan jumlah sel busa aorta dilakukan secara manual pada 20 lapangan pandang pembesaran 1000X setelah pewarnaan dengan *Oil Red O* dan *Hematoxilin-Eosin* (HE) dengan 3 kali pengulangan. Hasil suplementasi fitosterol dosis 0,1% memiliki rentang 40-50 mg/kgBB/hari, 421-521 mg/kgBB/hari pada dosis 1% dan 937-1250 mg/kgBB/hari pada dosis 2%. Perbedaan signifikan didapatkan pada kadar kolesterol total, LDL-kolesterol, dan non HDL-kolesterol antara kontrol dengan kelompok suplementasi. Kadar HDL-kolesterol secara signifikan lebih rendah sedangkan kadar ApoB-48 tidak dapat dikuantifikasi akibat berbagai sebab. Penghitungan sel busa pun berbeda nyata antara kontrol dengan suplementasi. Berdasarkan penelitian ini diketahui bahwa suplementasi fitosterol dalam diet memiliki efek terapeutik pada profil lemak (kolesterol total, LDL-kolesterol, dan non HDL kolesterol) sehingga mampu mengurangi jumlah sel busa aorta tikus pasca diet atherogenik.

Kata kunci: apolipoprotein B, fitosterol, hiperlipidemia, hitung sel busa, profil lemak.

Abstract

The purpose of this study was to determine the effect of phytosterol supplementation therapy on lipid profile, levels of apolipoprotein B-48, and the number of sponge cells in mice post atherogenic diet. This study was conducted using 34 Wistar rats aged 6-8 weeks, weighing 100-160 g, treated with atherogenic diet for 8 weeks, followed by a standard diet (n = 5). Standard diet supplemented with 0.1% phytosterol tablets (n = 5), 1% (n = 6), and 2% (n = 6) in the total diet for 6 weeks. Standard diet mice aged 14 weeks as a negative control (n = 5) and 14 weeks atherogenic diet mice as a positive control (n = 6). Lipid profile (total cholesterol, triglycerides and HDL-cholesterol) were analyzed with the kit (*Diasys*), LDL-cholesterol was calculated with the *friedwall* formula whereas non-HDL-cholesterol levels was calculated by subtracting the total cholesterol to HDL-cholesterol. Levels of Apo-B-48 were analyzed by electrophoresis, electroelution, dialysis and spectrophotometry diuret or Laury. The number of aortic sponge cells was calculated manually on 20 fields of 1000X magnification after staining with *Oil Red O* and *Hematoxilin-eosin* (HE) with 3 replications. Results of phytosterol supplementation dose of 0.1% ranged 40-50 mg/kgBW/day, 421-521 mg/kgBW/day at dose of 1% and 937-1250 mg/kgBW/day at dose of 2%. Significant differences were found in total cholesterol, LDL-cholesterol, and non HDL-cholesterol between control and supplemented groups. HDL-cholesterol levels were significantly lower, while levels of ApoB-48 can not be quantified due to various reasons. Sponge cell count was significantly different between the controls with supplementation. This research note that phytosterol supplementation in the diet has a therapeutic effect on the lipid profile (total cholesterol, LDL-cholesterol, and non-HDL cholesterol) thus reduce the number of aortic sponge cells rat post atherogenic diet.

Keywords: apolipoprotein B, phytosterol, hyperlipidemia, sponge cell count, lipid profile.

PENDAHULUAN

Hiperlipidemia adalah faktor resiko mayor atherosklerosis yang potensial dikendalikan secara konservatif atau agresif [1]. Diet merupakan pendekatan terapeutik primer dan krusial pada penderita hiperlipidemia [2] karena mampu memperbaiki profil lemak lebih baik dibandingkan peningkatan dosis obat [3,4]. Terapi gizi pada hiperlipidemia ini dapat dilakukan dengan penurunan asupan kolesterol dan asam lemak jenuh serta peningkatan asupan asam lemak tak jenuh dan sterol atau stanol tanaman [5,6].

Sterol atau stanol tanaman (fitosterol) adalah senyawa sterol tanaman yang analog dengan kolesterol hewani dan penting untuk kehidupan tanaman [7,8]. Sumber utama fitosterol adalah kacang-kacangan, biji-bijian, minyak nabati, sereal dan kedelai [9]. Struktur fitosterol dengan rantai samping tidak tersaturasi berupa kelompok etil atau metil pada posisi C-24 [10]. Hal ini mengakibatkan fitosterol diabsorpsi minimal, diserap dalam kecepatan penyerapan rendah, serta dieliminasi lebih cepat dibandingkan kolesterol hewan sehingga kadar dalam serum relatif rendah [11].

Efek hipolipidemik fitosterol telah dikenal sejak tahun 1950-an dan potensial dikembangkan [12] karena aman, tanpa efek toksik bermakna, alamiah, dosis rendah sudah memberikan efek serta tidak mempengaruhi absorpsi vitamin terlarut lemak di usus secara bermakna [13]. Selain itu, pada individu tanpa defek genetik sitosterolemia, fitosterol terbukti tidak tertimbun dalam lesi atherosklerosis baik bentuk normal maupun teroksidasi [14] sehingga aman dikonsumsi jangka pendek maupun panjang [15].

Asupan fitosterol 2-3 gr/hari menurunkan kadar kolesterol total dan LDL sebesar 9-20% [16]. Fitosterol menghambat absorpsi kolesterol diet dan bilier di usus [13,17] dengan berkompetisi dan menggeser kolesterol pada pembentukan *mixed micelles* di lumen usus sehingga kadar kolesterol intrasel enterosit menurun [18,19,20]. Selain itu, fitosterol juga diduga terlibat pada metabolisme lipoprotein [9,21] melalui mekanisme kompensasi hepar akibat hambatan absorpsi kolesterol [22]. Suplementasi fitosterol pada mencit transgenik apolipoprotein E*3-Leiden menunjukkan penu-

runan kadar kolesterol hepar dan VLDL [22]. Hasil yang sama diperoleh [23] pada *Apo-E Deficient Mice* dan peran fitosterol pada proses atherosklerosis yang menjadi petunjuk efek terapeutik dari suplementasi fitosterol [23].

Penelitian fitosterol pada manusia ditunjukkan oleh [24] dan [25] pada populasi hiperkolesterolemi. Suplementasi fitosterol terbukti efektif menurunkan kadar kolesterol total dan LDL. Hasil yang sama diperoleh dengan kelompok penelitian hiperkolesterolemia familial [26], wanita *post menopause* pascaserangan jantung [27], dan penderita *Diabetes Mellitus* [28]. Fitosterol pun berpengaruh hipokolesterolemik pada suplementasi bentuk pangan fungsional berupa jus jeruk [29], *margarine* [30,31], coklat *matrix*/batangan [32], *salad dressing* [33] dan keju [34]. Efek hipokolesterolemik fitosterol terbukti bersifat tergantung dosis pada pria dan wanita [35].

Banyak penelitian yang menunjukkan pengaruh kadar lipoprotein kaya trigliserida terutama kilomikron dan VLDL pada metabolisme lemak. VLDL adalah prekursor LDL [36] sehingga kadar VLDL dapat mempengaruhi kadar LDL [37,38].

Apolipoprotein B (ApoB) adalah komponen struktural penting VLDL dan kilomikron [39]. ApoB menjadi integritas struktural partikel lipoprotein sampai didegradasi [40]. Ada dua tipe utama ApoB yakni ApoB-48 kilomikron yang dibentuk usus dan ApoB-100 VLDL yang dibentuk hati [41]. ApoB-48 adalah "percabangan" ApoB-100 karena dibentuk oleh mRNA ApoB-100 yang mengalami *editing* pada kodon 2153 [40, 42].

Penelitian kinetik ApoB-48 & ApoB-100 oleh [43] menunjukkan bahwa jumlah depo ApoB-100-VLDL berkorelasi dengan kecepatan pembentukan ApoB-48. Katabolisme ApoB-48 juga terbukti lebih rendah dibanding ApoB-100 sehingga mengarah pada atherogenitas ApoB-48 usus. Peningkatan lipoprotein mengandung ApoB-48 (kilomikron dan kilomikronremnan) dapat terdepositasi dalam dinding arteri dan makrofag [44] sehingga ApoB-48 menjadi salah satu faktor atherogenik usus yang perlu dipelajari.

Volger *et al.* [22] dan Moghadasian *et al.* [23] telah membuktikan peran fitosterol pada penurunan kadar kolesterol dan kemampuan hepar mengkompensasi hilangnya kolesterol akibat hambatan absorpsi. Namun penelitian tentang pengaruh penghambatan absorpsi oleh fitosterol pada variabel metabolisme lemak eksogen (usus) misalnya kilomikron atau ApoB-48

* Alamat korespondensi:

Rahma Triliana

Email : rahma.triliana@adelaide.edu.au

Alamat : Pascasarjana Universitas Brawijaya

belum dida-patkan, baik kondisi normal maupun hiperkolesterol pada hewan coba maupun manusia.

Berdasarkan asumsi bahwa penghambatan absorpsi oleh fitosterol akan menurunkan kadar kolesterol intrasel enterosit yang akhirnya dapat menurunkan kadar kilomikron darah maka penelitian tentang pengaruh suplementasi fitosterol dalam diet pada profil lemak, parameter lipemia usus (ApoB-48), dan hubungannya dengan jumlah sel busa (*foam cell*) aorta perlu dilakukan.

Oleh sebab itu, penelitian ini mengangkat masalah tentang pengaruh terapi suplementasi sterol tanaman (fitosterol) pada kadar kolesterol total, trigliserida, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, non-HDL-kolesterol, ApoB-48 dan penghi-tungan *foam cell* (sel busa) aorta tikus pascadiet atherogenik. Penelitian ini diharapkan menjadi dasar pengembangan terapi diet dan penggunaan fitosterol pada penderita hiperkolesterol akibat asupan lemak tinggi, dasar pemahaman pengaruh hambatan absorpsi kolesterol pada metabolisme lipoprotein dan lemak dalam tubuh serta menjadi dasar pemahaman metabolisme fitosterol dalam tubuh manusia dan perannya pada metabolisme lemak dan proses atherosklerosis.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei-Juli 2004 secara eksperimental (*Experimental Study Design*) menggunakan rancangan penelitian pasca penelitian dengan kontrol (*Post Test Design with Control*). Hewan coba yang digunakan adalah tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar (galur murni biakan lokal), jantan, berumur 6-8 minggu dengan berat badan berkisar 100-160gr pada awal percobaan (34 ekor) yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan (Tabel 1).

Pemberian Diet

Diet standar dibuat dengan mencampur konsentrat pakan ayam 200 g dengan 100 g tepung terigu bersama air, lalu digiling dan dikeringkan sesuai dengan prosedur Laboratorium Farmakologi yang dikutip dari Ghosh [45]. Diet ini memiliki kandungan karbohidrat 62,8%, lemak 2%, protein 16,34%, zat lain 18,86%, dan kalori 207,92 kal/50 g pakan.

Diet atherogenik adalah diet yang diberikan untuk menginduksi hiperkolesterol pada hewan coba yang dibuat berdasarkan formula [46].

Tabel 1. Pembagian Kelompok Hewan Coba

Kelompok	N	Pemberian Diet
I	5	Diet standar 14 minggu (kontrol normal)
II _a	6	Diet atherogenik 14 minggu (kontrol positif/ATA)
II _b	6	Diet atherogenik 8 minggu dilanjutkan diet standar 6 minggu (kontrol perlakuan/ATS)
II _c	5	Diet atherogenik 8 minggu dilanjutkan diet standar 6 minggu dengan suplementasi fitosterol dosis 0,1% dari total makanan atau 50 mg/hari (Fito-1)
II _d	6	Diet atherogenik 8 minggu dilanjutkan diet standar 6 minggu dengan suplementasi fitosterol dosis 1% dari total makanan atau 500 mg/hari (Fito-2)
II _e	6	Diet atherogenik 8 minggu dilanjutkan diet standar 6 minggu dengan suplementasi fitosterol dosis 2% dari total makanan atau 1000 mg/hari (Fito-3)

Suplementasi fitosterol dilakukan dengan mencampurkan 0,1%, 1% dan 2% (dari total makanan) tablet fitosterol yang telah digerus. Diet dibuat setiap hari dengan kalkulasi berat air agar konsumsi pakan dapat dihitung dalam bentuk persentase berat kering.

Selama masa prakondisi, tikus diletakkan pada kandang berisi 5-6 ekor lalu dirandomisasi ulang, dalam kandang yang berisi 2-3 ekor tikus. Diet harian yang diberikan adalah 50 g/ekor/hari dan sisa pakan setelah 24 jam, ditimbang dan dihitung sebagai rata-rata harian konsumsi pakan tikus/kelompok/hari.

Pengambilan Sampel Darah dan Pembunuhan Hewan coba

Sampel darah hewan coba diambil di akhir penelitian setelah pre-anestesi ketamin dosis 5mg/100gBB tikus. Darah diambil dari jantung, dimasukkan tabung berisi EDTA, dan disentrifugasi 3600 rpm selama 15 menit untuk pemeriksaan profil lemak. Hewan coba lalu dibunuh dengan membuka abdomen.

Organ hepar, jantung, paru, ginjal (kanan dan kiri), dan testis (kanan dan kiri), diambil, dan dibersihkan. Usus halus dibebaskan dari peritoneum, dipotong dari ujung gaster (*pylorus*) sampai percabangan ileum dan kolon (*ileocaecal junction*). Lumen usus dan organ dibersihkan dan dicuci dengan larutan normal saline 0,9% dingin (*icelcold*) kemudian ditimbang dengan timbangan digital (*OHAUS-Analytical plus*).

Aorta diambil dari *arcus aorta* hingga *aorta abdominalis* dimasukkan dalam *ependorf* untuk kemudian dipotong guna pemeriksaan hitung sel

busa aorta. Semua preparat organ disimpan dalam lemari es suhu -40°C .

Pemeriksaan Profil Lemak

Profil lemak yang diperiksa adalah kadar kolesterol total, trigliserida, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol dan non-HDL-kolesterol. Kolesterol total, trigliserida dan HDL-kolesterol diperiksa menggunakan kit komersial khusus (*DiaSys*) dengan metode spektrofotometri seperti yang dijabarkan dalam label. LDL-kolesterol dihitung dengan *Friedwall Equation/Rumus Friedwall* [47], sedangkan nonHDL kolesterol dihitung secara matematis dengan mengurangi kadar kolesterol total dengan kadar HDL-kolesterol [39].

Pemeriksaan Kadar Apolipoprotein B-48

Pemeriksaan kadar ApoB-48 dilakukan dengan modifikasi metode Rajaratnam *et al.* [44]. Singkatnya, 50 μL plasma dilipidasi dengan 100 μL larutan etanol-dietil eter (3:1), dan sentrifugasi 3600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, pelet ditambah 100 μL tris-base 0,1 M dan didiamkan semalam.

Sampel yang sudah didiamkan semalam (50 μL) divorteks bersama 100 μL *Reducing Buffer* (RSB) (*Sodium Dodesil Sulphate* 10%, Gliserol 87%, Tris-Base 1M pH 6,8, β -mercaptoetanol dan *bromophenol blue* 0,1%), kemudian didenaturasi dengan suhu 80°C selama 15 menit dan sentrifugasi ulang (2 menit-3600 rpm). Hasil kemudian di-*running* pada 12,5% gel poliakrilamide *mini prolean vertical gel apparatus* (Biorad) selama 115 menit, 120 volt, di-*staining* dengan *Comassie blue* 0,04% dan di-*destaining* dengan asam asetat 0,5%.

Penghitungan Sel Busa/*Foam Cell Count*

Aorta yang telah dipotong, dicat dengan *Oil Red O* dan HE sesuai prosedur dalam Koss [48]. Hasil diperiksa dibawah mikroskop pembesaran 100X untuk mencari aorta yang jelas lapisannya lalu dihitung dalam 20 lapangan pandang pembesaran 1000X untuk identifikasi dan penghitungan sel busa [49]. Pengulangan dilakukan 3 kali pada masa yang berbeda oleh peneliti yang sama.

Teknik Analisa Data

Data dianalisa sebagai data kelompok dan disajikan dalam bentuk $\text{mean} \pm \text{standard deviasi}$ ($x \pm \text{SD}$) dan diuji beda dengan *Independent Sample t-test* untuk membandingkan perbedaan *mean* pada kelompok I (normal), IIa (ATA), dan IIb (ATS). Sedangkan uji beda *mean* kelompok IIc (Fito-1), IId (Fito-2), dan IIe (Fito-3) dilakukan

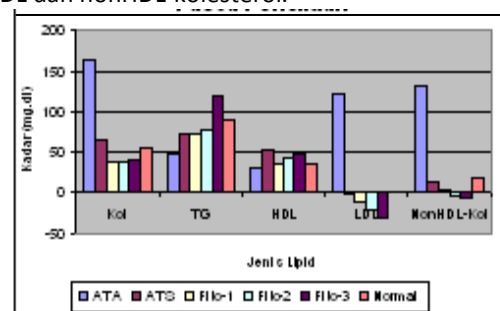
dengan uji statistik *one way-ANOVA* dengan kelompok IIb sebagai kontrol. Normalitas data dinilai dengan uji *Saphiro-Wilk* ($p > 0,05$) sedangkan homogenitas kelompok dinilai dengan uji *homogeneity of variance* $p > 0,05$.

Hasil data dengan perbedaan signifikan diuji korelasi untuk mengetahui tingkat hubungan antar variabel dengan korelasi *Pearson* atau *Spearman*. Analisa data dilakukan dengan perangkat *software* statistik SPSS versi 11.5.

HASIL DAN ANALISA DATA

Profil Lemak Plasma Pasca Penelitian

Uji *t-test* profil lemak darah pasca perlakuan pada hampir semua perlakuan menunjukkan perbedaan yang signifikan kecuali HDL-kolesterol. Kadar kolesterol total, LDL-kolesterol, dan nonHDL-kolesterol kontrol positif lebih tinggi sedangkan kadar trigliserida dan HDL lebih rendah dibandingkan kontrol negatif (Gambar 1). Uji *t-test* kontrol negatif dan kontrol riset juga berbeda signifikan pada kadar kolesterol total dan HDL-kolesterol (kelompok riset lebih tinggi) tetapi tidak signifikan untuk kadar trigliserida, LDL dan nonHDL-kolesterol.



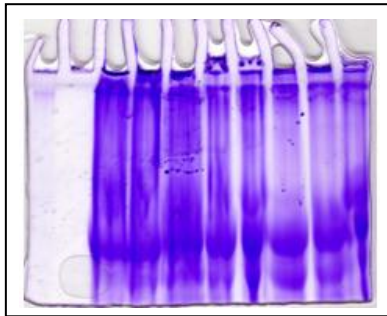
Gambar 1. Profil lemak tikus pasca perlakuan.

Rata-rata kadar plasma tikus pasca penelitian. LDL-kolesterol dan nonHDL-kolesterol negatif terdapat pada kelompok dengan suplementasi fitosterol 1% dan 2%.

Uji *one-way-ANOVA* kontrol riset dengan suplementasi fitosterol menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada semua parameter profil lemak. Uji LSD antar kelompok suplementasi dengan kontrol pada kadar kolesterol, LDL dan nonHDL-kolesterol bernilai $p > 0,05$ untuk suplementasi fitosterol 0,1%. Hal ini menunjukkan bahwa dosis 0,1%, walaupun mampu menurunkan kolesterol, tidak cukup untuk memberikan perbedaan secara statistik. Nilai LSD kadar HDL-kolesterol dibandingkan dengan kontrol hanya signifikan pada suplementasi 0,1%. Sedangkan kadar trigliserida hanya berbeda pada suplementasi 2% dibandingkan kontrol.

Analisa Apolipoprotein B-48

Analisis Apolipoprotein B-48 dilakukan dengan beberapa teknik preparasi elektroforesis. Namun, berdasarkan hasil analisis elektroforesis yang telah dilakukan tidak terbentuk pita protein pada gel, meskipun telah dilakukan berulang kali dengan berbagai metode preparasi elektroforesis. Salah satu hasil elektroforesis tampak pada Gambar 2. Kegagalan ini diduga akibat struktur Apo B-48 (ikatan disulfida) yang mengendap saat dilakukan delipidasi dan tidak dilakukannya ultrasentrifugasi untuk pepadatan konsentrasi Apo-B-48 dalam plasma.

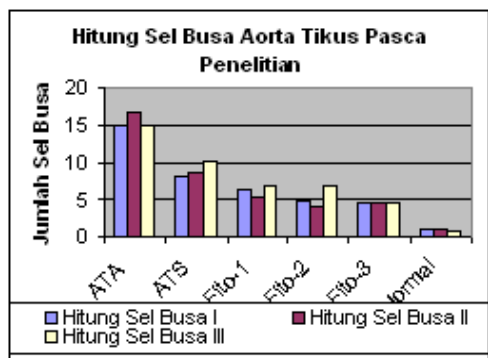


Gambar 2. Hasil elektroforesis dengan berbagai preparasi.

Kegagalan pemisahan protein ApoB-48 disamping oleh karena faktor struktur atau sifat fisik dan kimiawi protein ApoB-48. Selain itu, kemungkinan yang lainnya adalah akibat faktor teknis, misalnya tidak dilakukannya ultrasentrifugasi, penyimpanan pada suhu -40°C, penyimpanan yang lama (>2 bulan), dan sedikitnya jumlah sampel darah yang diperoleh selama penelitian terutama setelah dikurangi jumlah darah untuk analisis profil lemak plasma.

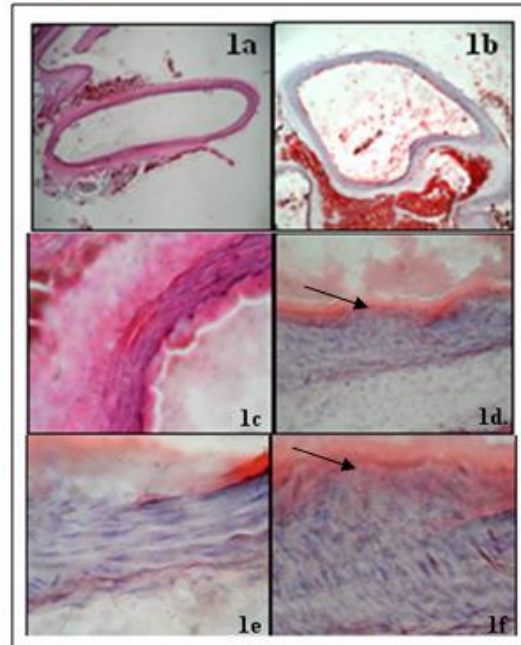
Perhitungan Jumlah Sel busa (Foam Cell)

Nilai hitung sel busa aorta tikus pasca penelitian pada kelompok kontrol negatif (normal), kontrol positif (ATA), kontrol penelitian (ATS) dan suplementasi fitosterol berturut-turut, 0,1% (Fito-1), 1% (Fito-2), 2%(Fito-3) (Gambar 3).



Gambar 3. Nilai hitung sel busa aorta tikus pasca penelitian.

Hasil pengecatan HE aorta pada perbesaran 100x tampak merah dan sel-sel otot polos akan tercatat merah gelap, sedangkan dengan pengecatan Oil Red O akan nampak muda atau cenderung berwarna ungu (Gambar 4.). Lining (barisan) sel pada aorta normal nampak lebih teratur dan lebih intak, sedangkan dengan diet atherogenik 14 minggu (kontrol positif, barisan sel nampak merenggang dengan beberapa penonjolan bawah endotel atau deposit lemak



Gambar 4. Aorta tikus. 1a) Kontrol negatif (HE); 1b) Kontrol positif (Oil Red O) (100x); 1c) Kontrol negatif (HE); 1d) Kontrol positif (Oil Red O) (400x); 1e) Kontrol positif (HE); 1f) Kontrol negatif (Oil Red O) (1000x).

sub endothelial. Pada perbesaran 400x dan penonjolan di bawah endotel dengan endotel yang tidak intak, sedangkan pada perbesaran 1000x, pada kontrol positif tampak terdapat etheroma. Tampak sel busa sebagai sel yang besar dengan inti berwarna gelap yang terdorong kearah tepi dengan sitoplasma yang berwarna merah (tanda panah) (Gambar 4).

Hasil analisis uji one-way-ANOVA kontrol riset dan suplementasi fitosterol pada berbagai dosis menunjukkan perbedaan signifikan (p<0,001) jumlah sel busa aorta. Namun Uji LSD antar kelompok suplementasi 0,1%, 1% dan 2% menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok.

PEMBAHASAN

Rentang dosis suplementasi fitosterol pada makanan setelah dikalkulasi dalam bentuk berat

pakam kering diperoleh hasil antara 0,0122-0,0164 g/ekor tikus atau sekitar 44-51 mg/kgBB tikus pada suplementasi fitosterol 0,1% (Fito-1), 0,1403-0,1738 g/ekor tikus atau sekitar 394-565 mg/kgBB tikus pada suplementasi fitosterol 1% (Fito-2) dan 0,3122-0,4167 g/ekor tikus atau sekitar 734-1285 mg/kgBB tikus pada suplementasi fitosterol 2% (Fito-3). Pemilihan dosis didasarkan pada penelitian yang dilakukan Sugano *et al.* [50] yang menggunakan fitosterol 0,1%-1% pada tikus jantan selama 10 sampai 14 hari dengan hasil penurunan kolesterol hepar yang signifikan.

Pemberian fitosterol dilakukan dalam bentuk suplementasi pada makanan memiliki kelebihan dan kelemahan yang dapat menjadi kelebihan dan kelemahan penelitian karena dapat mempengaruhi hasil penelitian. Kelebihan pemberian bentuk suplementasi antara lain; mendekati kondisi keseharian konsumsi fitosterol dalam makanan karena fitosterol digunakan sebagai bahan *functional food*, pemberian dapat dilakukan setiap hari tanpa menimbulkan stres penelitian yang tinggi pada hewan coba sehingga risiko kehilangan hewan coba selama penelitian berkurang, rendahnya stres penelitian dapat mengurangi bias akibat produksi hormon katekolamin yang mempengaruhi kondisi hewan coba, dapat diberikan dalam jangka waktu lama, tidak mengurangi volume pengisian lambung hewan coba sehingga konsumsi makanan dapat dianggap setara.

Namun pemberian terapi fitosterol secara suplementasi juga memiliki kelemahan antara lain, dosis antar tikus dalam satu kelompok dapat tidak seragam karena kadar fitosterol yang dikonsumsi tergantung jumlah makanan yang diasup, memiliki rentang dosis yang lebar sehingga dosis awal fitosterol mulai menimbulkan efek tidak dapat ditentukan dengan tepat, pemberian fitosterol bentuk suplementasi makanan berisiko memiliki sebaran data konsumsi fitosterol yang tidak normal sehingga menyulitkan proses analisis statistik. Selain itu, pemberian yang dilakukan dalam bentuk kelompok dan bukan *individual cage* meningkatkan risiko dosis yang tidak sama antar tikus dalam kelompok. Untuk menyikapi sebaran data yang tidak normal, analisis data untuk menilai peran konsumsi fitosterol dalam diet dengan variabel dependen lainnya dilakukan dengan analisis parametrik dan uji korelasi *Spearman* yang menilai korelasi dosis-efek dengan skala ordinal untuk suplementasi fitosterol.

Analisa kolesterol total, LDL-Kolesterol dan nonHDL kolesterol antar kontrol (Gambar 1.) menunjukkan bahwa diet normal pun mampu menurunkan kadar kolesterol total, LDL-kolesterol dan nonHDL-kolesterol pada tikus pasca diet atherogenik. Namun, penurunan kadar kolesterol total tidak mencapai level sama dengan normal walaupun kadar LDL-kolesterol dan HDL-kolesterolnya sama.

Terapi suplementasi fitosterol secara sangat signifikan ($p < 0,001$) mampu menurunkan kadar kolesterol total, LDL-kolesterol dan nonHDL-kolesterol tikus pascadiet atherogenik mendekati kadar kolesterol total tikus normal, bahkan lebih rendah. Suplementasi 0,1%, 1% dan 2% dapat menurunkan kadar kolesterol total sebesar 44,31%, 44,07%, 41,05% yang tercapai pada dosis fitosterol 0,1%. Hasil ini konsisten dengan penelitian Sugano *et al.* [50] yang memberikan penurunan kolesterol hepar 17,5%-31,5% dengan diet fitosterol 0,1%-2% walau diet hiperkolesterol yang digunakan berbeda.

Uji LSD pada kadar kolesterol total dengan kontrol yang tidak berbeda mengarah pada efek penurunan kadar kolesterol total yang tidak tergantung dosis. Hal ini bertentangan dengan penelitian-penelitian sebelumnya yang menunjukkan efek penurunan kolesterol tergantung dosis pada manusia baik pria maupun wanita [35] maupun pada tikus [51]. Kondisi ini diduga terjadi karena suplementasi fitosterol 0,1% telah menurunkan kadar kolesterol total sampai 44% bersama diet standar (rendah lemak). Penurunan kadar kolesterol total ini sangat drastis sehingga diduga telah mencapai efek maksimal penurunan kolesterol total dalam darah sehingga penambahan dosis tidak lagi memberikan pengaruh.

Penelitian dengan fitosterol larut air (FM-VP4) menunjukkan bahwa fitosterol dapat mempengaruhi mekanisme *efflux* atau *influx* kolesterol intraseluler karena mampu menurunkan akumulasi *michelle* yang mengandung kolesterol dalam sel Caco-2 (sel usus) invitro [20]. Hal ini membuktikan bahwa fitosterol bekerja melalui penghambatan absorpsi kolesterol dan mungkin juga pada fase absorpsi kolesterol lanjutan [12].

LDL-kolesterol dengan suplementasi menunjukkan adanya penurunan kolesterol sebesar 1396,60%, 2460,50%, 3757,48%, dengan efek yang tergantung dosis. Hal ini terlihat pada nilai penurunan LDL yang tidak signifikan antara kelompok Fito-1 dengan kontrol riset, Fito-1 dengan Fito-2, dan Fito-2 dengan Fito-3 namun signifikan antara kontrol dengan Fito-2 dan Fito-3, Fito-1 dan Fito-3. Efek penurunan LDL-

kolesterol tercapai dengan dosis suplementasi 1%, dan penambahan dosis memberikan efek lebih lanjut. Hal ini diduga terjadi akibat hambatan absorpsi kolesterol usus akan menyebabkan penurunan kolesterol dalam hepar sehingga pembentukan VLDL berkurang sedangkan pembentukan *LDL-receptor* hepar maupun jaringan meningkat [22].

Hasil nonHDL-kolesterol memiliki hasil yang mirip dengan kondisi kadar LDL-kolesterol. Nilai LDL kolesterol negatif hanya didapatkan pada suplementasi 1% dan 2% fitosterol dengan perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok suplementasi namun bermakna dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa fitosterol mampu menurunkan kadar nonHDL-kolesterol namun efek tergantung dosisnya tidak nampak yang mungkin terjadi akibat nilai HDL-kolesterol kontrol pasca diet yang lebih tinggi dibandingkan nonsuplementasi.

Kadar HDL-kolesterol berbeda bermakna antara kontrol dengan kelompok Fito-1 namun tidak dengan kelompok yang lain (HDL-kolesterol kontrol lebih tinggi). Kadar HDL yang lebih rendah pada suplementasi fitosterol ini mungkin terjadi akibat efek kompetisi fitosterol dengan kolesterol pada proses *efflux* kolesterol melalui *ATP-binding Cassettes* (ABC) A-1 [52]. Karena kadar HDL-kolesterol Fito-1 hampir sama dengan kadar HDL-kolesterol tikus normal maka diperkirakan kadar tersebut standar untuk tikus sehingga dapat dianggap tidak berpengaruh atherogenik pada kadar HDL-kolesterol tersebut.

Peningkatan dosis suplementasi fitosterol memberikan peningkatan kadar HDL-kolesterol sehingga kadarnya tidak berbeda dengan kontrol. Perbedaan yang tidak signifikan pada dosis 1% dan 2% sama dengan hasil penelitian suplementasi fitosterol lainnya karena fitosterol diduga hanya berefek minimal pada kadar HDL hewan coba [23,53] maupun manusia [25, 31]. Peningkatan kadar HDL-kolesterol seiring dengan penambahan dosis mungkin terjadi akibat peningkatan pembentukan HDL untuk eliminasi fitosterol. Robins dan Fasulo [54] menyatakan bahwa hanya HDL yang mampu menjadi transpor sterol non-kolesterol ke hepar dan saluran bilier untuk dieliminasi. Penelitian lanjutan tentang proses eliminasi fitosterol yang melibatkan HDL, terutama HDL dari usus, dan perannya pada metabolisme lipoprotein perlu dilakukan.

Trigliserida adalah salah satu parameter lemak *post-prandial* penting selain retinil ester dan apolipoprotein B-48 [55]. Konsentrasi trigliserida bervariasi sampai 10% pada kondisi

puasa, memiliki kadar tertinggi pada 3-4 jam pasca konsumsi makanan [56] dan menurun perlahan seiring pengambilan trigliserida oleh jaringan [57]. Oleh sebab itu, waktu pengambilan sampel darah dapat mempengaruhi kadar trigliserida sehingga hasil tidak dapat dianalisis terutama pada hewan coba tikus. Hal ini karena tikus tidak dapat dipuaskan lama sehingga kadar trigliserida plasma dapat sangat bervariasi dalam kelompok. Selain itu, tikus merupakan hewan yang aktif pada malam hari (nokturnal) sehingga kadar trigliserida dapat lebih tinggi pada malam dan pagi hari dibandingkan siang atau sore hari. Oleh sebab itu, kadar trigliserida tidak dipakai sebagai acuan pengambilan keputusan, berapapun nilainya. Kadar trigliserida pada penelitian ini lebih ditujukan untuk membantu penghitungan kadar LDL-kolesterol secara tidak langsung dengan persamaan *Friedwall*.

Hasil elektroforesis dengan berbagai preparasi maupun cara telah dilakukan namun tetap gagal dalam memperoleh pita protein khusus dengan berat molekul 250.000 kDa (apolipoprotein B-48). Kondisi ini diduga terjadi karena dimungkinkan pada saat mengalami proses delipidasi, komponen protein mayor lipoprotein menjadi tidak larut air dan membentuk massa agregat molekuler yang besar sehingga mengganggu proses elektroforesis. Selain hal tersebut dimungkinkan karena Apo B-48 yang terdelipidasi akan membentuk *intermolecular disulfide-linked polymers* yang terjadi akibat adanya kelompok *sulphy-dryl* yang terbenam dalam inti lemak [40]. Serta preparasi sampel dilakukan tanpa ultrasentrifugasi pada 40.000 rpm selama 16-24 jam [44,58,59,60] yang krusial untuk elektroforesis guna kuantifikasi kadar ApoB-48 karena keterbatasan alat.

Namun karena ApoB merupakan apolipoprotein integral dari semua lipo-protein darah kecuali HDL [61] maka kadar ApoB dapat diasumsikan sama dengan kadar nonHDL-kolesterol. Hal ini karena satu ApoB merupakan komponen integral satu lipoprotein nonHDL-VLDL, IDL, LDL, kilomikron dan remnannya [36] sampai didegradasi [57] sehingga kadar nonHDL-kolesterol dapat dipakai sebagai pengukuran tidak langsung terhadap ApoB baik 48 maupun 100. Karena nilai nonHDL-kolesterol menurun, dan berbeda secara signifikan dengan kontrol, maka kadar ApoB-48 diasumsikan menurun dengan penggunaan fitosterol. Hal ini membawa pada kemungkinan kerja fitosterol selain hambatan *mixed-michelle* di usus, misalnya pada

fase absorpsi kolesterol lanjutan yang memerlukan penelitian lebih lanjut.

Uji *Independent Sample T-Test* antar kontrol memberikan perbedaan yang signifikan pada pemeriksaan hitung sel busa di tiap perhitungan yang dilakukan. Hal ini menunjukkan bahwa perubahan diet dari diet lemak tinggi (atherogenik) ke diet lemak rendah (standar) pun memiliki efek terapeutik pada penghitungan sel busa walau tetap lebih banyak dibanding normal.

Penurunan signifikan perhitungan jumlah sel busa didapatkan pada suplementasi fitosterol baik 0,1%, 1% maupun 2% dengan sifat yang tergantung dosis. Efek penurunan pembentukan sel busa ini senada dengan penelitian Moghadasian *et al.* [23,62] yang mengamati adanya penurunan lesi atherosklerosis pada mencit transgenik dengan suplementasi fitosterol. Hal ini menunjukkan bahwa fitosterol memiliki efek terapi pada kondisi hiperlipidemia genetik maupun induksi lingkungan (diet tinggi lemak) sehingga dapat dipertimbangkan sebagai regimen pengobatan dietetik baru selain asam lemak tak jenuh.

Efek penurunan lesi atherosklerosis diduga terjadi akibat pengaruh fitosterol pada profil lemak darah. Uji korelasi antara penghitungan sel busa dengan kadar kolesterol total, LDL-kolesterol maupun nonHDL-kolesterol membuktikan hal ini dengan adanya korelasi positif berkekuatan tinggi (*Pearson rho*>700) pada setiap penghitungan sel busa. Berdasarkan jumlah tersebut, fitosterol diduga turut berperan pada *efflux* dan *influx* kolesterol sehingga dapat mendorong keluarnya kolesterol dari makrofag.

Eliminasi fitosterol dilakukan oleh *ATP-binding cassette half transporters-ABCG5* dan *ABCG8* yang berfungsi mengeluarkan sterol non-kolesterol dari darah dan jaringan [63]. Gen *ABCG5* dan *ABCG8* diaktifasi oleh *Liver X receptor* (LXR) yang juga mempengaruhi pembentukan *ABCA1* untuk *efflux* kolesterol [64,65]. Hal ini terbukti dengan adanya induksi intestinal *ATP-binding Cassettes Trans-porters* oleh *Phytosterol-derived liver X Receptor Agonist* disertai peningkatan ekspresi *ABCG5* dan *ABCG8* [66].

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Terapi suplementasi fitosterol dalam diet dengan dosis 0,1% memiliki rentang dosis 44-51 mg/kgBB tikus/minggu, dosis 1% memberikan rentang 394-565 mg/kgBB tikus/minggu dan dosis 2% memiliki rentang 734-1285 mg/kgBB tikus/minggu.
2. Penerapan terapi diet rendah lemak pada tikus pascadiet atherogenik memiliki efek terapi karena dapat mempengaruhi kadar kolesterol total, LDL-kolesterol, non-HDL-kolesterol dan hitung sel busa aorta.
3. Terapi suplementasi fitosterol dalam diet rendah lemak dapat mempengaruhi dan memperbaiki kadar kolesterol total dan LDL-kolesterol tikus pascadiet atherogenik secara lebih baik dibandingkan diet rendah lemak saja. Hal ini diduga terjadi akibat peran fitosterol pada peng-hambatan absorpsi kolesterol dan pengaruh fitosterol pada *influx* atau *efflux* kolesterol.
4. Terapi suplementasi fitosterol dapat menurunkan kadar nonHDL kole-sterol yang merupakan cerminan kadar ApoB dalam darah.
5. Terapi suplementasi fitosterol dapat menurunkan jumlah sel busa aorta tikus pascadiet atherogenik yang diduga terjadi akibat peran fitosterol pada profil lemak darah dan *efflux* kolesterol yang dapat menurunkan deposit lemak dalam makrofag.

SARAN

1. Dilakukan penelitian lanjutan tentang pengaruh suplementasi fitosterol pada perubahan kondisi organ baik secara fisiologis maupun histologis.
2. Dilakukan penelitian lanjutan tentang pengaruh suplementasi fitosterol pada berat badan, histologis dan fisiologis organ, profil lemak dan pembentukan sel busa pada kondisi terapi akut (2 minggu) dan kronik (3 bulan) pada tikus pasca diet atherogenik.
3. Dilakukan penelitian lanjutan tentang peran suplementasi fitosterol pada pencegahan atherosklerosis pada tikus dengan diet atherogenik.
4. Dilakukan penelitian lanjutan tentang isolasi dan pemeriksaan kadar apolipoprotein B baik B-48 atau B-100 pada berbagai kondisi baik pada hewan coba atau manusia dengan berbagai metode yang memungkinkan.
5. Dilakukan penelitian lanjutan baik *in vitro* maupun *in vivo* mengenai peran proses eliminasi fitosterol dan rendahnya kadar kolesterol pada *efflux* kolesterol makrofag dan jaringan.
6. Dilakukan penelitian tentang peran fitosterol dalam bentuk *functional food* atau buah/sayur/bahan kaya fitosterol pada profil lemak dan pembentukan atherosklerosis.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Assmann G., Cullen P., Jossa F., Lewis B., dan Mancini M. 1999. Coronary heart disease: reducing the risk. The scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease a worldwide view. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 19: 1819-1824.
- [2] Stone N.J., Nicolosi R.J., Kris-Etherton P., Ernst N.D., Krauss R.M., and Winston M. 1996. Summary of the scientific conference on the efficacy of hypocholesterolemic dietary interventions. *Circulation*. 94: 3388-3391.
- [3] Gylling H. dan Miettinen T.A. 2001. A review of clinical trials in dietary inter-ventions to decrease the incidence of coronary artery disease. *Curr. Control Trials Cardiovasc. Med*. 2:123-128.
- [4] Denke M.A. 2002. Dietary prescriptions to control dyslipidemias. *Circulation*. 105:132-135.
- [5] Krauss R.M., Eckel R.H., Howard B., Appel L.J., Daniels S.R., Deckelbaum R.J., Erdman Jr. J.W., Kris-Etherton P., Goldberg I.J., Kotchen T.A., Lichtenstein A.H., Mitch W.E., Mullis R., Robinson K., Wylie-Rosett J., St. Jeor S., Suttie J., Tribble D.L., dan Bazzare T.L. 2000. AHA dietary guidelines, revision 2000: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation*. 31: 2284-2299.
- [6] American Diabetes Association. 2002. Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. *Diabetes Care*. 25 (1): 202-212.
- [7] Nes WD., Song Z., Dennis A.L., Zhou W., Nam J., dan Miller M.B. 2003. Biosynthesis of phytosterols. Kinetic mechanism for the enzymatic C-methylation of sterols. *Journal Biology Chemistry*. 278 (36): 34505-34516.
- [8] Betts H., dan Moore I. 2003. Plant cell Polarity: the ins-and-outs of sterol transport. *Current Biology*. 13 (19): R781-R783.
- [9] Gräsman K. 2004. The cholesterol lowering effect of phytosterols and stanols. <http://www.lmv.slu.se/lmk/courses/HN%20projarb%202004/phytosteroler.pdf>.
- [10] Howard B.V., dan Kritchevsky D. 1997. Phyto-chemicals and cardiovascular disease. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 95: 2591-2593.
- [11] von Bergmann K. dan Lutjohann D. 1998. Review of the absorbtion and safety of plant sterols. Postgraduate Medicine Special Report: New Development in the Management of High Cholesterol. 54-59.
- [12] Cater N.B. dan Grundy S.M. 1998. Lowering serum cholesterol with plant sterols and stanols: historical perspective. In: Nguyen T.T. (Ed.) New Developments in the Dietary Management of High Cholesterol. Mc Graw Hill. Minneapolis. 6-14.
- [13] Mensink R.P. dan Plat J. 1998. Efficacy of dietary plant stanols. In: Post Graduate Medicine Special Report, Managing High Cholesterol: new development in the dietary management of high cholesterol. Mayo Clinic, Rochester, Minnesota. 27-31.
- [14] Tomoyori H., Kawata Y., Higuchi T., Ichi I., Sato H., Sato M., Ikeda I., dan Imaizumi. 2004. Phytosterol oxidation products are absorbed in the intestinal lymphatics in rats but do not accelerate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Nutr*. 134: 1690-1696
- [15] Berger A., Jones P.H.J., dan Abumweis S.S. 2004. Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipid in health disease*, 3.
- [16] Lichtenstein A.H., dan Deckelbaum R.J. 2001. Stanol/sterol ester-containing foods and blood cholesterol levels. A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism of The American Heart Association. *Circulation*. 103:1177-1179.
- [17] Normén L.A., Dutta P., Lia A., dan Anderson H. 2000. Soy sterol ester and β -Sitostenol ester as inhibitors of cholesterol absorbtion in human small bowel. *Am. J. Clin. Nutr*. 71:908-913
- [18] Nissein M., Gylling H., Vuoristo M., dan Miettinen T.A. 2002. Michellar distribution of cholesterol and phytosterols after duodenal plant stanol ester infusion. *Am. J.*

- Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 282: G1009-G1015
- [19] Ostlund R.E. jr., Spilburg C.A., dan Stenson W.F. 1999. Sitostanol administered in Lecithin Michelles potently reduces cholesterol absorbtion in human. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 826-831
- [20] Ramaswamy M., Yau E., Wasan K.M., Boulanger K.D., Li M., dan Pritchard P.H. 2002. Influence of phytostanol phosphoryl ascorbate, FM-VP4, on pancreatic lipase activity and cholesterol accumulation within CaCo2 Cells. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 5 (1): 29-38.
- [21] Hicks K.B., dan Moreau R.A. 2001. Phytosterols and phytostanols: functional food cholesterol busters. *Food Tech.* 55 (1).
- [22] Volger O.L., van der Boom H., de Wit E.C.M., van Duyvenvoorde W., Hornstra G., Plat J., Havekes L.M., Mensink R.P., dan Princen H.M.G. 2001. Dietary plant sterol esters reduce VLDL cholesterol secretion and bile saturation in apolipoprotein E*3-leiden transgenic mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 21:1046-1052.
- [23] Moghadasian M.H., Mcmanus B.M., Godin D.V., Rodrigues B., dan Frohlich J.J. 1999. Proatherogenic and antiatherogenic effects of probucol and phytosterols in apolipoprotein E- deficient mice: a possible mechanism of action. *Circulation.* 99: 1733-1739.
- [24] Gylling H., danMiettinen T.A. 2001. A Review of Clinical Trials in Dietary Interventions to Decrease the Incidence of Coronary Artery Disease. *Curr. Control Trials Cardiovasc. Med.* 2: 123-128.
- [25] Jones P.J.H., Ntanos F.Y., Raeni-Sarjaz M., dan Vanstone C.A. 1999. Cholesterol-lowering efficacy of sitostanol-containing phyto-sterol mixture with a prudent diet in hyperlipidemic men. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 69: 1144-1150.
- [26] Vuorio A.F., Gylling H., Turtola H., Kontula K., Ketonen P., dan Miettinen T.A. 2000. Stanol ester margarine alone and with simvastatin lowers serum cholesterol in families with familial hypercholesterolemia caused by the FH-North Karelia mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 500-506.
- [27] Gylling H., Radhakrishnan R., dan Miettinen T.A. 1997. Reduction of serum cholesterol in post menopausal women with previous myocardial infraction and cholesterol malabsorbtion induced by dietary sitostanol ester margarine. *Circulation.* 96: 4226-4231.
- [28] Gylling H. dan Miettinen T.A. 1998. Efficacy of plant stanol ester in lowering cholesterol in menopausal woman and patients with diabetes. In: T.T. Ngunyen (Ed.) New developments in the dietary management of high cholesterol. Mc Graw Hill. Minneapolis. 39-43.
- [29] Devaraj S., Jialal I., dan Vega-López S. 2004. Plant sterol-fortified orange juice effectively lowers cholesterol levels in mildly hypercholesterolemic healthy individuals. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 24: e25-e28.
- [30] Hallikaine, M.A. dan Uusitupa M.I.J. 1999. Effect of 2 low-fat stanol ester-containing margarines on serum cholesterol as part of a low fat diet in hypercholesterolemic subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 69: 403-410.
- [31] Miettinen T.A., Puska P., Gylling H., Vanhanen H., dan Vartiainen E. 1995. Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in mildly hypercholesterolemic population. *The New England Journal of Medicine.* 333: 1308-1312.
- [32] De Graaf J., Nolting P.R.W., Van Dam M., Belsey E.M., dan Kastelein J.J.P. 2002. Consumption of tall oil-derived phytosterols in chocolate matrix significantly decreases plasma total and low-density lipoprotein-cholesterol levels. *British Journal of Nutrition.* 88(5): 479-488.
- [33] Davidson M.H., Maki K.C., Umporowics D.M., Ingram K.A., Dicklin M.R. , Schaefer E., Lane R.W., McNama-ra J.R., Ribaya-Mercado J.D., Perrone G., Robins S.J., dan Franke W.C. 2001. Safety and tolerability of esterified phytosterols administered in reduced-fat spread and salad dressing to healthy adult men and women. *The Journal of the American College of Nutrition.* 20 (4): 307-319.
- [34] During A., Combe N., Mezette S., dan Entressangles B.B. 2000. Effects on cholesterol balance and LDL cholesterol in the rat soft-ripened cheese containing

- vegetable oil. *The Journal of the American College of Nutrition*. 19 (4): 458-466.
- [35] Hallikainen M.A., Sarkkinen E.S., dan Uusitupa M.I.J. 2000. Plant stanol esters affect serum cholesterol concentrations of Hypercholesterolemic men and woman in dose-dependent manner. *J. Nutr.* 130:767-776.
- [36] Mayes P.A. 1997. Pengangkutan dan penyimpanan lipid. In: Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., dan Rodwell VW. (Eds.). *Biokimia Harper*. Santoso A.H. (Transl.) Penerbit Buku Kedokteran EGG. Jakarta. 260-276.
- [37] Ginsberg H.N. 2002. New perspectives on atherogenesis. role of abnormal triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Circulation*. 106: 2137-2142.
- [38] Brinton E.A., Nanjee M.N., dan Hopkins P.N. 2004. Triglyceride-rich lipoprotein remnant levels and metabolism. Time to adopt these orphan risk factors? *Journal of the American College of Cardiology*. 43 (12): 2233-2235.
- [39] Grundy S.M. 2002. Low-density lipoprotein, non-high-density lipoprotein, and apolipoprotein B as targets of lipid-lowering therapy. *Circulation*. 106: 2526-2529.
- [40] Davis R.A. 1999. Cell and molecular biology of assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoprotein by the liver. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1440: 1-31.
- [41] Vinient M.M., Pierotti V., Newland D., Cham C.M., Sanan D.A., Walzem R.L., dan Young S.G. 1997. Susceptibility to Atherosclerosis in mice expressing exclusively Apolipoprotein B48 or Apolipoprotein B100. *J. Clin. Invest.* 100:180-188.
- [42] Vinient M.M., Zlot C.H., Walzem R.L., Pierotti V., Driscoll R., Dichek D., Herz J., dan Young S.G. 1998. Lipoprotein clearance mechanism in LDL receptor-deficient "ApoB-48-only" and "Apo-B100-only" mice. *J. Clin. Invest.* 102:1559-1568.
- [43] Welty F.K., Lichtenstein A.H., Barret P.H.R., Dolnikowski G.G., dan Schaefer E.J. 1999. Human Apolipoprotein (apo) B-48 and Apo B-100 kinetics with stable isotopes. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 19: 2966-2974.
- [44] Rajaratnam R.A., Gylling H., dan Miettinen T.A. 1999. Impaired post prandial clearance of squalene and Apolipoprotein B-48 in post-menopausal woman with coronary artery disease. *Clinical Science*. 97:183-192
- [45] Ghosh M.N. 1971. Common laboratory animals. In Ghosh M.N. (Ed.) *Fundamentals of experimental pharmacology*. Scientific Book Agency. Calcutta. 1-9.
- [46] Ali M., Muliarta I.K.G., dan Muwarni S. 2001. Vaksinasi LDL yang dioksidasi pada Atherosclerosis fase awal. Universitas Brawijaya Malang.
- [47] Ballantyne D.J., Chan H.Y., dan Kouritzin M.A., 2000. A novel branching particle method for tracking. *Signal and Data Processing of Small Targets*. In: Drummond O.E. (Ed.), *Proceedings of SPIE, Orlando, FL*. 4048: 277-287.
- [48] Koss L.G. 1992. *Diagnostic cytology and its histopathologic bases, Vol 2, 4th Ed.* JB Lippincott Company. Philadelphia. 1492-1501.
- [49] Soini Y., Pääkkö P., dan Lehto V.P. 1998. Histo-pathological Evaluation of apoptosis in cancer. *American Journal of Pathology*. 153 (4): 1041-1053.
- [50] Sugano M., Kamo F., Ikeda I., and Morioka H. 1976. Lipid lowering activity of Phytosterols in rats. *Atherosclerosis*. 24 (1): 301-309.
- [51] Laraki L., Pelletier X., dan Debry G. 1991. Effects of dietary cholesterol and Phytosterol overload on wistar rat plasma lipids. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 35(4): 221-5.
- [52] Plat J. dan Mensink R.P. 2002. Increased intestinal ABCA1 expression contributes to decrease in cholesterol absorption after plant sterol consumption. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 16: 1248-1253.
- [53] Wasan K.M., Najafi S., Wong J., dan Kwong M. 2001. Assessing plasma lipid levels, body weight, and hepatic and renal toxicity following chronic oral administration of water soluble Phyto-stanol compound, FM-VP4, to Gerbils. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 4(3):228-234.
- [54] Robins S.J. dan Fasulo J.M. 1997. High density lipoprotein, but not other lipoprotein, provide a vehicle for Sterol transport to Bile. *The Journal of Clinical Investigation*. 99: 380-384.
- [55] Watts F.G., Chan D.C.F., Barret P.H.R., Martin I.J., dan Redgrave T.G. 2001.

- Preliminary experience with new stable Isotope BREATH Test for Chylomicron remnant metabolism: a study in Central Obesity. *Clinical Science*. 101: 683-690.
- [56] Parks E.J. 2001. Recent findings in the study of Post Prandial Lipemia. *Current Atherosclerosis Reports*. 3: 462-470.
- [57] Sniderman A.D., Scantlebury T., dan Cianflone K. 2001. Hypertriglyceridemic Hyper-apoB: The unappreciated Atherogenic Dyslipoproteinemia in Type 2 Diabetes Mellitus. *Annals of Internal Medicine*. 135: 447-459.
- [58] Mindham M.A. dan Mayes P.A. 1992. A simple and rapid methods for preparation of Lipoprotein for electrophoresis. *The Journal of Lipid Research*. 33: 1084-1088.
- [59] Bergeron N. dan Havel R.J. 1995. Influence of diets rich in saturated and Omega-6 polyunsaturated fatty acids on Postprandial response of Apolipoprotein B-48, B-100, E, and Lipids In Triglyceride-Rich-Lipoprotein. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol*. 15:2111-2121.
- [60] Martins L.J., Mortimer B.C., dan Redgrave T.G. 1997. Effect of ACAT inhibitor CL277,082 on Apolipoprotein B-48 Transport in Mesenteric Lymph and on Plasma Clearance of Chylomicrons and Remnants. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 17: 211-216.
- [61] Vinient M.M., Zlot C.H., Walzem R.L., Pierotti V., Driscoll R., Dichek D., Herz J., dan Young S.G. 1998. Lipoprotein clearance mechanism in LDL Receptor-Deficient "ApoB-48-only" and "Apo-B100-only" mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 102: 1559-1568.
- [62] Moghadasian M.H., McManus B.M., Pritchard P.H., dan Frohlich J.J. 1997. "Tall-oil"-Derived Phytosterols reduce Atherosclerosis in ApoE-Deficient mice. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol*. 17:119-126.
- [63] Wittenburg H. dan Carey M.C. 2002. Biliary cholesterol secretion by the Twinned Sterol Half Transporters ABCG5 and ABCG8. *Journal of Clinical Investigation*. 110: 605-609.
- [64] Repa J.J., Turley S.D., Lobaccaro J.M.A., Medina J., Li L., Lustig K., Shan B., Heyman R.A., Dietschy J.M., dan Mangelsdorf. 2000. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR Heterodimer. *Science*. 289:1524-1529
- [65] Repa J.J. dan D.J. Mangelsdorf. 2002. The liver X Receptor Gene Team: potential new players in Atherosclerosis. *Nature Medicine*. 8 (11): 1243-1248
- [66] Kaneko E., Matsuda M., Yamada Y., Tachibana Y., Shimomura I., dan Makishima M. 2003. Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters By a Phytosterol-derived Liver X Receptor Agonist. *The Journal Biological Chemistry*. 278 (38): 36091-36098.

Efek Konsentrasi Sublethal Fenol Terhadap *Total Haemocyte Count* (THC) dan Histologi Insang Kepiting Bakau (*Scylla serata*)

Alfi Hermawati Waskita Sari^{1*}, Yenny Risjani¹, Agung Pramana Warih Mahendra²

¹Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya

²Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

Abstrak

Hadirnya fenol yang melebihi batas ambang ke dalam ekosistem perairan dapat menjadi *stresor* kimia bagi organisme akuatik, termasuk juga bagi ekosistem muara oleh karena muara (estuarina) merupakan daerah pertemuan antara air tawar dari perairan sungai dan air laut sehingga berpotensi mengandung bahan kimia antropogenik. Kepiting bakau (*Scylla spp.*) memiliki siklus hidup yang sebagian besar berada pada ekosistem mangrove dan umum digunakan dalam studi ekotoksitas. *Total Haemocyte Count* (THC) dan histologi organ insang dapat menginformasikan perubahan histologi akibat stressor oleh karena paparan toksik, terutama fenol. Perlakuan sublethal fenol dengan konsentrasi yang berbeda terhadap kepiting bakau (*Scylla serata*) pada hari ke-1, hari ke-3, hari ke-5 dan hari ke-8 tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) (Lampiran) terhadap rata-rata *Total Haemocyte Count* (THC). Namun pada hari ke-7 menunjukkan penurunan jumlah THC pada tiap perlakuan bila dibandingkan dengan kontrol (tanpa perlakuan). Perubahan histologi yang terjadi meningkat sebanding dengan konsentrasi fenol yang diperlakukan terhadap kepiting bakau (*S. serata*). Perubahan histologi yang terjadi adalah kerusakan struktur dari lamela insang (I) dan bagian terluar sinus lamela atau *outer lamellar sinuses* (ols) yang meliputi infiltrasi hemosit, hiperplasia maupun nekrosis.

Kata Kunci : fenol, hepatopankreas, kepiting bakau.

Abstract

The presence of phenols which exceeds the threshold into the aquatic ecosystem can be a chemical stressors to aquatic organisms, as well as for estuarine ecosystems because of the estuary (estuary) is a regional meeting between fresh water from sea water and river waters contain chemicals, so the potential anthropogenic. Mud crab (*Scylla spp.*) Has a life cycle that are mostly located in the mangrove ecosystem and commonly used in ecotoxicity studies. *Total Haemocyte Count* (THC) and gill histology of organs can inform the histological changes caused by due to exposure to toxic stressors, especially phenol. Sublethal treatment with different concentrations of phenol of mangrove crab (*S. serata*) on day 1, day 3, day 5 and day 8 there were no significant differences ($p > 0.05$) (Appendix) to the average amount of THC (Total Haemocyte Count). However, on day 7 showed a decrease of THC in each treatment when compared with controls (without treatment). Histological changes that occur increases with the concentration of phenol is treated to mud crab (*S. serata*). Histological changes that occur is damage to the structure of the gills lamela (I) and the outer portion of an outer lamellar sinus or sinuses lamela (OLS), which includes hemosit infiltration, hyperplasia and necrosis.

Keywords: crab, gill crab, haemocytes, hemocyte infiltration, hyperplasia, necrosis, *Scylla serata*, THC (Total Haemocyte Count).

PENDAHULUAN

Fenol dan senyawa fenolik merupakan salah satu xenobiotik yang menjadi salah satu faktor stres lingkungan pada biota yang terpapar dan telah menjadi masalah lingkungan akibat dampak antropogenik pada lingkungan yang ditimbulkannya [1]. Fenol memiliki tingkat bioakumulasi yang cukup tinggi sepanjang rantai makanan, sehingga pencemaran fenol menyaji-kan ancaman tidak

hanya terhadap lingkungan alam namun juga untuk kesehatan manusia [2]. Disamping itu, fenol dan turunan fenolik termasuk dalam salah satu bahan kimia berbahaya dalam ekosistem perairan yang berpotensi sebagai *Endocrine Distrupting Chemical* (EDC) dan juga termasuk dalam daftar polutan prioritas *Environmental Protection Agency* (EPA) oleh karena kehadiran senyawa tersebut pada hewan air dan daerah terrestrial [3].

Fenol dan senyawanya dapat menjadi salah satu bahan pencemar air yang masuk ke alam dan masuk ke dalam perairan melalui limbah cair dari berbagai industri antara lain seperti batubara, manufaktur fenol, farmasi, resin, cat,

* Alamat korespondensi:

Agung Pramana Warih Mahendra

email : agung_pramana@ub.ac.id

Alamat : Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Jl. Veteran,
Malang, 65145

tekstil, kulit, petrokimia, *pulpmill* [4], limbah fenol juga dapat berasal dari pestisida non spesifik, herbisida, bakterisida dan fungisida [5] maupun berasal dari berbagai proses industri yang digunakan pada gasifikasi batubara dan kilang minyak [4]. Senyawa fenol dapat dikatakan aman bagi lingkungan jika konsentrasinya berkisar antara 0,5-1,0 mg.L⁻¹ sesuai dengan KEP No. 51/MENLH/10/1995. Sedangkan baku mutu yang sesuai dengan ketentuan PP 82/2001, Sungai Kelas III, besarnya konsentrasi fenol maksimum yang diperbolehkan adalah 0,001 mg.L⁻¹ [6]. Hadirnya fenol yang melebihi batas ambang ke dalam ekosistem perairan dapat menjadi *stressor* kimia bagi organisme akuatik, termasuk juga bagi ekosistem muara oleh karena muara (estuaria) merupakan daerah pertemuan antara air tawar dari perairan sungai dan air laut sehingga berpotensi mengandung bahan kimia antropogenik termasuk bagi kepiting bakau yang hidup di lingkungan muara atau estuaria [7].

Kepiting bakau (*Scylla serata*) kaya akan rasa, nilai gizi, memiliki ukuran yang lebih besar, harga satuan yang tinggi, serta permintaan yang besar di pasar lokal maupun ekspor. Selain memiliki potensi yang tinggi dari segi ekonomi, kepiting bakau (*S. serata*) juga memiliki peranan penting dari segi ekologi, terutama di daerah muara yang menjadi habitatnya. Pertumbuhan dan perkembangan kepiting bakau terdiri dari serangkaian siklus hidup atau tahapan yakni larva, remaja, dan dewasa. Terjadinya berbagai perubahan morfologi dan perilaku serta fisiologis dimana dalam serangkaian prosesnya sebagian besar terjadi pada daerah muara [8]. Namun, informasi tentang toksisitas fenol pada organisme perairan estuaria masih terbatas [4] terutama pada spesies kepiting. Oleh karena itu, sangat penting untuk mempelajari risiko yang ditimbulkan oleh polutan pada kepiting bakau [8].

Kepiting bakau merupakan invertebrata yang umum digunakan dalam studi ekotoksitas polutan dengan berbagai alasan berikut: (1) memiliki distribusi luas di lingkungan muara yang dimanfaatkan sebagai daerah pembibitan untuk pakan, pertumbuhan dan perkembangan (2) bersifat semi pelagik di alam, (3) sensitif terhadap polutan, (4) tersedia sepanjang tahun sehingga meminimalkan kesulitan yang terlibat dalam lokasi dan pengambilan sampel di lapangan, (5) dapat diaklimasi seperti kondisi laboratorium dengan mudah [7].

Teknik hematologi juga merupakan metode umum yang dapat digunakan untuk mengetahui

efek sublethal polutan [9]. Selain itu pula, profil protein dari biota berperan dalam menanggapi kimia tertentu yang dapat digunakan sebagai protein penanda terhadap paparan kimia tertentu pada organisme terkena *stressor* kimia [10]. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menilai sejauh mana konsentrasi sublethal fenol terhadap *Total Haemocyte Count* (THC) dan *Differential Haemocyte Count* (DHC) kepiting bakau (*S. serata*), sehingga diharapkan informasi ini dapat diintegrasikan sebagai salah satu sistem peringatan dini (*early warning*) untuk memantau sejauh mana pencemaran fenol dalam perairan dalam upaya untuk menghindari dampak yang lebih jauh pada ekosistem perairan terutama estuaria dan terlebih lagi terhadap populasi manusia.

METODE PENELITIAN

Aklimasi

Sebelum uji toksisitas, kepiting bakau (*S. serata*) terlebih dahulu diaklimasikan dalam kondisi laboratorium selama 6-8 hari. Kepiting uji yang berukuran panjang 9±0,5 cm dan lebar 6±0,5 cm dengan berat rata-rata 65-75 gram dipelihara dalam aquarium kaca 40x25x20 cm dengan volume 10 liter air laut salinitas 25‰, kepadatan 10 ekor kepiting per aquarium [11]. Aklimasi tersebut di kondisi laboratorium yang terkendali dengan aerasi konstan [12]. Kepiting bakau diberi pakan dengan moluska dan udang sekali sehari. Pengisian air dilakukan secara rutin setiap 24 jam untuk menghindari residu toksisitas. Suhu, salinitas dan derajat keasaman (pH) dimonitor secara rutin demikian juga dengan oksigen terlarut (DO). Fotoperiodik 12 jam gelap dan 12 jam terang juga diberikan. Kondisi pasang surut disimulasikan di laboratorium dengan meningkatkan dan menurunkan tingkatan air di dalam setiap durasi 12 jam [13].

Uji Toksisitas Fenol

Setelah aklimasi dengan kondisi laboratorium, uji toksisitas dilakukan untuk menentukan konsentrasi median (LC₅₀) fenol pada kepiting bakau (*S. serata*). Penentuan LC₅₀ dilakukan untuk mendapatkan nilai ambang batas konsentrasi median toksisitas fenol pada kepiting bakau. Masing-masing kepiting bakau dibagi menjadi beberapa kelompok dan setiap kelompok berisi 10 kepiting dalam kaca aquarium berisi air laut salinitas 22‰, dalam tiga kali replikasi. Larutan stok, dibuat konsentrasi fenol yang diinginkan untuk menentukan toksisitas

kepiting bakau. Selama uji toksisitas berlangsung, tidak dilakukan pemberian pakan [11]. Kepiting secara rutin diperiksa mortalitas-nya. Kepiting yang mengalami kematian langsung dibuang untuk menghindari toksisitas tambahan dan kualitas air yang jelek [14]. Data mortalitas diolah dengan regresi linier ($Y=a+bx$) untuk mendapatkan nilai LC_{50} (96 jam). Selama perlakuan percobaan, wadah uji ditutupi oleh tutup untuk mencegah pengeringan lewat atmosfer [14].

Pengamatan Hemosit THC

Hemolymph kepiting bakau yang dikumpulkan secara aseptik dari membran *arthrodial* proksimal pada dasar kaki jalan kedua kanan dari kepiting menggunakan jarum suntik 26 gauge ukuran 1 ml dengan menggunakan sodium sitrat 10% sebagai antikoagulan dengan perbandingan 1:1 (100 μ l hemosit : 100 μ l anti koagulan). Kemudian, hemosit digolongkan menggunakan kriteria sederhana dengan melihat ada atau tidak adanya butiran sitoplas dan sedikit atau banyaknya granula. Kemudian dihitung jumlah total dan jumlah diferensial hemosit [15]. *Hemolymph* diambil sebanyak 100 μ l per individu kepiting di pindahkan kedalam tabung *ependorf* yang berisi 900 μ l Tripiran *blue stain solution*. Tetesan pertama hemolimph pada *syringe* dibuang, selanjutnya *hemolimph* diteteskan pada *haemocytometer* dan dihitung jumlah selnya per ml dibawah mikroskop dengan pembesaran 40 kali. Total hemosit dihitung dengan menggunakan formulasi [16].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Toksisitas Akut LC_{50} (96 Jam) Bahan Toksik Fenol Terhadap Kepiting Bakau (*S. serata*)

Uji toksisitas akut LC_{50} (96 jam) fenol terhadap kepiting bakau (*S. serata*) dilakukan untuk menentukan *lethal concentration* 50% digunakan lima perlakuan konsentrasi yang berbeda yakni perlakuan A (16 $mg.L^{-1}$), B (32 $mg.L^{-1}$), C (64 $mg.L^{-1}$), D (128 $mg.L^{-1}$) dan kontrol (tanpa perlakuan). Pada uji toksisitas akut tersebut, persentase mortalitas kepiting bakau (*S. serata*) tertinggi adalah pada perlakuan D (100%) kemudian diikuti perlakuan C (70%), B (50%), A (40%), dan K (0%). Berdasarkan perhitungan dengan analisis probit maka dapat diketahui nilai LC_{50} (96 jam) fenol terhadap kepiting bakau (*S. serata*) adalah 26 $mg.L^{-1}$. Data perhitungan penentuan konsentrasi LC_{50} (96 jam) fenol terhadap kepiting bakau (*S. serata*)

berdasarkan analisis probit ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Perhitungan penentuan konsentrasi LC_{50} (96 jam) fenol terhadap kepiting bakau (*S. Serata*) berdasarkan analisis probit

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Persen Kematian (%)	Nilai probit
16	1,2041	40%	4,75
32	1,5051	50%	5,00
64	1,8062	70%	5,52
128	2,1072	100%	8,09

Persamaan regresi yang diperoleh dari data diatas adalah $Y= 3,5012X+0,0433$ ($r=0,8871$). Nilai LC_{50} (96 jam) diperoleh dengan cara memasukan nilai probit 5,00 (% kematian 50%) sebagai variabel Y kedalam persamaan regresi tersebut, sehingga didapatkan median konsentrasi letal 50% (LC_{50}) selama 96 jam fenol terhadap kepiting bakau (*S. serata*) sebesar 26 $mg.L^{-1}$.

Uji Toksisitas Sublethal Fenol Terhadap Kepiting Bakau (*S. serata*)

Konsentrasi perlakuan yang digunakan untuk uji toksisitas sublethal tersebut mengacu pada nilai LC_{50} -96 jam yang telah didapatkan dari uji toksisitas akut. Selama penelitian berlangsung pergantian media uji sehari sekali. Pemberian pakan kepiting bakau (*S. serata*) dilakukan 2 kali sehari, yaitu pagi dan sore. Kepadatan kepiting uji adalah lima ekor kepiting bakau (*S. serata*) per unit percobaan, yang diisi 5 liter air payau dengan salinitas sebesar 22 ppt. Parameter kualitas air yang diamati adalah, oksigen terlarut (DO), suhu dan derajat keasaman (pH) yang diamati setiap hari. Perlakuan pada uji toksisitas sublethal adalah berdasarkan nilai sublethal atau setengah nilai LC_{50} -96 jam ke seri tingkatan konsentrasi yang lebih rendah. Konsentrasi fenol yang digunakan untuk uji toksisitas sublethal selama 7 hari adalah 1/16, 1/4 dan 1/2 dari LC_{50} -96 jam. Jadi konsentrasi perlakuan pada uji toksisitas sublethal adalah sebagai berikut: kontrol (tanpa perlakuan), perlakuan A (1,62 $mg.L^{-1}$), perlakuan B (6,5 $mg.L^{-1}$), perlakuan C (13 $mg.L^{-1}$). Pengamatan yang dilakukan pada uji toksisitas sublethal adalah perhitungan total hemosit atau *Total Haemocyte Count* (THC) dan histologi organ insang kepiting bakau (*S. serata*).

Total Haemocyte Count (THC)

Hasil perhitungan *Total Haemocyte Count* (THC) kepiting bakau (*S. serata*) selama uji sublethal fenol ditampilkan pada tabel berikut.

Tabel 2. Hasil perhitungan *Total Haemocyte Count* (THC) kepiting bakau (*S. serata*) selama uji sublethal fenol

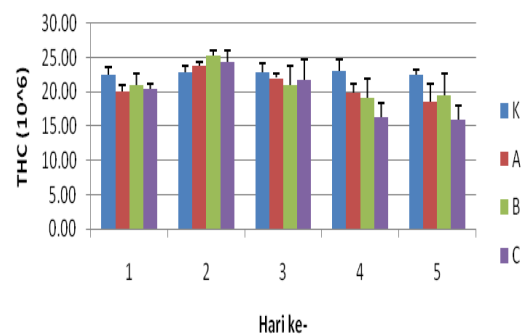
Perlakuan	Rerata THC				
	Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3	Hari ke-4	Hari ke-5
K	22,42 ± 1,13	22,92 ± 0,80	22,92 ± 1,26	23,08 ± 1,61	22,45 ± 0,82
A	20,08 ± 0,95	23,75 ± 0,66	22,00 ± 0,66	19,83 ± 1,23	18,5 ± 2,65
B	21,00 ± 1,64	25,33 ± 0,76	21,00 ± 2,75	19,08 ± 2,84	19,42 ± 3,22
C	20,42 ± 0,80	24,42 ± 1,67	21,75 ± 2,88	16,25 ± 2,05	15,92 ± 2,16

Rata-rata jumlah THC kepiting bakau (*S. serata*) pada kontrol (tanpa perlakuan) hari ke-1 sebesar $22,42 \times 10^6$ sel.mL⁻¹ dan pada hari ke-3 memiliki rata-rata jumlah THC sebesar $22,9 \times 10^6$ sel.mL⁻¹ yang juga sama dengan jumlah THC pada hari ke-5 perlakuan. Namun kemudian mengalami kenaikan jumlah THC menjadi 23×10^6 sel.mL⁻¹ pada hari ke-7 perlakuan. Pemberian konsentrasi fenol pada perlakuan A (1,62 ppm) jumlah THC pada hari ke-1 terhitung sebesar $20,08 \times 10^6$ sel.mL⁻¹, kemudian mengalami kenaikan jumlah THC pada hari ke-3 menjadi $23,75 \times 10^6$ sel.mL⁻¹, namun pada hari ke-7 perlakuan jumlah THC mengalami penurunan jumlah THC menjadi $19,83 \times 10^6$ sel.mL⁻¹. Sedangkan pada pemaparan konsentrasi sublethal fenol yang lebih tinggi, yakni perlakuan B (6,5 ppm) menunjukkan jumlah THC pada hari-1 perlakuan sebesar 21×10^6 sel.mL⁻¹, kemudian mengalami peningkatan pada hari ke-3 dengan jumlah THC sebesar $25,33 \times 10^6$ sel.mL⁻¹.

Sedangkan pada hari ke-5 total hemosit kepiting bakau (*S. serata*) pada perlakuan B (6,5 ppm) menjadi 21×10^6 sel.mL⁻¹ yang berarti mengalami penurunan bila dibandingkan dengan jumlah THC pada perlakuan hari ke-3 dan pada hari ke-7 jumlah THC mengalami penurunan menjadi 19×10^6 sel.mL⁻¹. Sedangkan pada pemberian konsentrasi fenol tertinggi yakni perlakuan C (13 ppm) jumlah THC pada hari ke-3 mengalami peningkatan dibandingkan dengan hari ke-1. Namun sebaliknya, pada hari ke-5 mengalami penurunan jumlah THC menjadi 21×10^6 sel.mL⁻¹, kemudian menjadi semakin turun pada hari ke-7 perlakuan yakni menjadi $16,25 \times 10^6$ sel.mL⁻¹.

Berdasarkan hasil analisa ragam (ANOVA) dari pengolahan data hasil penelitian dengan bantuan SPSS 17, menunjukkan bahwa yang berpengaruh nyata hanya perlakuan konsentrasi sublethal fenol pada hari ke-7, jadi yang diuji lanjut hanya perlakuan pada hari ke-7. Sedangkan perlakuan

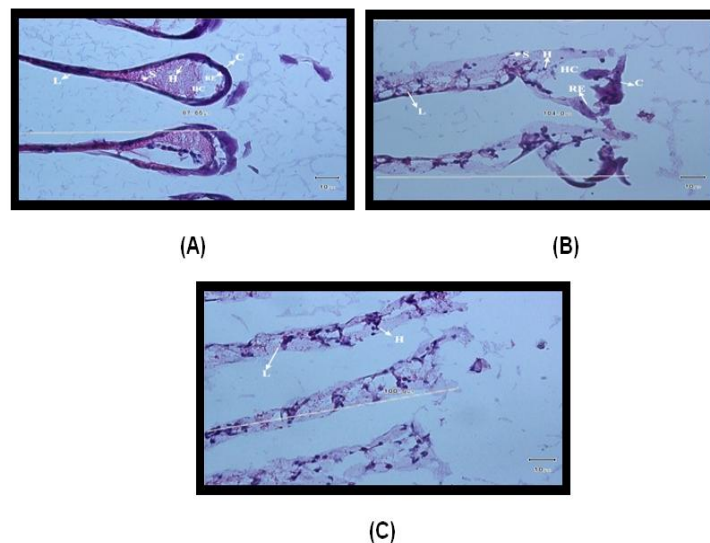
sublethal fenol dengan konsentrasi yang berbeda yang diperlakukan pada kepiting bakau (*S. serata*) pada hari ke-1, hari ke-3, hari ke-5 dan hari ke-8 tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) (Lampiran) terhadap rata-rata jumlah THC. Namun pada perlakuan A ($1,62 \text{ mg.L}^{-1}$), B ($6,5 \text{ mg.L}^{-1}$) dan C (13 mg.L^{-1}) pada hari ke-3 perlakuan menunjukkan peningkatan jumlah THC bila dibandingkan dengan kontrol (tanpa perlakuan). Grafik THC pada tiap konsentrasi perlakuan selama uji sublethal fenol ditunjukkan pada gambar berikut.



Gambar 1. THC (*Total Haemocyte Count*) kepiting bakau (*S. serata*) pada awal hingga akhir perlakuan Uji Sublethal Fenol

Histologi Insang Kepiting Bakau (*S. serata*)

Berdasarkan hasil pengamatan, perlakuan A ($1,62 \text{ mg.L}^{-1}$) terlihat bagian lamela insang tampak sudah mulai mengalami kerusakan epitel. Selain itu, *haemocoels* (Hc) menjadi lebih besar dengan lebih banyak hemosit dan tampak tidak teratur saat diperbesar, makin jelas terlihat pada perlakuan konsentrasi sublethal fenol perlakuan B ($6,5 \text{ mg.L}^{-1}$) (Gambar 2b) dan C (13 mg.L^{-1}) (Gambar 2c). Hal tersebut dicirikan oleh bentuk *outer lamela sinus* (ols) yang nampak tidak beraturan dan pada beberapa insang cabang terjadi fusi lamela serta adanya infiltrasi hemosit.



Gambar 2. Lamela insang yang menunjukkan lesi epitel dan infiltrasi hemosit pada masing-masing perlakuan konsentrasi sublethal fenol (H: hemocyte; HC: haemocoel; L: lamella; C: cuticule)

Sel hemosit merupakan sel-sel darah yang beredar pada invertebrata yang merupakan efektor imun utama yang melakukan fungsi imunologi beragam termasuk fagositosis, generasi molekul sitotoksik dibawah paparan racun dan juga termasuk pemeliharaan homeostasis serta bertanggung jawab dalam berbagai mekanisme perlindungan [11]. Jumlah THC diyakini mempengaruhi kemampuan organisme untuk bereaksi melawan bahan asing [17] dan berbagai respon terhadap infeksi, perubahan lingkungan pada sebagian besar *crustacea* [18]. Namun pada spesies dekapoda krustasea, jumlah hemosit yang berkaitan dengan pertahanan seluler bervariasi diantara spesies satu dengan yang lainnya [19].

Kelimpahan hemosit yang beredar pada dasarnya dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah jenis kelamin, *molting*, status reproduksi dan nutrisi, ukuran, seks, dan berat badan. Selain itu pula, juga karena faktor musim. Sebagai contoh yakni spesies dari kelas krustasea lainnya, seperti udang galah (*M. rosenbergii*) menunjukkan jumlah THC tertinggi dan terendah di musim gugur dan musim dingin, masing-masing. Namun tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara jantan maupun betina [20]. Sedangkan faktor - faktor ekstrinsik seperti suhu, salinitas dan oksigen terlarut juga dilaporkan dapat mempengaruhi jumlah THC (*Total Haemocyte Count*) beberapa spesies dekapoda krustasea [20, 21]. Hasil studi pada udang *Penaeus stylirostris* pada suhu rendah sebesar 18°C terjadi penurunan yang signifikan terhadap

jumlah THC sebesar 40% dibandingkan dengan udang yang dipelihara pada suhu 27°C [22].

Selain itu, faktor hipoksia juga dapat menjadi penyebab penurunan jumlah THC. Faktor hipoksia secara signifikan juga dapat menurunkan jumlah THC, seperti pada spesies udang *P. Stylirostris*. Konsisi hipoksia tersebut menyebabkan menjadi stres dan rentan terhadap infeksi *Vibrio alginolyticus* [21]. Jumlah THC udang putih terinfeksi *Taura Syndrom Virus* (TSV) menurun 79%. Jumlah THC pada spesies udang windu *Penaeus monodon* dan *Penaeus japonicus* yang terinfeksi *White Spot Syndrom Virus* (WSSV) juga menunjukkan penurunan secara signifikan [23]. Sedangkan peningkatan suhu dari 10-20°C dan 18-32°C juga memicu peningkatan jumlah THC dari *Carcinus maenas* [24]. Sedangkan untuk faktor salinitas, pada spesies udang *Penaeus paulensis* Brasil yang dipelihara pada salinitas 34‰ memiliki jumlah THC secara signifikan lebih tinggi (20% lebih) dari udang yang dipelihara pada 13-22‰ [22]. Sedangkan penurunan jumlah THC oleh karena pengaruh oksigen terlarut (DO) pada udang *P. stylirostris* dengan pemeliharaan pada oksigen terlarut terendah sebesar 1 mg.L⁻¹ selama 24 jam [21].

Selain jumlah total hemosit (THC), pengamatan histologi juga merupakan hal penting untuk melihat sejauh mana pengaruh stressor bahan toksik fenol terhadap keping bakau (*S. serata*). Insang merupakan organ vital yang memainkan peran penting dalam transportasi pernapasan gas dan regulasi keseimbangan osmotik dan ion pada organisme akuatik. termasuk juga pada spesies keping

bakau (*S. serata*). Osmoregulasi merupakan salah satu hal yang paling penting dalam menunjang fungsi regulasi hewan akuatik, terutama pada kelas krustasea [25]. Seperti halnya pada spesies kepiting biru *C. sapidus*, kepiting ini dapat mempertahankan osmolaritas *hemolymph* meskipun berada dalam kondisi salinitas tinggi dan rendah dengan aktif memompa ion melalui insang [26] terutama bagian posterior insang merupakan situs utama untuk transpor ion dan menunjukkan aktivitas enzim yang lebih tinggi serta berperan dalam mekanisme transportasi ion dan memiliki lebih kaya akan mitokondria pada anterior sel-sel dari insang yang dianggap sebagai situs utama pernapasan, menunjukkan gerakan pasif Na^+ [27].

Paparan zat beracun termasuk fenol dapat merusak jaringan insang, sehingga hal ini dapat mengurangi konsumsi oksigen dan mengganggu fungsi osmoregulasi organisme air. Keadaan patologis insang yang semakin parah akibat paparan zat beracun dapat menyebabkan gangguan pernapasan dan akhirnya menyebabkan kematian organisme tersebut [28]. Pemaparan logam berat merkuri klorida udang air tawar *Macrobrachium* menunjukkan pembesaran lamela insang dengan peningkatan hemosit [29].

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Abdel-Hameid N.A.H. 2007. Physiological and Histopathological Alterations Induced by Phenol Exposure in *Oreochromis aureus* Juveniles. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 7: 131-138.
- [2] Hori, T.S.F., Avilez, I.M., Inoue, L.K. dan Moraes, G. 2006. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in *Brycon cephalus* (teleostei: characidae) juveniles. *Comp. Biochem. Physiol.*, 143(1): 67-72.
- [3] Llompert M., Lourido M., Landin P., Garcia-Jares C., dan Celo R. 2002. Optimization of a derivatization-solid-phase microextraction method for the analysis of thirty phenolic pollutants in water samples. *J. Chromatogr.* 963: 137-148.
- [4] Saha N.C., Bhunia F., dan Kaviraj A. 1999. Toxicity of phenol to fish and aquatic ecosystems. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 63: 195-202
- [5] Gupta S., Dalela R.C., dan Saxena P.K. 1983. Effect of phenolic compounds on in vivo activity of transaminases in certain tissues of the fish of the fish *Notopterus notopterus*. *Environ. Res.* 32: 8-13.
- [6] Herawati N., Purwanto, dan Hadiyanto A. 2007. Analisis risiko lingkungan aliran Lumpur Lapindo ke badan air (studi kasus Sungai Porong dan Sungai Aloo Kabupaten Sidoarjo). Program Studi Magister Ilmu Lingkungan Pasca Sarjana. Universitas Diponegoro. Semarang.
- [7] Vijayavel K., Gopalakrishnan S., Thiagarajan R., dan Thilagam H. 2008. Immuno-toxic Effects of Nickel in the Mud Crab *Scylla serrata*. *Fish and Shellfish Immunology*. 26 (1): 133-139.
- [8] Vijayavel K. dan Balasubramanian M.P. 2005. Fluctuations of biochemical constituents and marker enzymes as a consequence of Naphthalene Toxicity in an Estuarine Edible Crab *Scylla serrata*. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 63: 141-147.
- [9] Larsson U., Elmgren R., dan Wulff F. 1985. Eutrophication and the Baltic Sea: Causes and consequences. *Ambio*. 14: 10-14.
- [10] Vom Saal F.S. dan Welshons W.V. 2006. Large effects from small exposures II. The importance of positive controls in low-dose research on Bisphenol A. *Environmental Research*. 100: 50-76.
- [11] Vijayavel K., Fung D.Y.C., dan Fujioka R.S. 2009. Modification of Fung Double Tube and CP anaselect oxyplate methods to improve their performance in enumerating *Clostridium perfringens* from sewage and environmental waters. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* 17: 535-549.
- [12] Saha S., Ray M., dan Ray S. 2010. Screening of phagocytosis and intrahemocytotoxicity in arsenic exposed crab as innate immune response. *Asian Journal Experimental Biological Sciences*. 1: 47-54.
- [13] Saha S., Ray M., dan Ray S. 2010. Shift in cytoarchitecture of immunocytes of mudcrab exposed to arsenic. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 1 (2): 234-246.
- [14] Saha P., Selvan V.T., Mondal S.K., Mazumder U.K., dan Gupta M. 2008. Antidiabetic and antioxidant activity of Methanol extract of *Ipomoea reptans* poir aerial parts in Streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmacologyonline*. 1: 409-421.
- [15] Yildiz H.Y. dan Atar H.H. 2002. Haemocyte classification and differential counts in the

- freshwater Crab, *Potamon fluviatilis*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 26: 403-406.
- [16] Wootton E.C., Dyrinda E.A., dan Ratcliffe N.A. 2003. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish and Shellfish Immunology*. 15(3): 195-210.
- [17] Persson M., Vey A., dan Söderhäll K. 1987. Encapsulation of foreign particles in vitro by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Cell Tissue Res*. 247: 409-415.
- [18] Tsing, A., Arcier, J. M. dan Brehélin, M. (1989). Haemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: Morphology, cytochemistry and hemograms. *J. Invert.Pathol*. 53: 64-77.
- [19] Hose J. E., Martin G.G. dan Alison S.G. 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *The Biological Bulletin*. 178: 33-45.
- [20] Cheng W. dan Chen J.C. 2001. Effect of intrinsic and extrinsic factors on the hemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol*. 11: 53-63.
- [21] Le Moullac G., Soyez C., Saulnier D., Ansquer D., Avarre J.C., dan Levy P. 1998. Effect of hypoxia stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish Shellfish Immunol*. 8: 621-629.
- [22] Le Moullac G. dan Haffner P. 2000. Environmental factors affecting immune response in crustacean. *Aquaculture*. 191: 121-131.
- [23] Le Moullac G.L., Le Groumellec M.L., Ansquer D., Froissard S., Levy P., dan Aquacop. 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the molt cycle: protection against vibriosis. *Fish Shellfish Immunol*. 7: 227-234.
- [24] Truscott R. dan White K.N. 1990. The influence of metal and temperatures stress on the immune system of crabs. *Func. Ecol*. 4: 455-461.
- [25] Chang E.S. 2005. Stressed-out lobsters: crustacean hyperglycemic hormone and stress proteins. *Integr. Comp. Biol*. 45: 43-50.
- [26] Towle D.W., Palmer G.E., dan Harris Iii J.L. 1996. Role of gill $\text{Na}^{++}\text{K}^{+}$ dependent ATPase in acclimation of blue crabs (*Callinectes sapidus*) to low salinity. *J. Exp. Zool*. 196: 315-322.
- [27] Henry R.P. 2005. Critical salinity, sensitivity, and commitment of salinity-mediated carbonic anhydrase induction in the gills of two euryhaline species of decapods crustaceans. *J. Exp. Zool*. 303A: 45-56.
- [28] Rodriguez J. dan Moullac G.L. 2000. State of the art of immunological tools and health control of Penaeid Shrimp. *Aquaculture*. 191: 109-119.
- [29] Victor B., Narayanan M., dan Nelson D. 1990. Gill pathology and hemocyte response in mercury exposed *Macrobrachium idea* (Heller). *J. Environ. Biol*. 11: 61-65.

Pengaruh Sari Seduh Teh Hitam (*Camellia sinensis*) terhadap Ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ pada Jalur MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) Jaringan Lemak Viseral Tikus Wistar dengan Diet Tinggi Lemak

Hendra Susanto^{1*}, M. Rasjad Indra², Setyawati Karyono²

¹Jurusan Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang

²Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Prevalensi obesitas meningkat di berbagai Negara Asia Pasifik, Eropa, Amerika Serikat, Australia serta di negara-negara berkembang. Perubahan preadiposit menjadi adiposit yang *mature* memegang peranan dalam patogenesis obesitas. Teh hitam memiliki komponen antioksidan yang banyak berperan dalam pengontrolan proliferasi sel. Theaflavin pada teh hitam kemungkinan dapat menghambat perubahan preadiposit menjadi *mature* adiposit, maka prevalensi terjadinya obesitas sebagai pemicu berbagai penyakit metabolik dapat dicegah sejak dini. Tujuan penelitian ini untuk membuktikan pengaruh pemberian sari seduh teh hitam (*Camellia sinensis*) terhadap pencegahan peningkatan ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ pada tikus wistar dengan diet tinggi lemak. Penelitian dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan tikus strain wistar. Tikus dibagi menjadi kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol positif diberi diet tinggi lemak tanpa sari seduh teh hitam, sedangkan kelompok perlakuan diberi diet tinggi lemak dan sari seduh teh hitam dengan dosis 0,015 g, 0,030 g dan 0,045g/hari selama 90 hari secara bersamaan. Ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ diukur secara semikuantitatif dengan menghitung intensitas warna dengan *Corell Photo Paint 11*. Skor intensitas warna ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ hasil pewarnaan imunohistokimia dianalisis secara statistik dengan One way Anova dan analisis regresi dengan taraf signifikansi $p=0,05$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sari seduh teh hitam dengan berbagai dosis (0,015 g, 0,030 g dan 0,045 g/hari) dapat mencegah peningkatan ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ secara signifikan ($p=0,000$) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Semakin besar dosis teh hitam maka ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ makin rendah. Berdasarkan analisis regresi dengan estimasi kurva logaritmik ($p<0,05$) terdapat hubungan fungsional dua arah yang kuat antara ERK1/2 dengan PPAR γ ($R=0,798$ dan $R=0,780$). Hasil penelitian ini membuktikan bahwa sari seduh teh hitam (*C. sinensis*) mampu mencegah peningkatan ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ pada tikus wistar dengan diet tinggi lemak.

Kata kunci: diet tinggi lemak, IGF-1, ERK1/2, jalur MAPK, PPAR γ , teh hitam.

Abstract

The prevalence of obesity is increasing in many countries of Asia Pacific, Europe, USA, Australia and in developing countries. Preadiposit changes into *mature* adipocytes plays essential role in the pathogenesis of obesity. Black tea has antioxidant components which majoring the role in controlling cell proliferation. Theaflavins in black tea can inhibit the possibility of pre-adipocytes change into *mature* adipocytes, thus the prevalence of obesity as a trigger of various metabolic diseases can be early prevented. The purpose of this study was to prove the effect of black tea (*Camellia sinensis*) brewed cider towards the prevention of increased expression of IGF-1, ERK1/2 and PPAR γ on wistar rat with high-fat diet. The study was conducted *in vivo* used Wistar strain rats. Rats were grouped into positive control group and the treatment group. Positive control group were given a high-fat diet without cider brewed of black tea, while the treatment group were given a high-fat diet and cider brewed of black tea with the doses of 0.015 g, 0.030 g and 0.045g/day for 90 days simultaneously. Expression of IGF-1, ERK1/2 and PPAR γ were measured semi-quantitatively by calculate the color intensity with *Corell Photo Paint 11*. Color intensity scored from expression of IGF-1, ERK1/2 and PPAR γ as the results of immunohistochemistry were analyzed statistically with One way Anova and regression with signification degree $p=0.05$. The results showed that cider brewed of black tea with various doses (0.015 g, 0.030 g and 0.045 g/day) can prevent an increase in the expression of IGF-1, ERK1/2 and PPAR γ significantly ($p=0.000$) compared to the positive control group. The greater the dose of black tea then the expression of IGF-1, ERK1/2 and PPAR γ getting lower. Based on regression analysis with the estimation of logarithmic curve ($p<0.05$), there is a functional relationship between ERK1/2 and PPAR γ ($R=0.798$ dan $R=0.780$). This study proved that the cider brewed of black tea (*C. sinensis*) able to prevent an increase in the expression of IGF-1, ERK1/2 and PPAR γ on high-fat diet wistar rat.

Keywords: high-fat diet, IGF-1, ERK1/2, MAPK pathway, PPAR γ , black tea.

PENDAHULUAN

Prevalensi obesitas meningkat di berbagai Negara Asia Pasifik, Eropa, Amerika Serikat, Australia serta di negara-negara berkembang. Obesitas baik pada dewasa maupun anak-anak menjadi pemicu berbagai penyakit seperti penyakit kardiovaskuler, diabetes dan kanker memiliki hubungan yang kuat dengan peningkatan angka kematian di berbagai negara di dunia [1]. Di Indonesia 8,1% laki-laki *overweight* dan 6,8% obesitas, 10,5% wanita *overweight* dan 13,5% obesitas [2]. Perubahan preadiposit menjadi adiposit *mature* memegang peranan pada patogenesis obesitas yang disebabkan oleh faktor genetik dan faktor lingkungan [1]. Pada kasus obesitas dan *overweight* peningkatan massa lemak dihasilkan akibat penambahan ukuran sel (*hypertrophy*) dan penambahan jumlah sel (*hyperplasia*) ataupun karena keduanya [1]. Melalui penghambatan proliferasi dan perubahan preadiposit menjadi adiposit diharapkan dapat menurunkan prevalensi obesitas serta *overweight*.

Proses adipogenesis dipicu oleh *growth signal* (sinyal pertumbuhan), salah satunya adalah *insulin like growth factor-I* (IGF-1). Adanya pengikatan IGF-1 pada reseptor permukaan membran menyebabkan fosforilasi reseptor dilanjutkan aktivasi jalur MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) [3]. IGF-1 merupakan ligand yang berperan pada sintesis insulin, faktor mitogen dan pertumbuhan sel serta juga berperan dalam diferensiasi beberapa sel termasuk preadiposit [4]. Jalur *signaling* proses adipogenesis melalui aktivasi MAPK khususnya *extracellular signal-regulated kinase* (ERKs) yang terstimulus oleh signal pertumbuhan menjadi penentu proses adipogenesis. Fosforilasi ERK1/2 akan memulai ekspresi C/EBP dan PPAR γ yang menjadi 2 faktor kunci adipogenesis [1].

Salah satu bahan yang berperan pada proses penghambatan pertumbuhan (pengontrolan proliferasi) sel adalah teh hitam (*Camellia sinensis*). Teh hitam memiliki kandungan senyawa antioksidan *theaflavin* (TF) yang terdiri dari *theaflavin* (TF₁), *theaflavin-3-gallate* (TF_{2A}), *theaflavin-3'-gallate* (TF_{2B}) dan *Theaflavin-3-3'-digallate* (TF₃) dengan memiliki kemiripan struktur kimia seperti *catechin* pada teh hijau.

Theaflavin dan *thearubigin* sebagai komponen utama teh hitam adalah hasil konversi *catechin* oleh enzim polifenol oksidase. *Theaflavin* dapat menjadi agen protektif untuk penyakit kardiovaskuler dan kanker, termasuk sebagai agen antihipertensi, antioksidatif dan aktivitas hipolipidemik [5]. Diet tinggi lemak dapat menstimulasi peningkatan proliferasi preadiposit serta ekspresi gen-gen spesifik adiposit yang terlibat dalam program adipogenik. Diet tinggi lemak menstimulasi peningkatan *release growth factor* khususnya IGF-1 yang banyak berperan dalam proliferasi dan diferensiasi preadiposit [6, 7, 8].

Sampai saat ini masih belum pernah dilaporkan secara ilmiah bahwa secara *in vivo* teh hitam dapat menghambat proses perubahan preadiposit menjadi adiposit *mature* melalui penghambatan jalur MAPK terhadap ekspresi IGF-1, ERK1/2, dan PPAR γ . Berdasarkan beberapa fakta tersebut diprediksi *theaflavin* pada teh hitam kemungkinan dapat menghambat perubahan preadiposit menjadi adiposit *mature* melalui penghambatan signaling baik pada *reseptor growth factor* IGF-1 dan PPAR γ sehingga signal transduksi untuk ekspresi gen spesifik adipogenesis dapat dihambat. Adanya proses inhibisi pada IGFR dan PPAR γ diharapkan dapat menekan prevalensi obesitas sebagai pemicu berbagai penyakit metabolik sejak dini dengan pemanfaatan teh hitam sebagai terapi. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk membuktikan pengaruh sari seduh teh hitam (*C. sinensis*) terhadap pencegahan peningkatan ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ pada tikus wistar dengan diet tinggi lemak.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini bersifat eskperimental laboratorik dengan rancangan acak lengkap (RAL) petak terbagi secara *in vivo* menggunakan model hewan coba tikus (*Rattus novergicus* strain wistar).

Perlakuan Diet Tinggi Lemak dan Pemberian Sari Seduh Teh Hitam

Tikus *R. novergicus* strain wistar jantan sejumlah 24 ekor diberi diet tinggi lemak selama 90 hari yang diperoleh dari total kolesterol, asam kolat dan minyak babi (energi=6341,35 Kal) yang diberikan dalam bentuk pakan/pelet. Pada saat bersamaan dilakukan pemberian sari seduh teh hitam (*C. sinensis*) dari daun teh kering (*Natural Exclusive Taste Black Tea, Medical Herb Centre*

* Alamat Korespondensi:

Hendra Susanto

Email : susantohendra@yahoo.com

Alamat : Jurusan Biomedik, Fakultas Kedokteran,
Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang

Yogyakarta Indonesia) dengan tiga kelompok dosis yaitu 0,015 g; 0,030 g; dan 0,045 g/hari dari konversi berat makanan tikus perhari 30 g/1000 gr pakan. Daun tanaman teh sesuai dosis diseduh dengan air mendidih 1,5 mL; 3 mL; dan 4,5 mL (volume air yang digunakan yaitu dosis g/hari x 100 ml), didiamkan 15 menit disaring dan diambil filtratnya kemudian diberikan secara peroral pada tikus perlakuan [9].

Pengambilan Jaringan Lemak Viseral

Tikus percobaan setelah memiliki surat keterangan etika penelitian dibunuh dan diambil jaringan lemak viseral (bagian omentum) menggunakan alat seksi. Kemudian sampel jaringan lemak viseral dari 4 kelompok dari masing-masing ulangan diletakkan pada cawan petri yang berisi larutan PBS. Sampel jaringan lemak kemudian diletakkan pada botol film berisi PFA (paraformaldehid) untuk proses *embedding* [10].

Proses Embedding Jaringan Lemak Viseral

Organ lemak viseral direndam dalam etanol 70% selama minimal 24 jam, dan dilanjutkan dengan etanol 80% selama 2 jam. Direndam dalam etanol 90% dan 95% secara berurutan selama masing-masing 30 menit. Dilanjutkan perendaman sebanyak 3 kali dalam etanol absolut selama 30 menit masing-masing dalam botol yang berbeda. Kemudian direndam dalam *xylo* sebanyak 2 kali masing-masing selama 30 menit. Proses selanjutnya dikerjakan dalam inkubator dengan suhu 56-58°C. Organ direndam *xylo*, kemudian ke dalam parafin sebanyak 3 kali. Dilanjutkan *embedding* dengan mencelupkan organ dalam parafin cair yang telah dituang dalam wadah. Setelah beberapa saat, parafin akan memadat dan organ berada dalam blok parafin [10].

Pewarnaan Organ dengan Metode Imunohistokimia

Setelah organ dalam blok parafin dipotong dan diletakkan pada gelas objek, dilakukan deparafinisasi dan rehidrasi dengan mencelupkan organ dalam *xylo* sebanyak 2 kali, alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%, 30%), dan akuades secara berurutan dan dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Mencuci sel 1 kali dengan PBS dilanjutkan inkubasi sel pada 3% H₂O₂ dalam PBS selama 10 menit suhu ruang, dilanjutkan mencuci sel 3 kali dengan PBS. Menginkubasi sel pada 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) selama 1 jam pada suhu ruang dan

mencuci 3 kali dengan PBS. Mengencerkan antibodi primer dalam Goat serum/FBS/BSA hingga konsentrasi dan volume yang diinginkan (Antibodi PPAR γ , ERK1/2 dan IGF-1, Santa Cruz 1:100 dalam Goat serum atau FBS). Menginkubasi sel pada antibodi primer pada suhu 4°C selama 12 jam atau pada suhu ruang selama 2 jam. Mencuci sel dalam PBS selama 3x5 menit. Mengencerkan antibodi sekunder berlabel biotin dalam PBS sampai konsentrasi dan volume yang diinginkan. (Anti Rabbit IgG berlabel Biotin, SIGMA 1:500 dalam PBS) dilanjutkan dengan menginkubasi sel dengan antibodi sekunder selama 1 jam pada suhu ruang. Mencuci sel pada PBS selama 3x5 menit. Menetesi dengan SA-HRP (*Streptavidin horseradish peroxidase*) 1:500 dalam PBS selama 40 menit. Mencuci sel dengan PBS selama 3x5 menit. Menetesi dengan DAB (*Diaminobenzidine*) selama 10 menit. Mencuci sel dengan akuades 3x5 menit dilanjutkan *counterstain* dengan *Mayer's hematoxilen* selama 10 menit. Mencuci/tetesi dengan air kran. Mencuci dengan akuades selama 10 menit dan dibiarkan pada suhu kamar. Setiap slide diberi label dan ditetesi medium *mounting* (entellan) dijatuhkan ke atas preparat. *Cover glass* ditutupkan ke atas preparat yang telah diberi *mounting* medium [11].

Penghitungan Ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ Hasil Imunohistokimia

Setelah dilakukan pewarnaan dengan teknik imunohistokimia, preparat untuk masing-masing perlakuan dan masing-masing ulangan difoto dengan fotomikroskop Merk Olympus dengan perbesaran 400x. Hasil dari pemotretan kemudian dihitung intensitas warna ekspresi dari IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ dengan software *Corell Photo Paint ver 11* dengan mengukur intensitas warna hasil pemeriksaan imunohistokimia yang dilakukan dengan memblok area yang akan diamati kemudian mencatat mean yang muncul pada histogram (semakin besar nilai intensitas warna/semakin cerah menunjukkan ekspresi yang semakin sedikit) [11].

Analisis Data

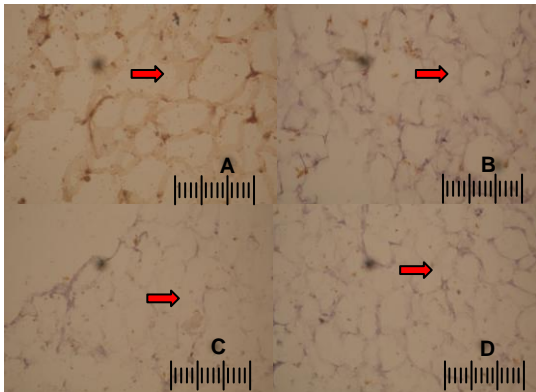
Data hasil pengukuran ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ berdasarkan intensitas warna kemudian dianalisis statistik dengan menggunakan *one way* Anova ($p < 0,05$) untuk mengetahui adanya pengaruh/perbedaan bermakna pada berbagai perlakuan. Selanjutnya dilakukan uji Tukey HSD dan LSD untuk

mengetahui perbedaan nyata antar perlakuan. Untuk mengetahui hubungan antar variabel penelitian/analisis jalur dilakukan uji regresi dengan estimasi kurva logaritmik ($p < 0,05$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Sari Seduh Teh Hitam Pada Morfologi Adiposit

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian sari seduh teh hitam menyebabkan terjadinya penurunan ukuran sel adiposit dan juga diperoleh suatu gambaran pemberian sari seduh teh hitam menyebabkan jumlah sel lemak yang terbentuk sebagai hasil proliferasi dari preadiposit meningkat. Gambaran hasil pengamatan morfologi dari adiposit jaringan lemak visceral seperti Gambar 1.



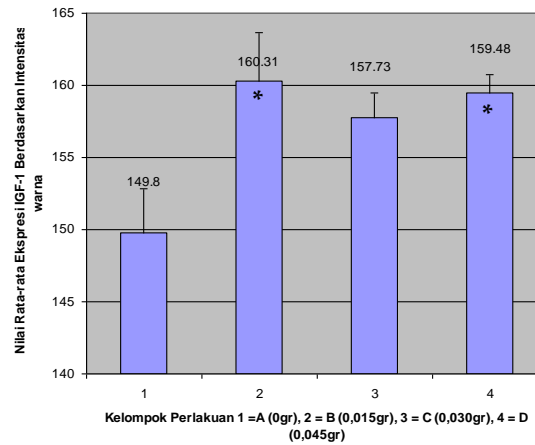
Gambar 1. Morfologi sel adiposit jaringan lemak visceral setelah perlakuan pemberian teh hitam hasil pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi anti PPAR γ . Gambar diambil dengan fotomikroskop olympus dengan perbesaran 400x. (Tanda panah menunjukkan perbandingan ukuran sel adiposit pada 4 kelompok). Keterangan: A. Kontrol; B. Perlakuan 0,015 g/hari; C. Perlakuan 0,030 g/hari; D. Perlakuan 0,045 g/hari.

Pengaruh Sari Seduh Teh Hitam terhadap Ekspresi IGF-1

Hasil Ekspresi IGF-1 pada adiposit jaringan lemak visceral setelah pemberian sari seduh teh hitam selama 90 hari menunjukkan penurunan, tetapi penurunan kadar IGF-1 tidak konsisten pada setiap perlakuan. Ekspresi IGF-1 adiposit jaringan lemak visceral dengan diet tinggi lemak menurun setelah dipapar dengan sari seduh teh hitam 0,015 g/hari tetapi meningkat pada perlakuan 0,030 g/hari dan kemudian diikuti penurunan ekspresi IGF-1 pada perlakuan 0,045 g/hari.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa ekspresi IGF-1 pada perlakuan 0,015 g/hari dan 0,045 g/hari menurun secara nyata dibandingkan dengan kontrol, tetapi tidak didapatkan beda bermakna ekspresi IGF-1 antara

kontrol dengan perlakuan 0,030 g/hari sari seduh teh hitam.



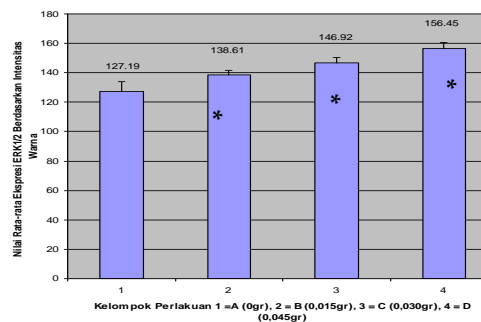
Gambar 2. Hubungan antara pemberian teh hitam terhadap intensitas warna ekspresi IGF-1 (*, signifikan pada $p \leq 0.05$).

Pada gambar diatas dapat disimpulkan bahwa peningkatan dosis sari seduh teh hitam dapat menekan peningkatan ekspresi IGF-1 adiposit lemak visceral tikus wistar dengan diet tinggi lemak meskipun tidak konsisten.

Pengaruh Sari Seduh Teh Hitam terhadap Ekspresi ERK1/2

Hasil Ekspresi ERK1/2 pada adiposit jaringan lemak visceral setelah pemberian sari seduh teh hitam selama 90 hari menunjukkan penurunan konsisten pada setiap perlakuan. Ekspresi ERK1/21 adiposit jaringan lemak visceral dengan diet tinggi lemak menurun setelah dipapar dengan sari seduh teh hitam 0,015 g/hari, 0,030 g/hari dan juga diikuti penurunan ekspresi ERK1/2 pada perlakuan 0,045 g/hari.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa ekspresi ERK1/2 pada perlakuan 0,015 g/hari, 0,030 g/hari dan 0,045 g/hari menurun secara nyata dibandingkan dengan kontrol.



Gambar 3. Hubungan antara pemberian teh hitam terhadap intensitas warna ekspresi ERK1/2 (*, signifikan pada $p \leq 0.05$).

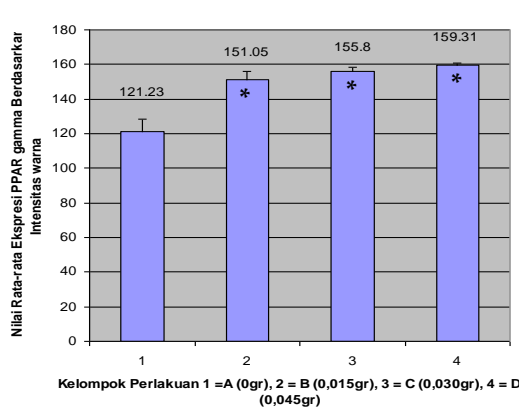
Pada gambar diatas dapat disimpulkan bahwa peningkatan dosis sari seduh teh hitam dapat menekan peningkatan ekspresi ERK1/2 adiposit lemak visceral tikus wistar dengan diet tinggi lemak secara konsisten.

Pengaruh Sari Seduh Teh Hitam terhadap Ekspresi PPAR γ

Untuk ekspresi PPAR γ pada adiposit jaringan lemak visceral dengan pemberian sari seduh teh hitam selama 90 hari menunjukkan penurunan konsisten pada setiap dosis perlakuan. Ekspresi PPAR γ adiposit jaringan lemak visceral dengan diet tinggi lemak menurun setelah dipapar dengan sari seduh teh hitam 0,015 g/hari, 0,030 g/hari dan juga diikuti penurunan ekspresi PPAR γ pada perlakuan 0,045 g/hari.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa ekspresi PPAR γ pada perlakuan 0,015 g/hari, 0,030 g/hari dan 0,045 g/hari menurun secara nyata dibandingkan dengan kontrol ($p \leq 0,05$).

Pada gambar di atas dapat disimpulkan bahwa peningkatan dosis sari seduh teh hitam dapat menekan peningkatan ekspresi PPAR γ adiposit lemak visceral tikus wistar dengan diet tinggi lemak secara konsisten.



Gambar 4. Hubungan antara pemberian teh hitam terhadap intensitas warna ekspresi PPAR γ (*, signifikan pada $p \leq 0.05$).

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian teh hitam dosis 0,015 g, 0,030 g dan 0,045 g menyebabkan pengecilan morfologi sel adiposit (Gambar 1). Teh sebagai agen antiproliferasi berperan di dalam pengontrolan massa sel adiposit dan juga sebagai agen anti hipertropi pada sel adiposit. Sebagian besar pertumbuhan jaringan lemak setelah lahir berasal dari hipertropi yang akan dapat mencapai ukuran 150 μ m pada beberapa spesies [11].

Marques *et al.* [7], menyebutkan bahwa induksi diet tinggi lemak akan meningkatkan ukuran sel lemak inguinal, apabila dibandingkan dengan hasil penelitian ini tampak dengan pemberian sari seduh teh hitam ukuran sel lemak mengalami penurunan pada tiga kelompok dosis perlakuan (peningkatan ukuran sel lemak dapat ditekan).

Rosen *et al.* [12], menyebutkan bahwa proses normal adipogenesis terjadi apabila terdapat perubahan fenotip adiposit yang menyebabkan perubahan morfologis serta adanya akumulasi lipid vakuola akibat induksi oleh faktor transkripsi kunci yaitu PPAR γ dalam proses adipogenesis. Pada penelitian ini, ukuran sel lemak kelompok kontrol berbeda dengan tiga kelompok perlakuan dosis teh hitam dalam hal ukuran vakuola sel lemak. Adanya inhibisi mekanisme kerja dari PPAR γ sebagai faktor transkripsi kunci adipogenesis, menyebabkan proses pemasukan asam lemak melintasi membran yang disandi oleh gen target PPAR γ dan pengikatan lemak intraseluler menurun oleh aktivitas metabolik senyawa aktif teh hitam. Hal ini berpengaruh terhadap ukuran sel lemak jaringan lemak visceral hasil proses adipogenesis yang secara normal memiliki vakuola besar. Akan tetapi, pada penelitian ini proses pembentukan karakteristik sel lemak normal tersebut terhambat oleh pemberian sari seduh teh hitam.

Pada hewan yang diberi pakan tinggi lemak dan kolesterol, teh hijau, teh hitam, serta polifenol teh menyebabkan pencegahan peningkatan lipida serum dan hati, menurunkan kolesterol total serum atau indeks aterogenik, dan meningkatkan ekskresi fekal dari lipida dan kolesterol total. Polifenol teh menghambat aktivitas *catechol-O methyltransferase* dan bereaksi sinergis dengan kafein untuk memperpanjang stimulasi simpatetik dari *thermogenesis* [13]. Hal tersebut mengindikasikan bahwa semakin besar dosis teh hitam yang diberikan pada kelompok perlakuan menyebabkan penurunan ukuran sel lemak akibat terhambatnya pemasukan asam lemak ke vakuola dan aktivitas *thermogenesis*.

Hasil penelitian juga diperoleh gambaran efek pemberian sari seduh teh hitam dapat menekan ekspresi IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) yang berperan sebagai suatu *growth factor* penting proses adipogenesis. IGF-1 bekerja secara autokrin pada sel lemak memegang peranan dalam stimulasi mitogenik maupun diferensiasi preadiposit menjadi adiposit. Menurut Scavo, *et al.* [14], menyebutkan bahwa secara *in vitro* IGF-1 bekerja melalui IGF-R kemudian mengalami

phosphorilasi substrat spesifik seperti Shc dan IRS-1. IGF-1 dalam proses adipogenesis dengan melalui 2 jalur signal transduksi yaitu MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) yang berperan pada mekanisme diferensiasi dan jalur PI3K (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*) untuk proses pembelahan sel dan penekanan diferensiasi [3]. Ekspresi IGF-1 menurun pada kelompok perlakuan dari tiga dosis perlakuan yang berarti sari seduh teh hitam menghambat autophosphorilasi IGFR dan menyebabkan penurunan ekspresi IGF-1.

Adanya penghambatan reseptor tersebut sejalan dengan penelitian sebelumnya dimana pemberian EGCG dan *theaflavin* secara *in vitro* dilaporkan dapat menekan autophosphorilasi dari EGFR dan PDGFR sebagai reseptor dari kedua *growth factor* tersebut [15]. Penelitian ini menunjukkan semakin besar dosis teh hitam semakin rendah ekspresi dari IGF-1 setelah 90 hari perlakuan diet tinggi lemak ($p=0,00$) dengan taraf signifikansi $P<0,05$. Terjadinya variasi penurunan ekspresi dari IGF-1 untuk 3 kelompok perlakuan terhadap kelompok kontrol, dimungkinkan adanya proses homeostasis internal sel lemak. Posovsky *et al.* [16], menyebutkan pada preadiposit dan adiposit apoptosis memegang peranan penting dalam regulasi massa sel lemak. Reseptor untuk ligan apoptosis (CD 95, TRAIL-R1 dan 2, dan TNFR) diekspresikan baik pada sel adiposit manusia ataupun pada hewan. Penghambatan aktivitas autokrin dari IGF-1 akan memicu ligan untuk berikatan pada *death* reseptor serta menginduksi jalur apoptosis.

Adanya fluktuasi nilai rata-rata ekspresi IGF-1 pada 3 kelompok perlakuan adalah gambaran konsep pengurangan adiposit dengan apoptosis yang berkontribusi secara signifikan terhadap massa jaringan lemak. Pada penelitian ini juga diketahui ekspresi TNF- α meningkat. Penelitian terbaru menyebutkan bahwa terjadinya apoptosis sel lemak pada hewan coba merupakan sebuah mekanisme homeostasis terhadap pengontrolan jumlah sel lemak akibat induksi ligand pemicu apoptosis. IGF-1 memiliki kemampuan untuk mempertahankan preadiposit dan adiposit dari induksi ligand pada reseptor apoptosis untuk segera melakukan program *cell death*. Pemblokiran jalur PI3K dan p38 MAPK akan memacu CD 95, TRAIL, dan TNF- α untuk segera berikatan pada reseptornya [16].

IGF-1 memediasi jalur *survival* melewati MAPK akan lebih dominan jika jalur PI3K tidak

dapat berfungsi. IGF-1 menginisiasi aktivasi jalur PI3K, p38 MAPK, p42/44 MAPK sebagai sinyal *survival* terhadap stimulasi ligan untuk apoptosis sel lemak seperti TNF- α [16]. Hal ini juga diperkuat dengan gambaran hasil uji regresi dimana jalur IGF-1 yang menginduksi terhadap PPAR γ memiliki koefisien lebih besar dibandingkan melalui jalur ERK1/2. Hal ini berarti, akibat terhambatnya aktivitas ERK1/2, maka untuk menjaga homeostasis massa jaringan lemak aktivitas jalur PI3K akan meningkat. Adanya fluktuasi nilai ekspresi dari IGF-1 dimungkinkan karena aktivitas *survival* terhadap inhibisi jalur ERK1/2 oleh pemberian teh hitam dan meningkatnya ekspresi TNF- α . Yu *et al.* [15], menyatakan bahwa efek penghambatan autophosphorilasi *growth factor* pada reseptornya paling kuat terjadi oleh senyawa aktif dalam teh hitam yaitu TF3 (*Theaflavin-3-3'-digallate*). Sedangkan penelitian Bode dan Dong [17], memberikan hipotesis komponen aktif teh hitam diduga menghambat fosforilasi pada beberapa bagian seperti pada reseptor *growth factor*, pada jalur Ras, anggota jalur MAPKs dan aktivasi serta translokasi faktor transkripsi sitoplasmik. Jalur yang digunakan oleh IGF-1 adalah melalui jalur MAPK. Pada hasil penelitian ini, ekspresi dari ERK1/2 pada tiga kelompok dosis perlakuan mengalami penurunan. Hasil tersebut didukung oleh penelitian Chung *et al.* [18] yang menggunakan *mouse epidermal cell line* dengan pemberian EGCG dan TF3 berhasil menurunkan level fosforilasi jalur ERK1/2 dan MEK1/2 sampai 50%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa efek senyawa aktif teh hitam dapat menekan fosforilasi IGF-1 pada reseptornya dan menyebabkan penurunan ekspresi IGF-1 yang berkelanjutan dengan penurunan ekspresi ERK1/2. Akan tetapi, apakah dengan terjadinya penurunan ekspresi IGF-1 dan ERK1/2 menyebabkan ekspresi dari PI3K meningkat masih memerlukan penelitian lebih lanjut sebab jalur PI3K berperan dalam mitogenesis dan penekanan diferensiasi. Disamping itu, perlu penyelidikan lebih lanjut terhadap ekspresi protein jalur lain seperti Ras yang juga akan mengaktifkan jalur MAPK serta ekspresi dari beberapa protein *marker* untuk perubahan morfologi seperti MMP-14, Co6a1, dan Gjb3 yang berperan dalam proses akhir adipogenesis. Hasil analisis statistik dengan *one way Anova* menunjukkan makin besar dosis teh hitam

ekspresi ERK1/2 semakin menurun ($p=0,000$) dengan taraf signifikansi $p<0,05$.

Pemberian sari seduh teh hitam pada penelitian ini juga menyebabkan penurunan level ekspresi PPAR γ pada 3 kelompok dosis perlakuan. Ekspresi PPAR γ sendiri sangat tergantung dari *inducer* alami maupun sintetik yang akan mengaktifkannya. Selain itu, PPAR γ akan teraktivasi setelah terjadi induksi sinyal transduksi jalur MAPK khususnya jalur ERK1/2 untuk segera translokasi pada *coding region* di genom dan mengaktifkan gen-gen penting untuk tahap akhir diferensiasi [19]. Akan tetapi, pada penjelasan sebelumnya telah disebutkan bahwa terjadi penghambatan autofosforilasi dari IGF-1 pada reseptornya serta penurunan ekspresi ERK1/2. Akibat adanya penghambatan tersebut, dari hasil penelitian ini menunjukkan semakin besar dosis perlakuan ekspresi PPAR γ menurun secara signifikan ($p=0,000$) dengan taraf signifikansi $p<0,05$.

PPAR γ akan teraktivasi dan meningkatkan ekspresinya oleh ligan alami berupa asam lemak yang terdapat pada diet tinggi lemak sebagai *inducer* diferensiasi serta memicu peningkatan ekspresi *growth factor* IGF-1. Adanya inhibisi autofosforilasi IGF-1 pada reseptornya oleh senyawa aktif teh hitam mengakibatkan penurunan ekspresi PPAR γ secara tidak langsung. Chiba *et al.* [8] menyebutkan adanya induksi diet tinggi lemak khususnya VLDL akan meningkatkan ekspresi PPAR γ pada level mRNA. Senyawa aktif dalam teh hitam menyebabkan penurunan ekspresi dari PPAR γ memiliki kemungkinan jalur penghambatan, yaitu melalui penghambatan *growth factor* IGF-1 di reseptor membran dan jalur signal transduksinya yaitu jalur MAPK khususnya ERK1/2. Mekanisme kerja komponen senyawa aktif teh hitam mungkin langsung memblokir aktivasi PPAR γ pada *binding site* tempat ligan berikatan pada PPAR γ seperti yang dikemukakan dalam hipotesis Bode dan Dong [17] dan hal ini masih memerlukan penelitian lebih lanjut.

Komponen teh hitam dimungkinkan dapat menekan level ekspresi PPAR γ dengan menghambat ataupun menurunkan ekspresi faktor transkripsi lain yaitu kelompok C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein) isoform serta SREBP1/ADD1 (*Adipocyte Determination and Differentiation Factor 1*) ataupun pengikatan keduanya pada PPAR γ . Kedua faktor transkripsi ini merupakan aktivator PPAR γ dalam proses adipogenesis dan masih belum diketahui secara *in vivo* apakah komponen aktif teh hitam dapat .

Apabila ekspresi dan aktivasi dari PPAR γ terhambat ataupun menurun, proses akhir diferensiasi yang ditentukan oleh beberapa gen target PPAR γ juga akan terhambat dan secara tidak langsung proses diferensiasi juga menurun. Hal ini didukung oleh penelitian [20] yang menyebutkan penyisipan suatu sekuen basa (PTHrP) dalam kultur 3T3-L1 dapat menghambat aktivitas PPAR γ dan menyebabkan tingkat diferensiasi menjadi menurun. Tanabe *et al.* [21] juga menjelaskan adanya pemberian *stretching* mekanik pada kultur 3T3-L1 menyebabkan penghambatan aktivitas PPAR γ dengan *down regulation* jalur ERK/MAPK sehingga proses akhir dari diferensiasi preadiposit menjadi adiposit menurun secara signifikan.

Pada penelitian ini pemberian sari seduh teh hitam sebagai bahan alam yang menyebabkan penurunan ekspresi PPAR γ secara tidak langsung seperti yang disebutkan di awal akan menentukan perubahan morfologi serta akumulasi lipid pada vakuola sel lemak. Hal ini terjadi karena penghambatan autofosforilasi pada IGF-1 serta penurunan aktivitas jalur MAPK (khususnya ERK1/2) maka beberapa protein spesifik (*morphological modifier*) yang akan menginduksi PPAR γ juga akan menurun ekspresinya serta akan mempengaruhi terhadap bentuk dan ukuran akhir sel lemak setelah diferensiasi selesai. PPAR γ sendiri menurut Desvergne dan Wahli [22] sangat berperan untuk menginduksi gen spesifik seperti *aP2* yang berperan untuk pengikatan intraseluler asam lemak, *CPT1* untuk pemasukan asam lemak ke mitokondria, *FATP* untuk transport asam lemak melintasi membran, *GLUT 4* untuk homeostasis glukosa, *LPL* untuk pelepasan asam lemak dari trigliserida serta beberapa gen spesifik lain untuk tahap akhir diferensiasi dan apabila aktivasi serta ekspresi PPAR γ terhambat maka perubahan fenotip akhir sel lemak akan mengalami perubahan dibandingkan pada kondisi normal.

Pada hasil analisis jalur terlihat bahwa ekspresi IGF-1 memiliki keterkaitan baik pada ERK1/2 ataupun terhadap PPAR γ secara langsung. Dari kerangka konseptual dan gambaran mekanisme kerja dari IGF-1 sebagai *growth factor* seperti yang dikemukakan oleh Yu Hua *et al.* [3] dimana IGF-1 dalam mekanisme kerjanya untuk menginduksi proses diferensiasi dalam proses adipogenesis bisa melewati jalur MAPK khususnya jalur ERK1/2 ataupun jalur PI3K. Secara jelas nampak bahwa diantara ERK1/2 dan PPAR γ nilai keeratan hubungan fungsional yang cukup tinggi sesuai dengan koefisien regresi

(R=0,798 dan R=0,780) dan keduanya memiliki hubungan saling menginduksi dalam 2 arah/timbal balik. Dari analisis regresi diperoleh hasil bahwa ERK1/2 dan PPAR γ tidak memiliki hubungan fisiologis dua arah atau menginduksi balik yang cukup kuat terhadap IGF-1. Aktivitas ERK1/2 dan PPAR γ ditentukan oleh stimulasi IGF-1 yang bekerja terlebih dahulu pada reseptor membran dimana IGF-1 bekerja secara autokrin [4, 14, 23].

Berdasarkan hasil analisis jalur timbul suatu dugaan apabila teh hitam dapat menurunkan ekspresi dari IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ terlihat bahwa adanya induksi IGF-1 terhadap PPAR γ kemungkinan juga melewati jalur sinyal transduksi lain dilihat dari koefisien regresi lebih besar (0,721) dibandingkan induksi lewat jalur ERK1/2 (0,580). Hal ini memunculkan suatu hipotesis bahwa jalur PI3K yang disebutkan oleh Yu Hua *et al.* [3] dilalui oleh IGF-1 untuk menekan proses diferensiasi mungkin meningkat aktivitasnya dengan pemberian sari seduh teh hitam pada tikus yang diinduksi dengan diet tinggi lemak dan menyebabkan ekspresi PPAR γ sebagai faktor transkripsi kunci adipogenesis mengalami penurunan. Dari hasil penelitian ini perubahan ekspresi beberapa protein penting sebagai *marker* morfologis untuk proses diferensiasi yang berperan penting pada tahap akhir adipogenesis masih belum diketahui perubahan ekspresinya. Berdasarkan fakta hasil penelitian dan kajian teoritik maka hipotesis yang menyatakan bahwa sari seduh teh hitam (*C. sinensis*) dapat menurunkan proses diferensiasi adiposit pada tikus wistar yang diberi diet tinggi lemak melalui pencegahan peningkatan ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ terbukti.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan dari hasil penelitian ini maka dapat dibuat suatu kesimpulan sari seduh teh hitam (*C. sinensis*) dapat mencegah peningkatan ekspresi IGF-1, ERK1/2 dan PPAR γ pada tikus wistar yang diberi diet tinggi lemak.

Masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh teh hitam secara *in vivo* terhadap ekspresi protein *biomarker* MMP-14, Co6a1, dan Gjb3, jalur sinyal transduksi PI3K dan faktor transkripsi C/EBP, SREBP serta bagaimanakah pengaruh teh hitam terhadap ekspresi protein CD95, TRAIL dan TNF- α sebagai pemicu apoptosis sel lemak pada proses adipogenesis.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Lin L., Delta-Fera M.A., dan Baile C.A. 2005. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocyte. *Obesity a Research Journal*. 13 (6): 982-990.
- [2] Adiningsih S. 2005. Indonesia nutritional pattern in contributing prevalence of obesity. Faculty of Public Health. Airlangga University. Surabaya.
- [3] Yu H.T., Atul J.B., Efi K., Vijay K.Y., Cullen M.T., Kristina M.K., Aaron M.C., Michio N., Kazuaki Y., Mary E.P., dan Kahn C.R. 2005. Prediction of preadipocyte differentiation by gene expression reveals role of insulin receptor substrates and necdin. *Nature Cell Biology*. 7(6): 601-611.
- [4] Kamai Y., Mikawa S., Endo K., Sakai H., dan Komano T. 1996. Regulation of Insulin-Like Growth Factor-I expression in mouse preadipocyte Ob1771 cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 271 (17): 9883-9886.
- [5] Leung L.K., Su Y., Chen R., Zhang Z., Huang Y., dan Chen Z. 2001. Theaflavin in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *The Journal Nutrition*. 131 (1): 2248-2251.
- [6] Bastie C., Holst D., Gaillard D., Jehl-Pietri C., dan Grimaldi P.A. 1999. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor PPAR δ promotes induction of PPAR γ and adipocyte differentiation in 3T3C2 Fibroblast. *The Journal of Biological Chemistry*. 274 (31): 21920-21925.
- [7] Marques B.G., Hausman D.B., Latimer A.M., Kras K.M., Grossman B.M., dan Martin R.J. 2000. Insulin-like Growth Factor I mediates high-fat diet-induced adipogenesis in Osborne-Mendel Rats. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 278 (3): 654-662.
- [8] Chiba T., Nakazawa T., Yui K., Kaneko E., dan Shimokado K. 2003. VLDL induces adipocyte differentiation in ApoE-Dependent manner. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. (23):1423-1429.
- [9] Hartoyo A. 2003. Teh dan khasiatnya bagi kesehatan-sebuah tinjauan ilmiah. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- [10] Indra M.R. 2005. Dasar genetik obesitas visceral. Dalam Sumarno *et al.* (Eds). Fourth Basic Molecular Biology Course in Pathophysiology of Obesity. Program Pascasarjana UB. Malang. 61-72.

- [11] Indra M.R. 2005. Kultur adiposit Dan pemeriksaan adipositokin. Laboratorium Fisiologi, Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya. Malang.
- [12] Rosen E.D., Walkey C.J., Puigserver P., dan Spiegelman B.M. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes and Development*. 14: 1293-1307.
- [13] Tuminah S. 2004. Efek teh hitam [*Camellia sinensis* O.K. var. *Assamica* (Mast)] sebagai salah satu sumber antioksidan. *Majalah Cermin Dunia Kedokteran*. 144. 52-54.
- [14] Scavo L.M., Karas M., Murray M., dan Leroith D. 2004. Insulin-Like Growth Factor-I stimulate both cell growth and lipogenesis during differentiation on Human mesenchymal stem cells into adipocyte. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 89 (7): 3543-3553.
- [15] Liang Y., Chen Y., Lin Y., Lin-Shiau S., Ho C., dan Lin J. 1999. Suppression of extracellular signals and cell proliferation by The black tea polyphenol, Theaflavin-3,3'-Digallate. *Carcinogenesis*. 20 (4): 733-736
- [16] Fischer-Posovszky P., Tornqvist H., Debatin K., dan Wabitsch M. 2004. Inhibition of Death-Receptor mediated apoptosis in human adipocytes by The (IGF-1)/IGF-1 receptor autocrine circuit. *Endocrinology*. 145 (4). 1849-1859.
- [17] Bode A.M. dan Dong Z. 2003. Signal transduction pathways: targets for green and balck tea polyphenols. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 36 (1): 66-77.
- [18] Chung J.Y., Park J.O., Phyu H., Dong Z., dan Yang C.S. 2001. Mechanism of inhibition of The Ras-MAP Kinase signaling pathway in 30.7b Ras 12 Cells by Tea Polyphenols (-)-Epigallocatechin-3-gallate and Theaflavin-3-3'-digallate. *The Journal of the Federation of America Societies for Experimental Biology*. 15: 2022-2024.
- [19] Gregoire F.M., Smas C.M., dan Sul H.S. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews*. 78 (3): 783-809.
- [20] Chan G.K., Deckelbaum R.A., Bolivar I., Goltzman D., dan Karaplis A.C. 2001. PTHrP inhibits adipocyte differentiation by down-regulating PPAR γ activity via a MAPK-dependent pathway. *Endocrinology*. 142 (11): 4900-4909.
- [21] Tanabe Y., Koga M., Saito M., Matsunaga Y., dan Nakayama K. 2004. Inhibition of adipocyte differentiation by mechanical stretching THROUGH ERK-mediated down regulation of PPAR γ 2. *Journal of Cell Science*. 117: 3605-3614.
- [22] Desvergne B. dan Wahli W. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor: nuclear control-metabolism, *Endocrine Rev*. 20 (5): 649-688.
- [23] Boney C.M., Gruppuso P.A., Faris R.A., dan A.R. Frackelton. 2000. The critical role of Shc in Insulin-Like Growth Factor-I mediated mitogenesis and differentiation in 3T3-L1 Preadipocyte. *Molecular Endocrinology*. 14 (6):805-813.

Analisis Sekuensing Nucleotida pada Mutasi Gen MTHFR C677T pada Kondisi Premature Cardio Infarction

Muizzuddin^{1*}, Tinny Endang H.², I. Ketut Muliarta², Liliek Sulistyowati²,
Djangan Sargowo²

¹Program Studi Biomedik, Pascasarjana Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

²Pascasarjana Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui miokard infark prematur yang terjadi karena *homocystein* disebabkan oleh adanya mutasi gen C677T MTHFR. Sampel darah diambil dari pasien dengan keadaan *intermediate hyperhomocystein* sebanyak 14 orang; dua diantaranya *hyperhomocystein* obligat. Pengukuran DNA Total menggunakan spektrofotometer 260 nm dan 280 nm dan visualisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa. DNA mutan gen MTHFR diamplifikasi dengan PCR dan gen MTHFR (C677T) diisolasi menggunakan primer yang dirancang menggunakan *Fast PCR*. Gen mutan MTHFR (C677T) diamplifikasi dan visualisasi melalui *Automated Sequencer Analyzer* dengan pembandingan gen CBS *exon* 3, 7, dan 8 normal, serta data sekuens Gene Bank OMIM. Hasil penelitian menunjukkan bahwa determinasi konstruksi primer untuk lokus mutasi C677T semakin mudah ditetapkan. Sehingga membuka peluang untuk menggali informasi baru mengenai protein patologis pada pasien miokard infark prematur. Molekul polipeptida yang ditemukan memiliki sekuens GRLQLRSGPGEAHPK *VW*LL*HLCGRLPQRPPRSREL*G*PEALEGEGVCGSR FHHHAAFL*G dengan berat molekul 1.6 kda. Pencandraan molekul tersebut dengan NOC memiliki motif *Glycosaminoglycan site* dan *N-Myristolation site*, diduga dapat mempercepat proses *atherosclerosis* dan *atherothrombosis*.

Kata kunci: Gen MTHFR C677t, homocystein, Premature Cardio Infarction

ABSTRACT

This research was aimed to assess the premature myocardial infarction which occurred because of the mutation of C677T MTHFR gene. Blood samples were taken from 14 patients with intermediate hyperhomocysteine; two of them are obligate *hyperhomocysteine*. DNA Total was assessed by spectrophotometer 260 nm and 280 nm and visualized by agarose gel electrophoresis. DNA mutation of MTHFR gene was amplified with PCR and MTHFR (C677T) gene isolated by designed primer from *Fast PCR*. Mutation Gene of MTHFR (C677T) was amplified and visualized by *Automated Sequencer Analyzer* compared to the gene of CBS *exon* 3, 7, and 8 normal, as well as sequence form Gene Bank NCBI, OMIM. The results showed that the primer construction for mutation locus of C677T is getting determined easier. Thus open the opportunity to explore new information of pathological protein on the patients of premature myocardial infarction. Polypeptide molecules which was found has GRLQLRSGPGEAHPK *VW*LL*HLCGRLPQRPPRSREL*G*PEALEGEGVCGSRFHHHAAFL*G sequence with molecular weight 1.6 kda. Molecular sensing with NOC has similar motif to *Glycosaminoglycan site* and *N-Myristolation site*, which assumed could accelerate the process of *atherosclerosis* and *atherothrombosis*.

Key words: Gen MTHFR C677t, homocysteine, Premature Cardio Infarction

PENDAHULUAN

Peningkatan level plasma asam amino *homocystein* telah teridentifikasi sebagai faktor resiko independen untuk *atherosclerosis*, termasuk di dalamnya *coronary artery disease*, *cerebrovascular disease*, *peripheral vascular disease* dan *venous trombolism* [1-4]. Studi mengindikasikan bahwa 15%-30% pasien dengan prematur *occlusive vascular disease* memiliki konsentrasi plasma *homocystein* meningkat

secara moderat yakni di atas 15 mmol.L⁻¹. Plasma dengan konsentrasi *homocystein* 5-15 mmol.L⁻¹ termasuk kategori moderat *hyperhomocystein*, bila konsentrasi plasma mencapai lebih dari 30 - 100 mmol.L⁻¹ disebut sebagai intermediat *hyperhomocystein*, jika *homocystein* >100 mmol.L⁻¹ disebut sebagai obligat *hyperhomocystein* yang sebenarnya [3,5]. Keadaan moderat *hyperhomocystein* merupakan faktor resiko *atheroclerosis* dan *thrombosis* yang berakibat miokard infark. Kondisi dapat mencetus penyakit hipertensi yang merupakan salah satu faktor resiko terjadinya penyakit jantung koroner dan menyebabkan komplikasi

* Alamat korespondensi:

Muizzuddin

Alamat : Program Studi Biomedik Pascasarjana

Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang 65145

pada organ lain, seperti pada mata, ginjal dan otak, serta pencetus penyakit kanker [6].

Penyakit-penyakit tersebut disebabkan oleh berbagai proses *pathogenesis* yaitu *atherosclerosis*, *atherotrombosis*, proses *aging* dan *degenerative*, inflamasi dan infeksi serta defisiensi nutrisi [7]. Agen patologis penyebab penyakit terdiri dari *free radical*, *cholesterol*, *triglicerida*, oksidasi LDL, adanya *foam cell*, juga *homocystein* yang berlebih (*hiperhomocystein*) akibatnya vitamin *deficiency* dan mutasi genetik.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui profil *homocystein* pada miokard infark prematur di Rumah Sakit di Kota Malang. Penelitian ini sebagai pembuktian pola titik mutasi pada urutan basa pada gen *MTHFR* pada nomor 677 yakni C677T, yang menyebabkan terjadinya *hiperhomocysteinemia* (HHCys) pada penderita miokard infark *premature*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui miokard infark prematur yang terjadi karena *homocystein* disebabkan oleh adanya mutasi gen C677T *MTHFR*, ataukah karena malnutrisi seperti defisiensi vitamin yang berkaitan dengan metabolisme *homocystein*.

METODE PENELITIAN

Isolasi DNA Darah Total

Darah diambil dari pasien dengan keadaan *intermediate hyperhomocystein* sebanyak 14 penderita, dengan 2 kasus berstatus *hiperhomocystin* obligat. Darah sebanyak 10 ml dalam tabung vakum bersalut EDTA sebagai anti koagulan. Pengukuran konsentrasi DNA total dilakukan dengan dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Visualisasi dengan gel agarosa yang di foto dengan kamera Polaroid DS-40. Disimpan Cairan DNA dalam suhu -20°C .

Visualisasi DNA Gel Agarosa Elektroforesis

Preparasi 1% agarosa dengan mencampur 0,2 gr ultra pure agarose dan 1 X TBE sebanyak 20 ml dalam flask. Masukkan dalam *microwave* sampai mendidih dan campuran merata, ambil dan letakan sampai kira-kira suhu mencapai $50-60^{\circ}\text{C}$. Tambahkan 10 mg/mL *ethidium broide* sebanyak 2 μl , campurkan dan tuangkan pada tempat gel. Pastikan tebal gel $\pm 3-5$ mm. Lepaskan sisir gel dan tambahkan *buffer* elektroforesis sampai menutup gel. Dilusi sampel DNA 10 X dengan 1 X TAE. Campur 5 μl sampel DNA yang telah diencer dengan 1,5 μl *loading buffer* dan masukan ke dalam sumuran menggunakan mikropipet.

Pasang elektroforesis pada voltase yang konstan yaitu 100 volt atau 50 volt.

Amplifikasi DNA Mutan Gen *MTHFR*

Amplifikasi DNA mutan gen *MTHFR* dilakukan dengan PCR, menggunakan mikro pipet ukuran 0,5-10 l dan 10-100 μl . Tabung *ependrof* untuk PCR volume 500 μl . Perangkat lengkap elektroforesis termasuk didalamnya cetak gel dan tanki *buffer* elektroda. DNTP, Taq polymerase, dan Primer DNA: Gen *MTHFR*.

Isolasi Gen *MTHFR* (C677T)

Pada sampel dengan kemurnian DNA > 1.5 dilakukan isolasi gen *MTHFR* untuk melihat titik mutasi C677T. Konstruksi rancangan primer menggunakan Fast PCR. Primer Invitrogen *MTHFR* F: GGG AGG CTT CAA CTA CGC AGT GG. Lokus Sekuens: 507-529. Primer Invitrogen *MTHFR* R: AGC CTC AAA GAA AAG CTG CGT G. Lokus Sekuens: 678-699. Sekuens Produk PCR: 507-699 =193 bp.

Amplifikasi gen mutan *MTHFR* (C677T)

Denaturasi awal 94°C selama 5', 30 siklus dengan kondisi temperatur denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik. *Annealing* pada suhu 62.9°C selama 1 menit, ekstensi pada 72°C selama 1 menit, ekstensi tambahan pada suhu 72°C selama 7 menit sebanyak 1 siklus, diakhiri dengan temperatur 4°C selama 30 detik.

Visualisasi Hasil Amplifikasi PCR

Ambil dari tabung mikro berisi DNA gen hasil amplifikasi sebanyak 10 μl dicampur dengan *loading buffer* sebanyak 1.5 l dalam masih dalam pipet diaduk secara inverse, kemudian masukan ke dalam sumur agarose gel 2% dan dielektroforesis dengan tegangan 40 volt selama 2 jam. Kemudian hasilnya divisualisasi dengan UV-transilluminator dan di foto dengan kamera Polaroid DS-40.

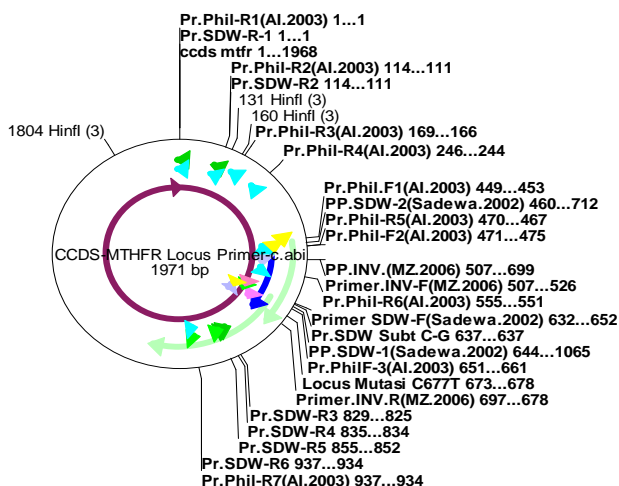
Pemurnian DNA isolat Gen CBS Exon 3, 7, dan 8, serta gen *MTHFR*, masing-masing mencapai 200 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Disekuens dengan *Automated Sequencer Analyzer*. Hasil sekuensing dianalisis dengan membandingkan dengan sekuens gen CBS *exon* 3, 7, dan 8 normal, serta gen *MTHFR* dengan menggunakan data sekuens Gene Bank NCBI Tahun 2005, OMIM database. Untuk mengetahui posisi mutasi gen CBS dan *MTHFR*.

HASIL PENELITIAN

Perancangan primer mengguna-kan *Fast PCR* tahun 2005 dan *ApEditor* tahun 2005, dengan menggunakan data *conserve region* gen *MTHFR* dari *Genebank* *NCBI* dengan kode akses *1.032 CCDS-MTHFR* tahun 2005. Pemetaan *conserve region* gen *MTHFR* sebagai berikut. Band isolat DNA total dari pasien miokard infark prematur adalah sebagaimana gambar 1.1. Pemetaan posisi primer pada *conserve region* *MTHFR* pada Gambar 1.

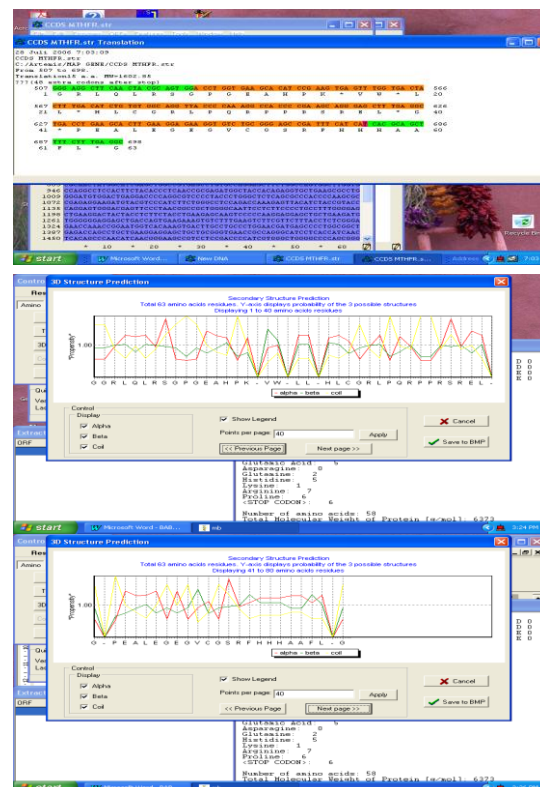
Hasil hibridisasi pada primer *INV. MTHFR* diperoleh bahwa primer *forward* *MTHFR-F* pada posisi 507..529 sedangkan posisi primer *reverse* pada posisi 678..699. Analisis sekuens dengan menggunakan *automated sequencer* dan menggunakan perangkat lunak *Artemis* versi 7 tahun 2005 dari *The Sanger Institute* diperoleh bahwa pada posisi titik mutasi *C67T* terjadi *miss reading frame* pada posisi 677.

Pemetaan posisi primer dapat melukiskan artefak metoda yang digunakan. Seperti yang telah dilakukan oleh penelitian sebelumnya dimana rentang posisi sekuens nukleotida yang besar dipotong dengan enzim *HinfI* [8,9] (Gambar 1). Pemetaan gen ini dilakukan dengan input data informasi yang terdapat pada *Genbank* *NCBI* tahun 2005 tentang *Consensus Conserve DNA Sequence* (*CCDS*) gen *MTHFR*. Kesesuaian primer dengan *conserve region* *MTHFR* masing-masing 100, yang menunjukkan kualitas primer yang sesuai untuk membidik fragmen sekuens DNA pada *conserve region* gen *MTHFR*.



Gambar 1. Pemetaan gen *MTHFR* pada *conserve region* dengan rentang basa nukleotida sebesar 1971 bp. Posisi mutasi *C677T* berwarna merah, dibidik dengan primer *INV MTHFR* warna biru.

Hasil yang sama diperoleh dari visualisasi pemetaan gen *MTHFR* *C677T* pada *conserve region* digambarkan dengan *ApEditor*. komposisi Polipeptida hasil translasi teridentifikasi pada fragmen 507..699, sekuens asam amino yakni, *GRLQLRSGPGEAHPK*VW*LL*HLCGRLPQRPRSEL*G*PEALEGEGVCGSRFHHAFL*G* (warna hijau pada Gambar 2.). Molekul ini diduga sebagai agen pada proses percepatan terjadinya *atherosclerosis* dan *atherotrombosis*.



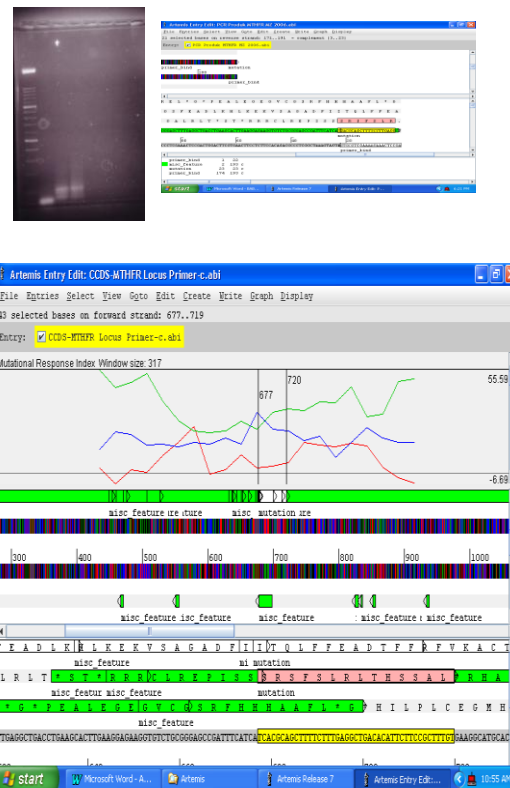
Gambar 2. Sekuens DNA pada Lokus 507..701. Terdapat penultimatebase mutasi *C677T* dengan warna merah. Primer *Sadewa* berwarna orange sedangkan primer *invitrogen* berwarna hijau. Pada bagian bawah sekuens DNA terdapat polipeptida hasil translasi yang merupakan molekul patologis secara ruang 3D.

Analisis hibridisasi pada Gambar 3 menunjukkan posisi primer pada *conserve region* *CCDS MTHFR*. Pada primer *Phillipe* yang digunakan mengemukakan bahwa rentang *PCR product* sebesar 1186 bp dan tidak membidik lokus *C677T*. Kualitas primer agar sesuai dengan *conserve region* bernilai kurang dari 100 sehingga banyak nukleotida yang tidak sesuai dengan pasangan pada *conserve region*. Kondisi ini dapat mengakibatkan tingkat kesulitan untuk dilakukan isolasi gen mutan *MTHFR* *C677T*.

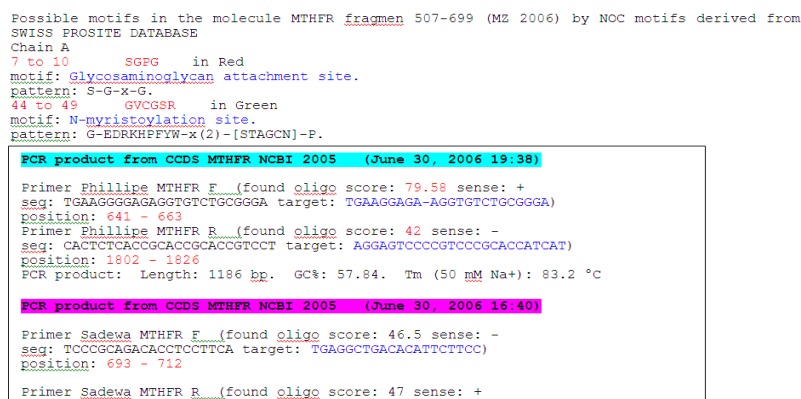
Pada penelitian Sadewa [9], yang menyatakan bahwa *conserve region* gen MTHFR dalam posisi *reverse* sehingga primer yang digunakan menjadi target sekuens dengan warna biru (Gambar 3). Nilai skor kesesuaian (*matching*) kurang dari 100 pada posisi 460..712 sekitar 253 bp dimana di dalamnya terdapat penultimate *base* mutasi C677T. Jangkau primer ini dengan nilai skor sebagaimana pada Gambar 3 menjangkau hampir seluruh *conserve region* (Gambar 1), sehingga diperoleh PCR produk dengan rentang yang cukup besar dan mendapatkan sekuens pada lokus 460..712. Pada penelitian tahun 2006 menggunakan primer produksi *Invitrogen* dengan sekuens AGC CTC AAA GAA AAG CTG CGT G, tampak bahwa pada lokus 507..526 nilai kesesuaian (*matching*) 100 dan pada lokus 678..699 dengan nilai yang sama. Hasil PCR diperoleh panjang sekuens sebesar 193 bp yang menjangkau penultimate *base* mutan C677T.

Lokus 507..699 adalah fragmen sekuens DNA dari *conserve region* CCDS-MTHFR. Sekuens DNA posisi 507..699 dapat dilakukan translasi dengan menggunakan perangkat lunak komputer. Polipeptida translasi pada region ini dapat divisualisasi dengan menggunakan perangkat lunak molekul *modeling* untuk memprediksi struktur, bentuk, dan motif molekuler yang diduga bersifat patologis. Sehingga eksperimen untuk pengkajian proteomik patologis dapat dirancang dan diarahkan pada target molekuler. Penentuan posisi asam amino dalam bentuk *alfahelix* dan *betasheets*

ditentukan dengan menggunakan *Molecular Biology Software* [11] dengan sekuens pada (Gambar 3.).



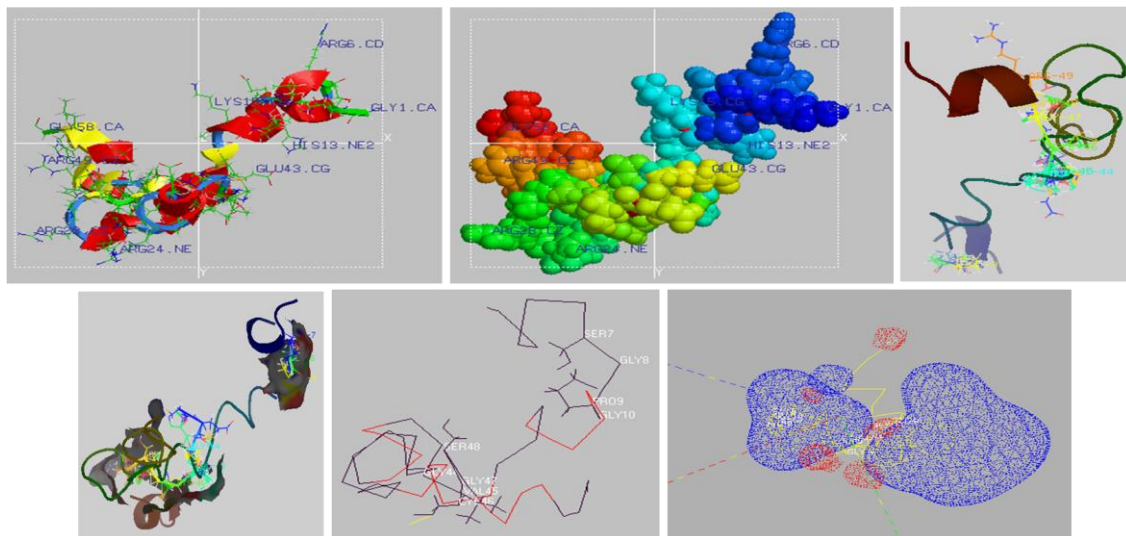
Gambar 3. Band gel elektroforesis gen mutan MTHFR C677T pada lokus fragmen DNA 507..699 pada CCDS-MTHFR 2005. *Frame shift reading* pada posisi T 677 dengan peptida SRSDFSLRLTHSSAL berwarna pink.



Gambar 4. Perbandingan oligonukleotida primer dengan analisis sekuens AnnHyb 2005 untuk determinasi posisi oligonukleotida dalam *conserve region* gen MTHFR

Pada visualisasi struktur dilakukan dengan menggunakan *software Rastop, PyMol, dan SPDV Deepview 3.1 Swiss-prosite*. Motif molekuler berada pada peptida SGP sebagai *Glycosaminoglycan site*, dan GVCGR sebagai *N-Myristoylation site*. Pembacaan motif peptida

menggunakan NOC 2005 (Gambar 4 dan 5). Hasil penelitian ini dapat dijadikan kandidat marker untuk penyakit mutasi genetik MTHFR C677T, dengan *allele* mutan *heterozygote* CT dan *homozygote* TT yang menyebabkan *hiperhomocysteinemia* dan *hiperhomocysteinuria*.



Gambar 5. Visualisasi molekul polipeptida translasi dari sekuens DNA pada lokus 507..699. *Conserve region* CCDS-MTHFR sekuens: RLQLRSGPGEAHPK*VW*LL*HLCGRLPQRPPRSREL*G*PEALEGEG VCGSRFHHAFL*G, dengan *Rastop* 2005, *pyMol* 2005 dan *SPDV* 3.1 2004 sebagai potensial elektrostatistik tampak pada warna biru.

KESIMPULAN

Data/informasi NCBI *Genebank conserve region* CCDS-MTHFR dapat digunakan untuk diagnostik penyakit mutasi genetik MTHFR C677T pada miokard infark prematur. Sekuens GRLQLRSGPGEAHPK*VW*LL*HLCGRLPQRPPRSREL*G*PEALEGEGVCGSRFHHAFL*G berat molekul 1.6 kda. Pencandraan molekul tersebut dengan NOC memiliki motif *Glycosaminoglycan site* dan *N-Myristolation site*, diduga dapat mempercepat proses *atherosclerosis* dan *atherothrombosis*.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Harpel, P.C., X. Zhang, dan W. Borth. 1996. Homocysteine and Hemostasis: Pathogenic mechanisms predisposing to Thrombosis. *J. Nutr.* 126 (4): 1285-1289.
- [2] Fallst-Strobl, P. C., D. D. Koch, J. H. Stein, dan P. E. McBride. 1997. Homocysteine: a new risk factor for Atherosclerosis. *Am. Fam. Physician.* 56 (6): 1-8.
- [3] Stefanović, V. 2000. Hyperhomocysteinemia: a risk factor for cardiovascular disease. *Facta Universitatis. Med. Biol.* 7(1): 7-10.
- [4] D'Angelo, A., A. Coppola, P. Madonna, I. Fermo, A. Pagano, G. Mazzola, L. Galli, dan A. M. Cerbone. 2000. The role of vitamin B12 in fasting hyperhomocysteinemia and its interaction with the homozygous C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene. A case-control study of patients with earlt-onset thrombotic events. *Thromb. Haemost.* 83 (4): 563-570.
- [5] Gaustadnes, M., B. Wilcken, J. Oliveriusova, J. McGill, J. Fletcher, J. P. Kraus, dan D. E. Wilcken. 2002. The molecular basis of cystathionine beta-synthase deficiency in Australian patients: genotype-phenotype correlations and response to treatment. *Hum. Mutat.* 20: 117-126.
- [6] Mc Cully, K. S. dalam Carmel, R. dan D. W> Jacobsen. 2001. Homocysteine in health and disease. Cambridge University Press. USA.
- [7] Selhub J, dan A. D'Angelo. 1997. Hyperhomo-cystinemia and thrombosis: acquired conditions. *Thromb. Haemost.* 78: 527-531.
- [8] Dilley, A., W.C. Hooper, M. El-Jamil, M. Renshawa, N.K. Wenger, dan B.L. Evatt. 2001. Mutations in the Genes Regulating Methylene Tetrahydrofolate Reductase MTHFR→T677 and Cystathione β-Synthase (CBS G→A919A, CBS T → c833) Are Not Associated with Myocardial Infarction in Afrikan Americans. *Thromb. Res.* 103 (2): 109-115.
- [9] Sadewa H.A., Y. Miyabe, H. Nishio, C. Hayashi, R. Sutomo, M. J. Lee, H. Ayaki, N. Koizumi, dan K. Sumino. 2002. No relationship exists between itai-itai disease and TA repeat polymorphisms of the estrogen receptor alpha gene. *Arch. Toxicol.* 76 (8): 467-469.
- [10] Simakov, O. 2005. MB DNA Analysis Program. Molbiosoft. German. Available: <http://www.molbiosoft.de/>.

MANUSCRIPT SUBMISSION

FOCUS AND SCOPE

Journal of Experimental Life Science (JELS) is scientific journal published by Graduate Program of Brawijaya University as distribution media of Indonesian researcher's results in life science to wider community. JELS is published in every four months. JELS published scientific papers in review, short report, and life sciences especially nanobiology, molecular biology and cellular biology. JELS is scientific journal that published compatible qualified articles to academic standard, scientific and all articles reviewed by expert in their field.

Journal of Experimental Life Science (JELS) have vision to become qualified reference media to publish the best and original research results, and become the foundation of science development through invention and innovation on cellular, molecular, and nanobiology rapidly to community.

Journal of Experimental Life Science (JELS) have objectives to published qualified articles on research's results of Indonesian researchers in life science scope. JELS encompasses articles which discuss basic principles on nature phenomenon with cellular, molecular, and nanobiology approach.

PEER REVIEW PROCESS

Publication of articles by JITODE is dependent primarily on their validity and coherence, as judged by peer reviewers, who are also asked whether the writing is comprehensible and how interesting they consider the article to be. All submitted manuscripts are read by the editorial staff and only those articles that seem most likely to meet our editorial criteria are sent for formal review. All forms of published correction may also be peer-reviewed at the discretion of the editors. Reviewer selection is critical to the publication process, and we base our choice on many factors, including expertise, reputation, and specific recommendations. The editors then make a decision based on the reviewers' advice, from among several possibilities:

Accepted, with or without editorial revisions
Invite the authors to revise their manuscript to address specific concerns before a final decision

Rejected, but indicate to the authors that further work might justify a resubmission

Rejected outright, typically on grounds of specialist interest, lack of novelty, insufficient conceptual advance or major technical and/or interpretational problems

PUBLICATION FREQUENCY

JELS publish 2 Issues per year.

OPEN ACCESS POLICY

This journal provides immediate open access to its content on the principle that making research freely available to the public supports a greater global exchange of knowledge.

COPYRIGHT NOTICE

Authors who publish with this journal agree to the following terms:

Authors retain copyright and grant the journal right of first publication with the work simultaneously licensed under a Creative Commons Attribution License that allows others to share the work with an acknowledgement of the work's authorship and initial publication in this journal.

Authors are able to enter into separate, additional contractual arrangements for the non-exclusive distribution of the journal's published version of the work (e.g., post it to an institutional repository or publish it in a book), with an acknowledgement of its initial publication in this journal.

Authors are permitted and encouraged to post their work online (e.g., in institutional repositories or on their website) prior to and during the submission process, as it can lead to productive exchanges, as well as earlier and greater citation of published work (The Effect of Open Access).

PRIVACY STATEMENT

The names and email addresses entered in this journal site will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be made available for any other purpose or to any other party.

ETHICS PUBLICATION

Research that using animal, human, and clinical testing is should already have ethical clearance certificate from authorized institution.

**Title Typed in Bold, Capitalize each First Letter of Each Word, Except
Conjunctive, *Scientific name* should not be Abbreviated
(Calibri 14 Bold Center, should not exceed 12 words, except conjunctive)**

First Author^{1*}, Second Author², Third Author³ (Calibri 12 Center, without title)

¹First Author Affiliation, Correspondence author should be indicated by * symbol (Calibri 9 Center)

²Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Brawijaya, Malang, Indonesia

³Laboratorium of Physiology, Faculty of Medicine, University of Brawijaya, Malang, Indonesia

Abstract (Calibri 9 Bold Center)

This article illustrates preparation of your paper using MS-WORD (.doc or .rtf). Manuscript was numbered consecutively. Main text typed in two columns (67 characters), except title and abstract in one column. The manuscript should be written in English. The length of manuscript should not exceed 10 pages including table and figure in this format using A4 paper single space. The text should be in the margin of 3 cm up, down and left side, 2.5 cm on right side. Abstract includes the research purposes, research method and research results in one paragraph of *essay*, not *enumerative*. No citation in abstract. Abstract should not exceed 200 words. Keywords typed after abstract. (Calibri 9 Justify).

Keywords: manuscript, English, format, 5 words maximum (Calibri 9 Left)

INTRODUCTION* (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

All submitted manuscripts should contain original research which not previously published and not under consideration for publication elsewhere. Articles must be written in ENGLISH and manuscripts may be submitted for consideration as research report articles, short reports or reviews.

The introduction explains the background of the problem, the study of literature and research purposes. Some initial introduction paragraphs explain the problem and background to these problems [1]. The next few paragraphs explain the study of literature that contains recent knowledge development which is directly related to the issues. The last paragraph of the introductory section contains a description of the purposes of the study. (Calibri 10 Justify)

MATERIAL AND METHOD (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

This section describes the types of methods (qualitative, quantitative or mixed-method) with details of methods of data collection and data analysis [2]. This section also describes the perspective that underlying the selection of a particular method. (Calibri 10 Justify)

Data Collection (Calibri 10 Bold, Left)

Explain the data collection methods, i.e. surveys, observations or archive, accompanied by details of the use of such methods. This section also describes the population, sampling and sample selection methods. (Calibri 10 Justify)

The use of English language should followed proper grammar and terms. Name of organism should be followed by its full scientific name in the first mention, in *italic* [3]. Author of the scientific name and the word of “var.” typed regular. Example: *Stellaria saxatillis* Buch. Ham. First abbreviation typed in colon after the abbreviated phrase.

Author must use International Standard Unit (SI). Negative exponent used to show the denominator unit. Example: g l⁻¹, instead of g/l. The unit spaced after the numbers, except percentage [4]. Example: 25 g l⁻¹, instead of 25gl⁻¹; 35% instead of 35 %. Decimal typed in dot (not coma). All tables and figures should be mentioned in the text.

RESULT AND DISCUSSION (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

This section contains the results of the analysis and interpretation or discussion of the results of the analysis. Describe a structured, detailed, complete and concise explanation, so that the reader can follow the flow of analysis and thinking of researchers [5]. Part of the results study should be integrated with the results of the

Correspondence address: (Calibri 8 Bold, Left)

Full name of correspondence author

Email : sapto@jurnal.ub.ac.id

Address : affiliation address include post code

analysis and the results and discussion are not separated.

Table

Table should be submitted within the manuscript and in separated file of *Microsoft Excel* (xls.). Table would not exceed 8 cm (one column) and 17 cm (two columns). Table should be embedded in different page after references.

Table should be numbered in sequence. Table title should be brief and clear above the table, with uppercase in initial sentence. Vertical line should not be used. Footnote use number with colon and superscripted. Symbol of (*) or (**) was used to show difference in confidence interval of 95 and 99%.

Table 1. Example of the Table (Calibri 8.5 Left)

No	Point (Calibri 8.5 Justify)	Description
1		
2		
3		
4		
5		

Sources: Journal of PPSUB (Calibri 8.5 Left)

Figures

Figures should be in high resolution and well contrast in JPEG or PDF with the following conditions:

- Monochrome image (line art), figures of black and white diagram (solid/no shades of gray), resolution 1000-1200 dpi (dot per inch).
- Combination Halftone, combine figure and text (image containing text) and coloured graphic or in grayscale format. Resolution 600-900 dpi.
- Halftone, coloured figure or grayscale format without text. Resolution 300 dpi.

- Black and white figure should be in the grayscale mode, while coloured figures should be in RGB mode.
- Figure should not exceed the width of 8 cm (one column), 12.5 cm (1.5 columns) or 17 cm (two columns).
- Figures title typed clearly below the figure.
- Figure with pointing arrow should be grouped (grouping).
- Figures were recommended in black and white.
- Legend or figure description should be clear and complete. If compressed, the figure should be readable.
- Statistic graphic should be supplemented with data sources.
- If the figures come from the third party, it should have the copyright transfer from the sources.

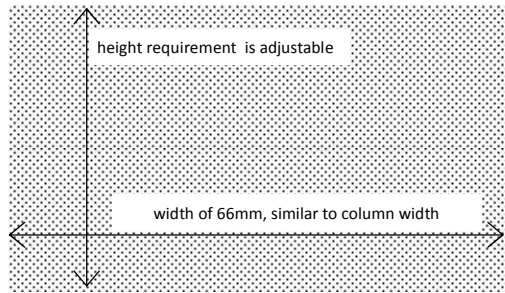


Figure 1. Illustration of Dimensional Figure of one column width. Figure dimension adjusted to the width of one column. Name the figure (diagram) written below the image. (Calibri 8.5 Justify)

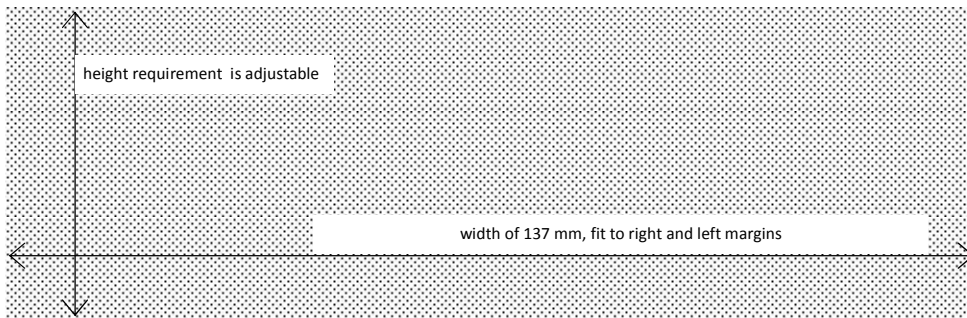


Figure 2. . Illustration of Dimensional Figure of two column width. Figure dimension adjusted to the width of two columns (137 mm). Figure were align top or bottom of the page. (Calibri 8.5 Justify)

References

1. Primary references include journal, patent, dissertation, thesis, paper in proceeding and text book.
 2. Avoid self citation.
 3. Author should avoid reference in reference, popular book, and internet reference except journal and private ana state institution.
 4. Author was not allowed to use abstract as references.
 5. References should been published (book, research journal or proceeding). Unpublished references or not displayed data can not be used as references.
 6. References typed in numbering list (format number 1,2,3,...), ordered sequentially as they appear in the text (system of Vancouver or author-number style).
 7. Citation in the manuscript typed only the references number (not the author and year), example: Obesity is an accumulation of fat in large quantities which would cause excessive body weight (overweight) [1]. Obesity is a risk factor of diabetic, hypertension dan atherosclerosis [2].
- [4].Syafi'i, M., Hakim, L., dan Yanuwiyadi, B. 2010. Potential Analysis of Indigenous Knowledge (IK) in Ngadas Village as Tourism Attraction. pp. 217-234. In: Widodo, Y. Noviantari (eds.) *Proceed-ing Basic Science National Seminar 7* Vol.4. Universitas Brawijaya, Malang. (Article within conference proceeding)
- [5].Dean, R.G. 1990. Freak waves: A possible explanation. p. 1-65. *In* Torum, A., O.T. Gudmestad (eds). *Water wave kinetics*. CRC Press. New York. (Chapter in a Book)
- [6].Astuti, A.M. 2008. The Effect of Water Fraction of *Stellaria* sp. on the Content of TNF- α in Mice (*Mus musculus* BALB-C). Thesis. Department of Biology. University of Brawijaya. Malang. (Thesis)

CONCLUSION (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

Conclusion of the study's findings are written in brief, concise and solid, without more additional new interpretation. This section can also be written on research novelty, advantages and disadvantages of the research, as well as recommendations for future research. (Calibri 10 Justify)

ACKNOWLEDGEMENT (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

This section describes gratitude to those who have helped in substance as well as financially. (Calibri 10 Justify)

REFERENCES (Calibri 10 Bold, Left, Capslock)

- [1].(Calibri 10 Justify, citation labelling by references numbering)
- [2].Vander, A., J. Sherman., D. Luciano. 2001. *Human Physiology: The Mecanisms of Body Function*. McGraw-Hill Higher Education. New York. (Book)
- [3].Shi, Z., M. Rifa'i, Y. Lee, K. Isobe, H. Suzuki. 2007. Importance of CD80/CD86-CD28 interaction in the recognition of target cells by CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells. *Journal Immunology*. 124. 1:121-128. (Article in Journal)

Cover Images:

3D Structure of EGCG (*Epigallocatechin-3-Gallate*)
Green Tea Component

Created by:

Widodo, S.Si.,M.Si.,Ph.D MED Sc.

Address:

Building E, 2nd Floor, Graduate Program, University of Brawijaya

Jl. Mayor Jenderal Haryono 169, Malang, 65145

Telp: (0341) 571260 ; Fax: (0341) 580801

Email: jels@ub.ac.id

Web: jels.ub.ac.id

