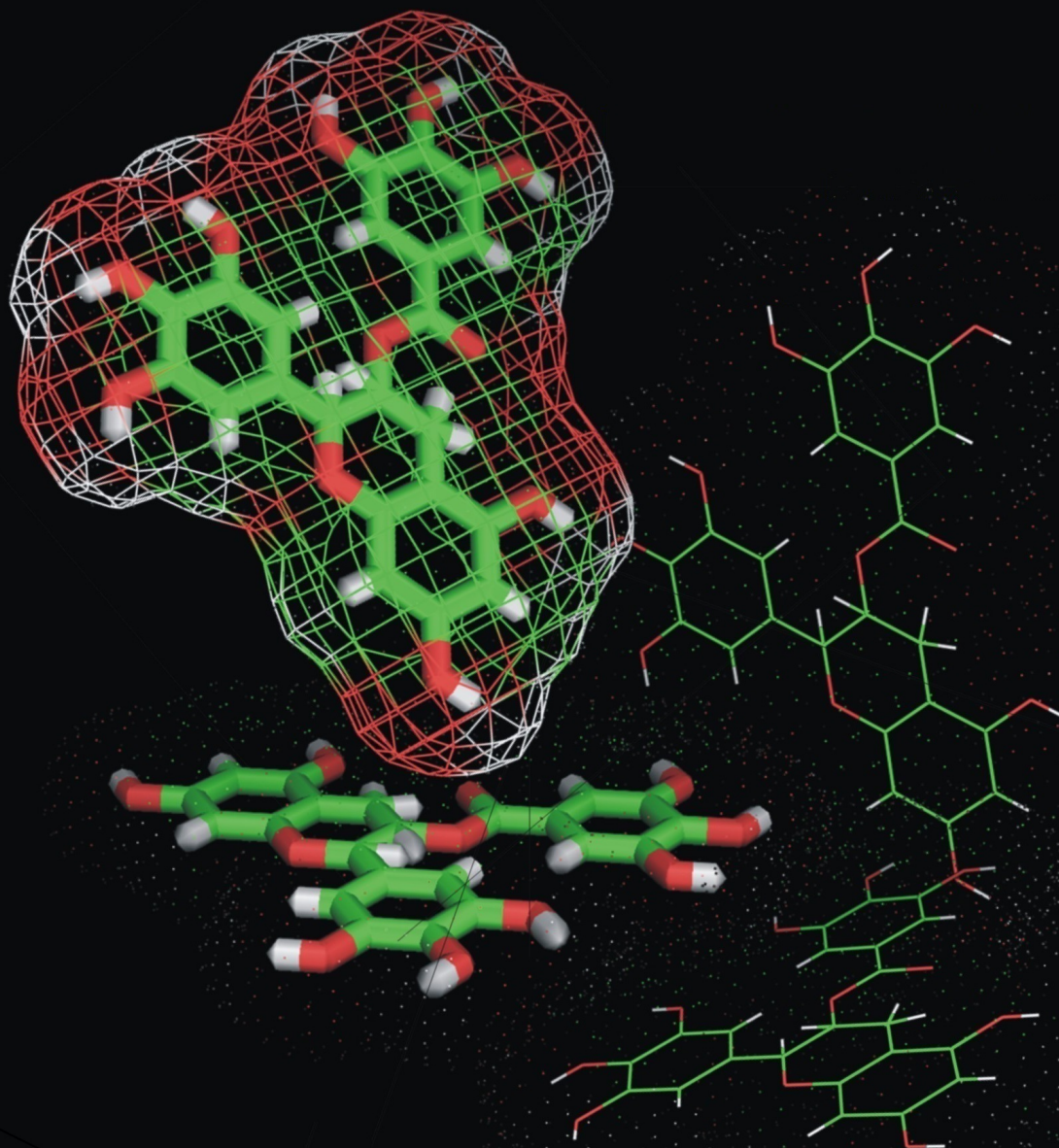


The Journal of  
**Experimental**  
Life Science

Discovering Living System Concept through Nano, Molecular and Cellular Biology



J. Exp. Life. Sci.	Vol 3	No. 2	page 45-88	December 2013
--------------------	-------	-------	------------	---------------

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

Jehan Ramdani Haryati, S.S.i, M.Si.

### Illustrator

M. Qomaruddin, S.Si.

### Address

The Journal of Experimental Life Science  
Building E, 2<sup>nd</sup> 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

**Kajian Penambahan Dosis Beberapa Pupuk Hijau dan Pengaruhnya Terhadap  
Pertumbuhan Tanaman Selada (*Lactuca sativa* L.)**

(Yuni Agung Nugroho, Yogi Sugito, Lily Agustina, Soemarno Soemarno) ..... 45-53  
DOI: <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2013.003.02.01>

**Efek Suplemen L-Arginin Subakut Peroral pada Kontraksi Aorta Tikus Diabetes**

(Sjarif Ismail, M. Mulyohadi Ali, Djoko W. Soeatmadji) ..... 54-64  
DOI: <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2013.003.02.02>

**Hambatan Prostaglandin pada Pemberian OAINS dan Non-OAINS Pasca Pemakaian  
Alat Ortodontik**

(Shanty Sintessa, H. M. Soemarko, Liliek Suprapti, Iwan Hernawan) ..... 65-75  
DOI: <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2013.003.02.03>

**Proteksi Kombinasi Minyak Wijen dan  $\alpha$ -tocopherol Terhadap Glomerular Injury  
Melalui Penghambatan Stres Oksidatif Tikus Hiperkolesterolemia**

(Dewi Sukmawati) ..... 76-88  
DOI: <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jels.2013.003.02.04>

## Kajian Penambahan Dosis Beberapa Pupuk Hijau dan Pengaruhnya Terhadap Pertumbuhan Tanaman Selada (*Lactuca sativa* L.)

Yuni Agung Nugroho<sup>1</sup>, Yogi Sugito<sup>2</sup>, Lily Agustina<sup>2</sup>, Soemarno<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Program pascasarjana, Universitas Brawijaya, Malang

<sup>2</sup> Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang

### Abstrak

Penambahan pupuk hijau pada budidaya selada anorganik bertujuan mendapatkan dosis beberapa pupuk hijau yang dapat meningkatkan pertumbuhan selada dan meningkatkan kesuburan tanah. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Kelompok diulang tiga kali. Pemberian pupuk urea dengan dosis 100 kg.ha<sup>-1</sup> sebagai kontrol. Perlakuan penambahan pupuk hijau adalah penambahan *Tithonia* 5 ton.ha<sup>-1</sup> (OT<sub>1</sub>), 10 ton.ha<sup>-1</sup> (OT<sub>2</sub>), *Tithonia* 15 ton.ha<sup>-1</sup> (OT<sub>3</sub>); penambahan *Gliricidia* 5 ton.ha<sup>-1</sup> (OG<sub>1</sub>), 10 ton.ha<sup>-1</sup> (OG<sub>2</sub>), 15 ton.ha<sup>-1</sup> (OG<sub>3</sub>); penambahan *Cromolaena* 5 ton.ha<sup>-1</sup> (OC<sub>1</sub>), 10 ton.ha<sup>-1</sup> (OC<sub>2</sub>), dan 15 ton.ha<sup>-1</sup> (OC<sub>3</sub>). Pengamatan tanaman selada meliputi Bobot Segar Tanaman, Bobot Kering Tanaman, Indeks Luas Daun, Laju Pertumbuhan Tanaman, dan Laju Asimilasi Bersih. Pengamatan tanah meliputi C organik tanah, N total, KTK, pH, Bobot Isi Tanah dan CN rasio. Analisa ragam dilakukan terhadap peubah pengamatan tanaman selada dan kesuburan tanah, uji Tukey dan uji kontras dilakukan bila ada pengaruh nyata perlakuan terhadap peubah pengamatan. Uji regresi linier berganda dilakukan terhadap sekumpulan peubah kesuburan tanah terhadap hasil tanaman selada. Hasil menunjukkan bahwa penambahan *Tithonia*, *Gliricidia* dan *Cromolaena* sebesar 5 ton.ha<sup>-1</sup> pada tanaman selada yang dipupuk urea meningkatkan indeks luas daun, bobot segar dan kering tanaman, dan laju pertumbuhan tanaman. Bobot segar tanaman selada tertinggi sebesar 17,18 ton.ha<sup>-1</sup> dicapai pada penambahan *Tithonia* 15 ton.ha<sup>-1</sup> yang berarti meningkat 88% dari pemupukan urea. Penambahan pupuk hijau *Tithonia*, *Gliricidia* dan *Cromolaena* sebesar 5 ton.ha<sup>-1</sup> pada budidaya selada meningkatkan KTK dan C organik tanah setelah panen. Residu C organik tanah tertinggi 2,97% meningkat 53,1% dan KTK tanah tertinggi 43,24 me.100g<sup>-1</sup> meningkat 14,75% dari kontrol oleh penambahan *Cromolaena* 15 ton.ha<sup>-1</sup>. KTK tanah, N total, Bobot Isi tanah, dan pH tanah berturut-turut mempunyai pengaruh positif dan nyata terhadap bobot segar tanaman saat panen.

**Kata kunci:** Pupuk hijau, pupuk buatan, tanaman selada.

### Abstract

Addition of green fertilizer for lettuce anorganic cultivation was aimed to determine the doses of several green fertilizers which can increase the growth of lettuce and soil fertility. We used Group Randomized Design with 3 replications. Urea fertilizer of 100 kg.ha<sup>-1</sup> dose as kontrol. The addition of green fertilizer are: *Tithonia* 5 ton.ha<sup>-1</sup> (OT<sub>1</sub>), 10 ton.ha<sup>-1</sup> (OT<sub>2</sub>), *Tithonia* 15 ton.ha<sup>-1</sup> (OT<sub>3</sub>); *Gliricidia* 5 ton.ha<sup>-1</sup> (OG<sub>1</sub>), 10 ton.ha<sup>-1</sup> (OG<sub>2</sub>), 15 ton.ha<sup>-1</sup> (OG<sub>3</sub>); *Cromolaena* 5 ton.ha<sup>-1</sup> (OC<sub>1</sub>), 10 ton.ha<sup>-1</sup> (OC<sub>2</sub>), and 15 ton.ha<sup>-1</sup> (OC<sub>3</sub>). Growth of lettuce were observed, include: fresh and dry weight, Index of leaf area, growth rate, and Net Assimilation Rate. Soil parameters include: C organic, N total, CEC, pH, bulk density and CN ratio. ANOVA was conducted on the variable of lettuce's growth and soil fertility, Tukey and Contrast Test applied if the treatment give significant effect on the observed parameter. Multiple linear regression was applied on the variable of soil fertility towards the growth of lettuce. Results showed the addition of *Tithonia*, *Gliricidia* and *Cromolaena* for 5 ton.ha<sup>-1</sup> on anorganic lettuce increase the leaf area index, fresh and dry weight, and growth rate. Highest fresh weight is 17.18 ton.ha<sup>-1</sup> on the addition of 15 ton.ha<sup>-1</sup> *Tithonia* which implied 88% increasing from control. The addition of *Tithonia*, *Gliricidia* and *Cromolaena* for 5 ton.ha<sup>-1</sup> on lettuce cultivation increases CEC and C organic of soil after harvest. Highest residue of C organic for 2.97% means increasing of 53,1% and highest CEC for 43.24 me.100g<sup>-1</sup> which increased 14.75% compare to control, obtained from the treatment of *Cromolaena* 15 ton.ha<sup>-1</sup>. Soil's CEC, N total, bulk density, and pH have positive and significant effect on fresh weight at harvest time, respectively.

**Keywords:** artificial fertilizer, green fertilizer, lettuce.

### PENDAHULUAN

Selada merupakan tanaman introduksi yang sudah beradaptasi di Indonesia, dan mempunyai

prospek ekonomi cukup tinggi. Prospek cerah tersebut ditunjukkan oleh beberapa hal, yaitu harga selada yang relatif tinggi, pasar yang cukup luas dan manfaat selada bagi manusia karena mengandung vitamin A, B1, dan C.

Pembudidayaan selada dilakukan petani dengan penerapan teknologi sarat bahan kimia, utamanya adalah pemanfaatan pupuk anorganik. Pemakaian pupuk anorganik secara terus-

\* Alamat Korespondensi:

Soemarno

Email : smno@ub.ac.id

Alamat : Program Pascasarjana, Universitas Brawijaya, Jl. Mayjen Haryono No. 169 Malang 65145

menerus pada lahan pertanian tanpa diimbangi pemberian bahan organik yang memadai ke dalam tanah, berdampak pada penurunan produktifitas tanah, dikarenakan menurunnya kesuburan tanah secara menyeluruh, yaitu kesuburan kimia, fisik dan biologi. Perkembangan konsumsi pupuk kimiawi di Indonesia terus meningkat sejak tahun 1975 hingga sekarang. Selama kurun waktu 20 tahun terakhir, terjadi kenaikan penggunaan pupuk kimiawi hampir 5 kali lipat, sementara produksi pertanian untuk tanaman pangan dimana pupuk tersebut digunakan hanya meningkat 50 persen. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan pupuk anorganik sudah tidak efisien dan bahkan terjadi penurunan produktifitas lahan karena menurunnya kandungan bahan organik tanah [1].

Sistem pertanian modern menuntut adanya penggunaan lahan secara intensif tanpa memperhatikan masukan bahan organik, sehingga ketersediaan bahan organik tanah cepat mengalami penurunan maka degradasi penurunan kesuburan tanah banyak terjadi. Kandungan bahan organik di sebagian besar lahan di Jawa berada di bawah 2%, padahal tanah subur mensyaratkan kandungan bahan organik tanah berkisar dari 2,5 % sampai dengan 4 %.

Bahan organik merupakan penyangga biologi yang mempunyai fungsi dalam memperbaiki sifat-sifat fisik, kimia dan biologi tanah, sehingga tanah dapat menyediakan unsur hara dalam jumlah berimbang. Terdapat korelasi positif antara kadar bahan organik dengan produktifitas tanah. Bahan organik juga berfungsi sebagai sumber bahan energi bagi mikrobia [2,3]. Di daerah produsen selada yang ketersediaan pupuk kandangnya terbatas, menjadi pembatas dalam pemberian bahan organik, sehingga perlu dilakukan penambahan bahan organik dalam bentuk lain yang didukung oleh potensi bahan organik tersebut di daerah. Pemanfaatan sisa tanaman potensial asli daerah sebagai pupuk hijau merupakan salah satu alternatif untuk mensuplai bahan organik tanah. Kecepatan pelapukan suatu jenis bahan organik ditentukan oleh kualitas bahan organik tersebut. Kualitas bahan organik berkaitan dengan kecepatan penyediaan dan besarnya unsur hara N, ditentukan oleh besarnya kandungan N, lignin, dan polifenol. Bahan organik dikatakan berkualitas tinggi apabila mempunyai N > 2,5 %, lignin < 15 %, dan polifenol < 4% [4].

## METODE PENELITIAN

Penelitian disusun menggunakan Rancangan Acak Kelompok dimana terdapat sepuluh perlakuan, masing-masing perlakuan diulang tiga kali (Tabel 1). Penelitian dilakukan di lapang dimana penyemaian benih dilakukan pada bedengan dengan menambahkan pupuk kandang pada tanah. Pemindahan tanaman dilakukan pada saat bibit berumur 3 minggu setelah sebar. Pemindahan bibit ke bedengan dilakukan setelah bibit berumur 3 minggu. Bibit yang ditanam dipilih yang seragam. Setiap lubang tanam, ditanami satu bibit dengan jarak tanam 25 cm x 25 cm. Pupuk urea diberikan untuk semua perlakuan pada saat tanaman berumur 1 MSPT, dengan dosis Urea 100 kg.ha<sup>-1</sup>. Pupuk organik (pupuk hijau) diberikan dalam bentuk segar yang dipotong-potong dengan ukuran 2 cm, pada saat dua minggu sebelum tanam dengan dosis sesuai perlakuan.

Tabel . Rancangan penelitian

Kelompok	Perlakuan		
	Jenis Pupuk	Pupuk hijau ton.ha <sup>-1</sup>	N kg.ha <sup>-1</sup>
An	Urea	-	46,000
OT <sub>1</sub>	<i>T.diversifolia</i>	5	82,494
OT <sub>2</sub>	<i>T.diversifolia</i>	10	118,988
OT <sub>3</sub>	<i>T.diversifolia</i>	15	155,482
OG <sub>1</sub>	<i>G.sepium</i>	5	85,160
OG <sub>2</sub>	<i>G.sepium</i>	10	123,952
OG <sub>3</sub>	<i>G.sepium</i>	15	162,928
OC <sub>1</sub>	<i>C.odorata</i>	5	76,970
OC <sub>2</sub>	<i>C.odorata</i>	10	107,940
OC <sub>3</sub>	<i>C.odorata</i>	15	161,910

Pemeliharaan tanaman dilakukan dengan menggunakan pestisida organik apabila tanaman menunjukkan gejala serangan organisme pengganggu tanaman. Gulma dikendalikan secara mekanis. Pengairan diberikan apabila tanah sudah berkurang kelembabannya, sehingga tanah selalu dalam keadaan lembab.

Pengamatan penelitian dilakukan terhadap tanaman secara non destruktif dan destruktif. Pengamatan terhadap tanaman secara non destruktif dilakukan 1 minggu setelah tanam dengan interval satu minggu sekali, terhadap peubah sebagai berikut : Bobot segar tanaman pada saat panen, dengan satuan gram. Bobot kering tanaman pada saat panen, dengan satuan gram. Luas daun pada saat panen, diukur dengan leaf area meter, satuan cm<sup>2</sup>.

Pengamatan destruktif dilakukan terhadap peubah sebagai berikut : Luas daun diukur dengan leaf area meter, satuan cm<sup>2</sup>. Penga-

matan dilakukan pada saat tanaman berumur 2 dan 3 minggu setelah pindah tanam, dengan satuan cm<sup>2</sup>. Bobot segar tanaman, pengamatan dilakukan pada umur 2 dan 3 minggu setelah pindah tanam, dengan satuan gram (g). Bobot kering tanaman, pengamatan dilakukan pada umur 2 dan 3 minggu setelah pindah tanam, dengan satuan gram (g).

Pengamatan terhadap media tanam (tanah) dilakukan dalam tiga kategori, yaitu pada saat sebelum penanaman, pada saat tanaman berumur 2 minggu setelah pindah tanam, dan pada saat setelah panen.

Pengamatan sebelum tanam meliputi: Kandungan Nitrogen, kandungan bahan organik tanah, kapasitas Tukar kation. Adapun variabel tanah yang diamati pada saat tanaman berumur 3 minggu setelah pindah tanam adalah Kandungan Nitrogen meliputi (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub> dan N total), KTK, PH dan variabel tanah yang diamati pada saat setelah panen adalah kandungan bahan organik tanah, N total, dan KTK.

#### Analisis data

Analisa ragam dilakukan terhadap peubah berat segar tanaman, berat kering, luas daun, laju pertumbuhan tanaman dan laju asimilasi bersih, pada nilai  $\alpha = 5\%$ . Apabila perlakuan memberikan pengaruh yang nyata terhadap peubah pengamatan, maka dilakukan uji pembandingan, dengan Uji Beda Nyata Jujur. Pembandingan antara kontrol dengan perlakuan dilakukan secara ortogonal kontras, untuk mengetahui pengaruh penambahan pupuk hijau terhadap pertumbuhan selada.

#### Analisis Pertumbuhan Tanaman

##### Indek Luas Daun

Indek Luas Daun adalah perbandingan luas daun total dengan luas tanah yang ditutupi. Persamaan indek luas daun adalah :

$$ILD = LD : LT$$

Keterangan :

ILD = Indek Luas daun

LD = Luas Daun pada saat pengamatan

LT = Luasan Tanah dari jarak tanam selada

##### Laju Asimilasi Bersih

Laju Asimilasi Bersih (LAB) = *Net assimilation rate* (NAR) adalah parameter pertumbuhan yang menunjukkan kemampuan daun dalam menghasilkan bahan kering total tanaman per satuan luas daun yang dihasilkan per satuan waktu.

Rumus yang dinyatakan oleh Hunt [5] sebagai berikut :

$$LAB = \frac{W_2 - W_1}{T_2 - T_1} \cdot \frac{\ln LD_2 - \ln LD_1}{LD_2 - LD_1}$$

Keterangan :

W<sub>1</sub> = Bobot kering tanaman saat pengamatan satu

W<sub>2</sub> = Bobot kering tanaman saat pengamatan dua

T<sub>1</sub> = Umur tanaman pada saat pengamatan satu

T<sub>2</sub> = Umur tanaman pada saat pengamatan dua

LD<sub>1</sub> = Luas daun pada pengamatan satu

LD<sub>2</sub> = Luas daun pada pengamatan dua

#### Crop Growth Rate

Laju Pertumbuhan tanaman atau *Crop Growth Rate* (CGR) menurut Hunt [5] dapat dinyatakan sebagai nilai rata-rata pertumbuhan tanaman yang dihitung tanpa mendasarkan nilai laju asimilasi bersih dan indek luas daun, dengan persamaan sebagai berikut:

$$LPT = \frac{1}{LT} \cdot (W_2 - W_1)$$

Keterangan :

W<sub>1</sub> = Berat Segar tanaman saat pengamatan satu

W<sub>2</sub> = Berat Segar tanaman saat pengamatan dua

LT = Luas Tanah

T<sub>1</sub> = Umur tanaman pada saat pengamatan satu

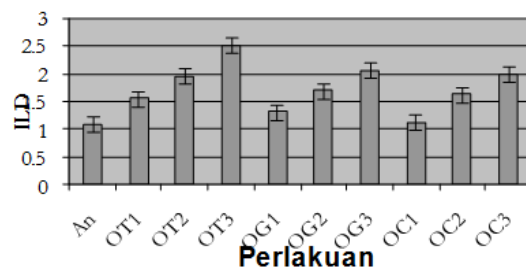
T<sub>2</sub> = Umur tanaman pada saat pengamatan dua

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pertumbuhan Tanaman Selada

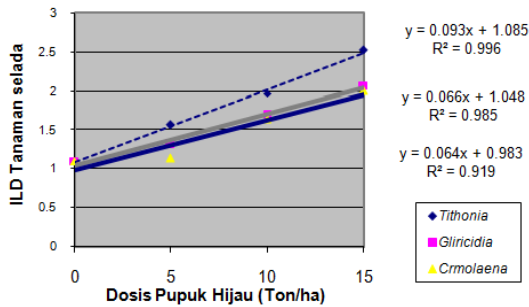
Perlakuan memberikan pengaruh nyata terhadap: indek luas daun selada pada umur 3 MSPT, 4 MSPT dan 5 MSPT. Terhadap bobot segar dan kering total tanaman selada pada semua umur pengamatan. Pembandingan ortogonal kontras menunjukkan penambahan 5 ton.ha<sup>-1</sup> pupuk hijau mampu meningkatkan secara nyata terhadap indek luas daun pada umur 3 MSPT, 4 MSPT dan 5 MSPT, bobot segar dan bobot kering tanaman pada umur 2 MSPT, 3 MSPT, 4 MSPT, dan 5 MSPT.

Perlakuan OT<sub>3</sub> menghasilkan nilai tertinggi terhadap indeks luas daun umur 3, 4, dan 5 MSPT. Rata-rata ILD pada saat panen ditunjukkan pada Gambar 1.



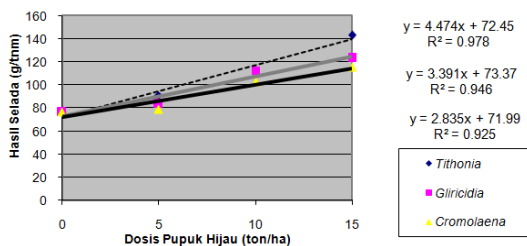
Gambar 1. Rata-rata ILD pada saat panen

Penambahan 5 ton.ha<sup>-1</sup> pupuk hijau dapat meningkatkan indek luas daun pada saat panen sebesar 0,239. Hasil analisa regresi menunjukkan adanya hubungan antara indek luas daun selada dengan dosis pupuk hijau pada saat panen. *Tithonia* menunjukkan pengaruh lebih tinggi untuk setiap dosis yang diujikan dibanding dengan pupuk hijau lainnya. Hubungan ILD dengan dosis pupuk hijau ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hubungan ILD dengan dosis pupuk hijau

Nilai bobot segar tertinggi pada umur 3 dan 5 MSPT diberikan oleh OT<sub>3</sub>, sedangkan pada umur 4 MSPT, perlakuan OT<sub>3</sub> tidak berbeda nyata dengan perlakuan OT<sub>2</sub>, OG<sub>3</sub>, dan OC<sub>3</sub>. Hasil analisa regresi menunjukkan adanya hubungan antara bobot segar selada dengan dosis pupuk hijau pada saat panen. Peningkatan dosis pupuk hijau yang diberikan masih memberikan peningkatan bobot segar tanaman selada, dosis 15 ton.ha<sup>-1</sup> memberikan bobot segar tertinggi diantara dosis yang diujikan. Hubungan bobot segar tanaman selada dengan dosis pupuk hijau ditunjukkan pada Gambar 3.



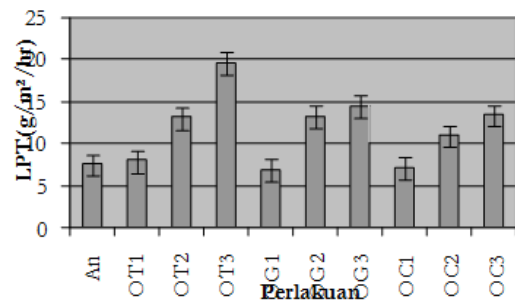
Gambar 3. Hubungan BS dengan dosis pupuk hijau

Perlakuan OT<sub>3</sub> memberikan nilai bobot kering tertinggi pada umur 5 MSPT, namun tidak berbeda nyata dengan OT<sub>2</sub>, OG<sub>3</sub> dan OC<sub>3</sub> pada umur 4 MSPT. Peningkatan indek luas daun pada perlakuan penambahan pupuk hijau merupakan respon tanaman karena adanya kecukupan kebutuhan hidup sehingga tanaman mampu membentuk organ tubuh lebih banyak, termasuk

organ fotosintesis. Indek luas daun yang tinggi menjadikan tanaman mempunyai kemampuan yang lebih tinggi dalam penangkapan cahaya matahari, dan mempunyai jumlah klorofil yang lebih banyak sehingga mampu melakukan kegiatan fotosintesis lebih tinggi, hasil selanjutnya adalah jumlah fotosintat tinggi, digunakan untuk membentuk dan mengisi jaringan tanaman sehingga tanaman selada mempunyai berat segar dan berat kering yang lebih tinggi. Sumbangan relatif keempat komponen cahaya; irradiasi langsung, radiasi difusi, refleksi dan transmisi tergantung pada jumlah dan tipe daun di dalam kanopi [6]. Jumlah tersebut biasanya dinyatakan sebagai indeks luas daun (ILD), yaitu suatu parameter tanpa satuan yang menunjukkan luas permukaan daun yang menutupi satu satuan luas tanah.

### Laju Pertumbuhan Tanaman

Perlakuan memberikan pengaruh nyata pada laju pertumbuhan tanaman dalam selang 3-4 MSPT dan 4-5 MSPT. Kombinasi perlakuan *Tithonia* dengan dosis 15 ton.ha<sup>-1</sup> (OT<sub>3</sub>) menghasilkan nilai tertinggi laju pertumbuhan tanaman dalam selang 4-5 MSPT, sedangkan pada selang 3-4 MSPT OT<sub>3</sub> tidak berbeda nyata dengan perlakuan lainnya kecuali dengan OC<sub>1</sub> (*Cromolaena* dengan dosis 5 ton.ha<sup>-1</sup>). Rata-rata laju pertumbuhan tanaman pada selang 4-5 MSPT ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 4. Laju pertumbuhan tanaman selada pada 4-5 MSPT

Pembandingan kontras antara kontrol dengan penambahan pupuk hijau menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata terhadap laju pertumbuhan tanaman. Peningkatan laju pertumbuhan tanaman akibat penambahan pupuk hijau sebesar sebesar 0,379 g.m<sup>-2</sup>.hari<sup>-1</sup> dan 1,814 g.m<sup>-2</sup>.hari<sup>-1</sup> pada selang umur 2-3 MST dan 3-4 MST.



### Laju Asimilasi Bersih

Perlakuan memberikan pengaruh nyata terhadap laju asimilasi bersih pada selang 3-4 MSPT dan 4-5 MSPT. Perbandingan laju asimilasi bersih pada selang 4-5 MSPT ditunjukkan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil perbandingan rata-rata laju asimilasi bersih umur 4-5 MSPT

No	Perlakuan	Laju Asimilasi Bersih (g.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> )
1	An	7,110 <sup>ab</sup>
2	OT <sub>1</sub>	5,553 <sup>a</sup>
3	OT <sub>2</sub>	7,441 <sup>ab</sup>
4	OT <sub>3</sub>	8,503 <sup>b</sup>
5	OG <sub>1</sub>	5,536 <sup>a</sup>
6	OG <sub>2</sub>	8,095 <sup>b</sup>
7	OG <sub>3</sub>	7,482 <sup>ab</sup>
8	OC <sub>1</sub>	6,697 <sup>ab</sup>
9	OC <sub>2</sub>	7,399 <sup>ab</sup>
10	OC <sub>3</sub>	7,524 <sup>ab</sup>

Keterangan :

Angka yang didampingi huruf berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan diantara perlakuan pada uji Tukey dengan taraf  $\alpha = 0,05$ .

Nilai laju pertumbuhan tanaman dan indeks luas daun semakin tinggi sebagai akibat semakin besar dosis dan semakin baik kualitas pupuk hijau yang dipergunakan. Hal ini sesuai dengan hasil analisa komponen utama pada komponen utama 1 yang menunjukkan bahwa ILD, BK5 dan LPT tanaman memberikan sumbangan yang relatif sama yaitu: 0.546, 0,537, dan 0.536 terhadap pertumbuhan dan hasil tanaman selada. Semakin baik kualitas pupuk hijau maka semakin cepat proses dekomposisi dan mineralisasi sehingga mampu melepas unsur hara lebih cepat, maka kondisi ini mendukung pemenuhan kebutuhan unsur hara tanaman selada sejak awal yaitu sejak pindah tanam. Hal ini menunjukkan bahwa pupuk hijau dengan kualitas tinggi yang dipadukan dengan dosis 15 ton.ha<sup>-1</sup> mampu mencapai sinkronisasi antara ketersediaan unsur hara oleh media tanam bersamaan dengan kebutuhan unsur hara oleh tanaman selada. Hal ini dibuktikan dari pencapaian nilai tertinggi pada saat panen oleh kombinasi perlakuan antara *Tithonia* dengan dosis 15 ton.ha<sup>-1</sup> terhadap nilai berat segar, berat kering, luas daun, indeks luas daun dan laju pertumbuhan tanaman.

Laju asimilasi bersih mempunyai pola yang berbeda dengan laju pertumbuhan tanaman. Laju asimilasi bersih merupakan jumlah total CO<sub>2</sub> yang diambil tanaman dalam peristiwa fotosintesis dikurangi dengan CO<sub>2</sub> yang hilang melalui respirasi jadi tidak semata-mata dihitung berda-

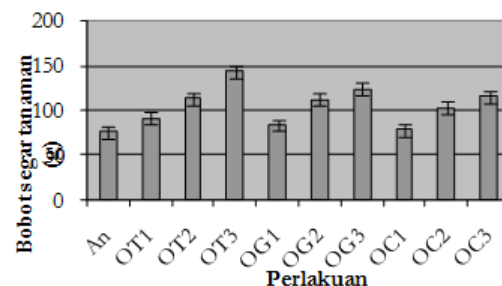
sarkan kemampuan daun untuk menghasilkan bahan kering persatuan waktu, sehingga semakin tinggi luas daun belum tentu mampu menghasilkan berat kering tanaman yang tinggi persatuan luas daun yang ada [7].

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan yang mampu memberikan nilai luas daun tinggi tidak diikuti dengan nilai laju asimilasi bersih yang tinggi. Pertumbuhan tanaman budidaya dengan meningkatnya indek luas daun, makin banyak daun yang terlindung, menyebabkan penurunan laju asimilasi bersih sepanjang musim pertumbuhan [8]. Pada tajuk dengan indek luas daun tinggi, daun muda pada puncak tanaman menyerap radiasi paling banyak, memiliki laju asimilasi bersih ke bagian tumbuhan yang lain. Sebaliknya, daun-daun yang lebih tua pada dasar tajuk dan terlindung mempunyai laju asimilasi CO<sub>2</sub> yang rendah dan memberikan lebih sedikit hasil asimilasi kepada bagian tumbuhan yang lain.

Perlakuan yang mampu meningkatkan luas daun akan semakin meningkatkan nilai laju pertumbuhan tanaman, karena laju pertumbuhan tanaman dihitung berdasarkan luas tanah yang ditumbuhi tanaman tersebut (jarak tanamnya) sehingga faktor pembagi mempunyai nilai tetap, pada hal disisi lain nilai berat kering tanaman semakin naik dengan semakin tingginya luas daun. Namun laju asimilasi bersih pada perlakuan yang mempunyai nilai luas daun tinggi akan mampu menghasilkan berat kering tanaman total lebih tinggi. Hal ini dikarenakan berat kering total merupakan hasil kemampuan luas daun total dikalikan dengan kemampuan persatuan luas daun dalam laju asimilasi bersih.

### Hasil Tanaman

Bobot segar dan kering tanaman selada pada saat panen dipengaruhi secara nyata oleh perlakuan. Perlakuan OT<sub>3</sub> (*Tithonia* dosis 15 ton.ha<sup>-1</sup>) memberikan hasil tertinggi pada bobot segar dan kering pada saat panen (Gambar 5).



**Gambar 5.** Bobot segar tanaman saat panen

Pembandingan kontras antara kontrol dengan pemberian pupuk hijau menunjukkan bahwa penambahan pupuk hijau 5 ton.ha<sup>-1</sup> dapat meningkatkan bobot segar dan bobot kering secara nyata pada saat panen yaitu sebesar 8,210 g dan 0,974 g. Hasil analisis komponen utama menunjukkan bahwa variabel pengamatan mempunyai sumbangan yang relatif sama yaitu ILD = 0,546, BK5 = 0,537, dan LPT = 0,536, sedangkan laju asimilasi bersih memberikan pengaruh lebih rendah dan berbanding terbalik dengan variabel pertumbuhan lainnya, yaitu sebesar -0.354 (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa variabel pertumbuhan tersebut mempunyai peran yang sama dalam mendukung pertumbuhan dan hasil tanaman selada. Namun nilai laju asimilasi bersih lebih rendah sumbangannya terhadap hasil tanaman, karena nilai ini masih harus dikalikan dengan luas daun total tanaman untuk mendapatkan berat kering total tanaman.

**Tabel 2.** Analisis Komponen Utama

Proportion	0.827	0.171	0.003	0.000
Cumulative	0.827	0.997	1.000	1.000
Variable	PC1	PC2	PC3	PC4
ILD	0,546	-0,092	0,830	0,061
LPT	0,536	-0,264	-0,328	-0,731
LAB	-0,354	-0,926	0,129	0,017
BK5	0,537	-0,253	-0,431	0,679

Luas daun dan indek luas daun memberikan sumbangan lebih besar dibandingkan dengan variabel lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan pertumbuhan dan hasil tanaman didasarkan oleh kemampuan daun untuk berfotosintesis, sehingga daun yang lebih luas akan mampu menghasilkan fotosintat yang lebih tinggi. Sebagai buktinya adalah pada perlakuan yang memberikan nilai luas daun dan indek luas daun tinggi mampu menghasilkan berat kering dan berat segar panen yang tinggi pula. Suatu ukuran yang dapat membantu menentukan infestasi produktif tanaman yaitu suatu ukuran yang sangat penting dalam proses pertumbuhan tanaman yaitu daun [7]. Daun merupakan produsen fotosintat paling penting dalam tanaman secara umum, dan intersepsi cahaya dan fotosintesa tergantung sebagian besar pada luas daun.

#### Kesuburan Tanah

Pemberian pupuk hijau dengan dosis 15 ton.ha<sup>-1</sup> mampu meningkatkan bahan organik

tanah, N total tanah, dan KTK pada saat setelah panen dari kondisi awal sebelum penanaman, maupun terhadap kontrol pada saat yang sama. Pupuk hijau yang kualitasnya lebih rendah memberikan sumbangan yang lebih besar terhadap kandungan bahan organik tanah, N total tanah, KTK, dan penurunan bobot isi tanah pada saat setelah panen.

Perlakuan memberikan pengaruh yang nyata terhadap C organik tanah pada saat setelah panen. OC<sub>3</sub> (*Cromolaena* dosis 15 ton.ha<sup>-1</sup>) memberikan sumbangan C organik tanah paling tinggi dibandingkan dengan semua kombinasi perlakuan yang diujikan. Pengaruh masing-masing kombinasi perlakuan terhadap C organik tanah ditunjukkan pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Hasil pembandingan rata-rata C organik tanah akibat perlakuan pada saat setelah panen

No.	Perlakuan	C organik tanah (%)	
1	An	1,460	a
2	OT <sub>1</sub>	1,500	a
3	OT <sub>2</sub>	1,620	b
4	OT <sub>3</sub>	2,030	de
5	OG <sub>1</sub>	1,520	a
6	OG <sub>2</sub>	1,720	c
7	OG <sub>3</sub>	2,103	e
8	OC <sub>1</sub>	1,740	c
9	OC <sub>2</sub>	1,970	d
10	OC <sub>3</sub>	2,230	f

Keterangan :

Angka yang didampingi huruf berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan diantara perlakuan pada uji Tukeys dengan taraf  $\alpha = 0,05$ .

Perlakuan memberikan pengaruh yang nyata terhadap KTK tanah pada saat setelah panen. Perlakuan OC<sub>3</sub> (*Cromolaena* dengan dosis 15 ton.ha<sup>-1</sup>) memberikan nilai KTK tanah tertinggi. Pembandingan rata-rata KTK tanah akibat perlakuan ditunjukkan pada Tabel 4.

Bahan organik merupakan penyangga biologi yang mempunyai fungsi dalam memperbaiki sifat-sifat fisik, kimia dan biologi tanah, sehingga tanah dapat menyediakan unsur hara dalam jumlah berimbang. Terdapat korelasi positif antara kadar bahan organik dengan produktifitas tanah. Bahan organik juga berfungsi sebagai sumber bahan energi bagi mikrobia [2].

Bahan organik merupakan salah satu komponen tanah yang sangat penting bagi ekosistem tanah, dimana bahan organik merupakan sumber dan pengikat hara dan sebagai substrat bagi mikroba tanah [9]. Mineralisasi bahan organik dapat meningkatkan

ketersediaan hara tanah dan nilai kapasitas tukar kation tanah, sehingga kehilangan hara melalui proses pencucian dapat dikurangi.

**Tabel 4.** Hasil perbandingan rata-rata KTK tanah akibat perlakuan pada saat setelah panen

No.	Perlakuan	KTK tanah (me.100g <sup>-1</sup> )	
1	An	29,84	a
2	OT <sub>1</sub>	30,64	b
3	OT <sub>2</sub>	31,25	c
4	OT <sub>3</sub>	32,85	de
5	OG <sub>1</sub>	30,46	b
6	OG <sub>2</sub>	32,64	d
7	OG <sub>3</sub>	33,23	e
8	OC <sub>1</sub>	30,72	b
9	OC <sub>2</sub>	33,10	de
10	OC <sub>3</sub>	34,24	f

Keterangan :

Angka yang didampingi huruf berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan diantara perlakuan pada uji Tukeys dengan taraf  $\alpha = 0,05$

*Cromolaena odorata* dengan kandungan C organik tinggi menyebabkan paling lambat dalam dekomposisi, sehingga memberikan sumbangan C organik tanah lebih tinggi daripada *Tithonia* dan *Gliricidia*. Kecepatan dekomposisi bahan organik berkorelasi sangat nyata dengan kandungan C organik namun tidak berkorelasi nyata dengan parameter kualitas bahan organik lainnya [10]. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan C organik pada bahan organik akan menurunkan kecepatan dekomposisi. Bahan organik dengan kandungan C organik yang tinggi menunjukkan banyaknya fraksi tahan lapuk dalam pangkasan.

*Tithonia* dan *Gliricidia* memberikan sumbangan C organik kedalam tanah lebih kecil. Biomasa bahan organik dengan kualitas tinggi akan cepat habis terdekomposisi dan sedikit meningkatkan bahan organik tanah dikarenakan sedikitnya bahan tahan lapuk dalam biomasa bahan organik [10].

*Cromolaena odorata* merupakan pupuk hijau yang dapat meningkatkan nilai KTK tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Hal ini dikarenakan bahan organik ini merupakan bahan organik yang lambat terdekomposisi sehingga dapat meningkatkan kandungan bahan organik tanah yang pada giliran berikutnya akan meningkatkan KTK. Faktor yang mempengaruhi peningkatan KTK selain jenis dan jumlah liat adalah kandungan bahan organik tanah [11].

Perlakuan pemberian biomasa bahan organik akan meningkatkan koloid organik tanah yang

terdiri dari C, O dan H yang memiliki daya jerap kation yang lebih tinggi dibandingkan liat. Peningkatan KTK menunjukkan peningkatan kemampuan tanah dalam mengikat dan menyediakan unsur hara yang lebih baik bagi tanaman. KTK tanah yang tinggi akan melindungi unsur hara dalam larutan tanah dari pencucian akibat perkolasi air. Unsur hara yang berada dalam kompleks jerapan koloid tidak mudah tercuci ke lapisan tanah yang lebih dalam [12]. *Cromolaena odorata* mampu menurunkan bobot isi tanah paling tinggi. Hal ini dikarenakan kandungan bahan tahan lapuk yang lebih tinggi sehingga bahan organik menjadi lebih lambat untuk didekomposisi, sehingga mempunyai waktu tinggal dalam tanah lebih lama.

#### Pertumbuhan dan Hasil Tanaman Selada dengan Kesuburan Tanah

Pertumbuhan dan hasil tanaman selada yang baik membutuhkan kondisi tanah yang baik secara biologi, kimia maupun fisiknya. Pemberian pupuk hijau dengan dosis dan jenis yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda terhadap kesuburan tanah. Hal ini dikarenakan setiap jenis pupuk hijau yang mempunyai kandungan C organik, N organik, CN ratio, lignin dan polifenol akan menentukan proses dekomposisi dan mineralisasi bahan organik tersebut yang pada giliran selanjutnya adalah peningkatan kandungan bahan organik tanah yang diidentifikasi dari C organik tanah. Peningkatan efisiensi pemanfaatan pupuk atau hara ditunjukkan dengan nilai KTK, reaksi tanah dengan pH tanah. Sumbangan hara N dengan identifikasi N total tanah dan kegemburan tanah dengan bobot isi tanah.

Pupuk hijau dapat memperbaiki sifat fisik dan kimia tanah, peningkatan pH, peningkatan KTK, peningkatan serapan P dan menurunkan AL di tanah. Dengan pupuk hijau dapat meningkatkan kesuburan tanah dalam pola tanam dan dapat meningkatkan biomas dan produksi tanaman pangan [13]. Pupuk hijau dengan kualitas tinggi seperti *Tithonia* dan *Gliricidia* yang dipadukan dengan dosis 15 ton.ha<sup>-1</sup> memberikan sumbangan hara N, pertumbuhan dan hasil tanaman selada yang lebih tinggi dibandingkan dengan *Cromolaena*. Takaran pupuk hijau berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan, berat pipilan kering dan berat basah jagung [14].

Perbedaan sumbangan hara N, pertumbuhan dan hasil tanaman selada akibat perlakuan macam dan dosis pupuk hijau disebabkan adanya perbedaan kandungan N dan C organik pada

pupuk hijau tersebut. *Tithonia* mengandung N sebesar 5,14% dan C organik sebesar 34,45%, *Gliricidia* mengandung 38,28% C dan 4,06% N. Sedangkan *Cromolaena* mengandung 40,24% C dan 3,8% N. Sehingga *Tithonia* mengandung N tertinggi dan C organik terendah. Karakteristik ini menyebabkan *Tithonia* mempunyai proses dekomposisi lebih cepat. Kecepatan dekomposisi bahan organik berkorelasi sangat nyata dengan kandungan C organik namun tidak berkorelasi nyata dengan parameter kualitas bahan organik lainnya [10]. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan C organik pada bahan organik akan menurunkan kecepatan dekomposisi. Bahan organik dengan kandungan C organik yang tinggi menunjukkan banyaknya fraksi tahan lapuk dalam pangkasan.

*Tithonia* mempunyai kandungan N yang tinggi sehingga melepas N lebih tinggi ke dalam tanah. Sebagaimana ditunjukkan oleh hasil analisa tanah 3 MSPT yang menunjukkan kandungan N total tanah lebih rendah akibat pemupukan *Tithonia* dan *Gliricidia*. Namun kandungan  $\text{NH}_4$  dan  $\text{NO}_3$  lebih tinggi dibandingkan *Cromolaena*. Tingginya kandungan  $\text{NH}_4$  dan  $\text{NO}_3$  pada saat 3 MSPT disebabkan adanya pemupukan Urea pada saat tanaman berumur 1 MSPT. Keberadaan bahan organik yang meningkatkan KTK sehingga  $\text{NH}_4$  dan  $\text{NO}_3$  tidak mudah hilang karena pencucian. Kandungan N tanah setelah panen akibat pemupukan *Tithonia* lebih rendah dibandingkan dengan *Gliricidia* dan *Cromolaena*. Namun N total yang ditemukan dalam jaringan tanaman selada akibat perlakuan *Tithonia* lebih tinggi apabila dibandingkan dengan pupuk hijau yang lain. Hal ini menunjukkan bahwa kecepatan pelepasan dan jumlah N oleh *Tithonia* lebih sinkron dengan kebutuhan tanaman selada.

Laju mineralisasi nitrogen juga dikendalikan oleh kandungan N total tanah, lamanya inkubasi dan temperatur inkubasi [15]. Ketiga faktor ini memberikan pengaruh positif terhadap laju mineralisasi N. Selain itu, penambahan urea pada tanah akan mempercepat mineralisasi N [15]. Perbedaan kandungan C organik tanah akan mengendalikan perbedaan tambahan kecepatan akibat penambahan urea ini.

*Cromolaena* menyumbang nilai yang lebih tinggi pada KTK, N total, C organik dan penurunan bobot isi tanah dibanding *Tithonia* dan *Gliricidia* pada saat setelah panen. Hal ini disebabkan *Cromolaena* mempunyai kecepatan dekomposisi lebih rendah sehingga bahan tahan lapuk pada bahan organik ini, lebih lama tinggal di dalam tanah yang selanjutnya akan menaikkan

C organik tanah, KTK, N total tanah dan menurunkan bobot isi tanah. N total tanah akibat penambahan *Cromolaena* ditemukan lebih tinggi pada saat setelah panen, karena pelepasan N oleh bahan organik ini lebih lama. Sehingga pada saat akhir panen pelepasan N akumulasinya tinggi. Sedangkan pupuk hijau yang lain, N yang dilepaskan sudah dimanfaatkan oleh tanaman atau hilang. Hal ini serupa dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa pemberian bahan organik pada lahan kering berupa kompos dan sisa-sisa tanaman dalam tiga tahun memperbaiki sifat tanah [16,17] yaitu menurunkan kepadatan tanah, memantapkan agregat tanah, menurunkan kecepatan perkolasi, dan meningkatkan kapasitas tukar kation (KTK) tanah.

#### KESIMPULAN

Penambahan pupuk hijau 5 ton.ha<sup>-1</sup> pada budidaya selada yang dipupuk urea dapat meningkatkan indeks luas daun, bobot segar, bobot kering tanaman pada saat panen dan laju pertumbuhan tanaman. Hasil tertinggi dicapai pada penambahan *Tithonia* 15 ton.ha<sup>-1</sup> yang meningkatkan hasil selada sebesar 67,1 g per tanaman atau meningkat 88% dari pemupukan urea. Selain itu penambahan pupuk hijau 5 ton.ha<sup>-1</sup> pada budidaya selada yang dipupuk urea dapat meningkatkan KTK tanah dan C organik tanah setelah panen. Hasil tertinggi dicapai pada *Cromolaena* 15 ton.ha<sup>-1</sup> yang dapat meningkatkan KTK tanah sebesar 4,4 me.100g<sup>-1</sup> atau meningkat 14,75% dan C organik tanah sebesar 1,03% atau meningkat 53,1%.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] Sugito, Y. 2000. Pembangunan pertanian berkelanjutan di Indonesia: prospek dan permasalahannya. Makalah Seminar Nasional Pembangunan Berkelanjutan. Malang.
- [2] Prihatini, T., A. Kentjanasari, J. S. Adiningsih. 1996. Peningkatan kesuburan tanah melalui pemanfaatan Biofertilizer dan bahan organik. Makalah Seminar Nasional Pengelolaan Tanah Masam Secara Biologi. Universitas Brawijaya. Malang.
- [3] Adiningsih, J. S., A. S. Karama. 1992. A sustainable upland farming system for Indonesia. Centre for Soil and Agroclimate Research (RSAR). Bogor. 12 p.
- [4] Hairiah, K. 2000. Pengelolaan tanah masam secara biologi. ICRAF SE Asia. Bogor.

- [5] Hunt, R. 1978. Plant growth analysis. Studies in biology no.96. Edward Arnold. London. 67 p.
- [6] Fitter, A. H., R. K. M. Hay. 1998. Fisiologi lingkungan tanaman. Andani, S., E. D. Purbayanti (Transl). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- [7] Sitompul, S. M., B. Guritno. 1995. Analisis pertumbuhan tanaman. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- [8] Gardner, F.P., R. B. Pearce, R. L. Mitchell. 1991. Fisiologi tanaman budidaya. Susilo, H. (Transl). Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- [9] Hairiah, K .1997. Dinamika C dalam tanah. Diklat Kuliah Kesuburan tanah. Pasca Sarjana Universitas Brawijaya. Malang.
- [10] Pratikno, H. 2001. Studi pemanfaatan berbagai biomasa flora untuk peningkatan ketersediaan P dan bahan organik tanah berkapur di DAS Brantas Malang Selatan. Thesis. Universitas Brawijaya. Malang.
- [11] Soepardi, G. 1983. Sifat dan ciri tanah. Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- [12] Hardjowigeno, S. 1992. Ilmu tanah. Mediyatama Sarana Perkasa. Jakarta.
- [13] Sastrosudarjo, S. 1984. Improvement of organic matter in upland farming systems. Proceeding Pertemuan Teknis Penelitian Pola Usaha Tani Menunjang Transmigrasi.
- [14] Haryati, U., A. Rachman, A. Abdurachman. 1990. Aplikasi mulsa dan pupuk hijau Sonosiso untuk pertanaman jagung pada tanah Usthorhents di Gondanglegi. 1-8. dalam Risalah Pembahasan Hasil Penelitian Pertanian Lahan Kering dan Konservasi Tanah. Tugu-Bogor. Proyek Penelitian Penyelamatan Hutan, Tanah dan Air (P3HTA), Salatiga, Departemen Pertanian.
- [15] Poerwowidodo, 1992. Telaah kesuburan tanah 4 Ed. Penerbit Angkasa Persada. Bandung.
- [16] Karama, A. S., A.R. Marzuki, I. Manwan. 1994. Penggunaan pupuk organik pada tanaman pangan. Balai Penelitian Tanaman Pangan. Bogor.
- [17] Handayanto, E., G. Cadisch, K.E. Giller. 1994. Nitrogen release from prunings of Legume Hedgerow Trees in relation to quality of the prunings and incubation method. *Plant and Soil*. 1660. 237–248.

## Efek Suplemen L-Arginin Subakut Peroral pada Kontraksi Aorta Tikus Diabetes

Sjarif Ismail<sup>1\*</sup>, M. Mulyohadi Ali<sup>2</sup>, Djoko W. Soeatmadji<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorium Farmakologi Program Pendidikan Dokter, Universitas Mulawarman, Samarinda

<sup>2</sup> Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

<sup>3</sup> Divisi Endokrin, Lab/UPF Ilmu Penyakit Dalam RSSA

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suplemen L-arginin subakut peroral pada tikus diabetes-streptozotosin terhadap respons kontraksi aorta melalui mekanisme pencegahan peningkatan stress oksidatif. L-arginine diberikan selama 8 minggu pada tikus diabetes dengan dosis 10, 100 dan 1000 mg.kg<sup>-1</sup> BB.hari<sup>-1</sup>. Parameter yang diukur adalah MDA-plasma untuk menilai oksidatif stress dan teknik *bioassay* dengan isolasi organ terpisah aorta ring untuk menilai respons reseptor adrenergik- $\alpha_1$  di otot polos aorta terhadap fenilefrin (PE). Dari respons kontraksi aorta dapat diketahui nilai  $E_{max}$  dan  $pD_2$  PE. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian L-arginin 100, 1000 mg.kg<sup>-1</sup> BB.hari<sup>-1</sup> pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan MDA-plasma ( $p < 0.001$ ). Pemberian L-arginin dosis 100, 1000 mg.kg<sup>-1</sup> BB.hari<sup>-1</sup> dapat mencegah peningkatan respons kontraksi aorta terhadap PE melalui pencegahan peningkatan  $E_{max}$  ( $p < 0.000$ ) dan menurunkan  $pD_2$  pada dosis 1000 mg.kg<sup>-1</sup> BB.hari<sup>-1</sup> ( $p < 0.001$ ). Hasil Jalur Hubungan menunjukkan pencegahan peningkatan  $E_{max}$  melalui jalur pencegahan peningkatan MDA ( $p < 0.012$ ) dan penurunan  $pD_2$  melalui jalur langsung ( $p < 0.016$ ). Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian suplemen L-arginin pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan respons kontraksi aorta terhadap PE dengan cara: (1) mencegah peningkatan  $E_{max}$  melalui pencegahan peningkatan MDA (jalur tidak langsung); dan (2) secara langsung menurunkan afinitas reseptor adrenergik- $\alpha_1$ .

**Kata kunci:** diabetes, L-arginin, reseptor adrenergik- $\alpha_1$ , stress oksidatif

### Abstract

This research was aimed to assess the effect of subacute peroral L-arginine supplement on diabetes-streptozotosin rat towards the response of aorta contraction through the mechanism of prevention on the increasing oxidative stress. L-arginine was administrated for eight weeks on diabetic rats with doses 10, 100 and 1000 mg.kg<sup>-1</sup> BW.day<sup>-1</sup>. Measured parameters are MDA-plasma to assess the oxidative stress and bioassay technique by isolate the separated organ of aorta ring. We measure the response of adrenergic- $\alpha_1$  receptor in aorta smooth muscle towards phenylephrine (PE). From the contraction response of aorta, we obtained the value of  $E_{max}$  and  $pD_2$  PE. The results showed that the administration of L-arginine 100, 1000 mg.kg<sup>-1</sup> BW.day<sup>-1</sup> on diabetic rat prevent the increasing of MDA-plasma ( $p < 0.001$ ). Administration of L-arginine doses 100, 1000 mg.kg<sup>-1</sup> BW.day<sup>-1</sup> prevent the response of aorta contraction towards PE through the increasing of  $E_{max}$  ( $p < 0.000$ ) and decreasing  $pD_2$  on dose 1000 mg.kg<sup>-1</sup> BW.day<sup>-1</sup> ( $p < 0.001$ ). Pathway analysis showed the prevention of  $E_{max}$  increasing through the path of increased MDA prevention ( $p < 0.012$ ) and decreased  $pD_2$  through direct path ( $p < 0.016$ ). We conclude that the administration of L-arginine supplement on diabetic to prevent the responses of aorta contraction towards PE is available in two ways: (1) prevent the increasing of  $E_{max}$  by prevent the increasing of MDA (indirect path); and (2) directly decrease the affinity of adrenergic- $\alpha_1$  receptor.

**Kata kunci:** diabetes, L-arginine, oxidative stress, receptor of adrenergic- $\alpha_1$

### PENDAHULUAN

Berbagai penelitian telah membuktikan respons pembuluh darah tikus diabetes yang diperantarai oleh reseptor adrenergik- $\alpha$  meningkat [1-3]. Perubahan reaktivitas ini bisa

merupakan efek terpisah dari kelainan fungsi endotel [4-5]. Peningkatan respons kontraksi tersebut dapat terjadi di tingkat reseptor yaitu melalui peningkatan afinitas reseptor adrenergik [3]. Peningkatan radikal bebas dapat menyebabkan peningkatan respons kontraksi pembuluh darah melalui mekanisme perubahan sinyal transduksi, yaitu meningkatkan ion kalsium sitosol otot polos pembuluh darah [2,6]. Jadi, pada diabetes terjadi perubahan pada sistem

\* Alamat korespondensi:

Sjarif Ismail

Alamat : Laboratorium Farmakologi Program Pendidikan Dokter, Universitas Mulawarman, Samarinda

regulasi reseptor adrenergik dan sinyal transduksi untuk mempertahankan keadaan homeostasis sehingga menyebabkan perubahan pada respons kontraksi pembuluh darah.

Berbagai bukti menunjukkan peningkatan stress oksidatif pada diabetes [7-16]. Salah satu penyebab peningkatan stress oksidatif adalah penurunan L-arginin. Pada keadaan ini eNOS dapat menghasilkan superoksida selain pembentukan NO menurun [17-19]. Beberapa penelitian telah membuktikan penurunan konsentrasi arginin plasma dan jaringan vaskular pada model hewan diabetes [21-23] dan penderita diabetes [24,25]. Keberadaan L-arginin yang mencukupi sangat dibutuhkan untuk mempertahankan suatu keadaan homeostasis pada diabetes. Masih belum ada penelitian efek pemberian L-arginin subakut secara oral pada tikus diabetes terhadap perubahan respons kontraksi melalui perubahan stress oksidatif. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suplemen L-arginin subakut peroral pada tikus diabetes-streptozotocin terhadap respons kontraksi aorta melalui mekanisme pencegahan peningkatan stress oksidatif.

#### METODE PENELITIAN

Tikus wistar jantan dari induk *inbred* umur 3-4 bulan dari Laboratorium Farmakologi FK Unibraw. Tikus dibuat diabetes dengan suntikan streptozotocin 55 mg/kgBB dalam buffer sitrat. Satu minggu setelah pemberian streptozotocin darah dari ekor tikus diperiksa dengan glukometer. Tikus dinyatakan diabetes jika gula darahnya >300 mg% [26]. Tiap kelompok terdiri dari lima ekor tikus, yaitu tikus kontrol, diabetes, diabetes dengan perlakuan L-arginin peroral dosis 10, 100, 1000 mg.kg<sup>-1</sup> BB.hari<sup>-1</sup> semua diperlakukan selama 8 minggu dengan kondisi yang sama.

#### Metode Pemeriksaan MDA-plasma.

Digunakan plasma darah sebanyak 200 µl. Teknik pemeriksaan MDA-plasma disesuaikan dengan protokol yang terdapat di Laboratorium Biomedik FK Universitas Brawijaya dengan sedikit modifikasi. Pemeriksaan MDA-plasma dilakukan setelah semua sampel terkumpul semuanya, disimpan dalam lemari es -70 °C.

#### Percobaan Organ Terpisah Aorta Ring

Aorta yang digunakan dengan endotel intak karena dikerjakan bersama-sama dengan penelitian lain. Teknik preparasi organ terpisah

aorta mengacu Pieper dan Dondlinger [23], dengan modifikasi. Aorta ring lalu potong pada cincinnya dengan panjang sekitar 3 mm, lalu dimasukkan dalam *organ bath* 20 ml larutan Krebs-Henseleit pH 7,4 suhu 37°C yang dialiri gas carbogen. Salah satu ujung aorta ring dihubungkan dengan *tissue holder* dan ujung lainnya dipasang pada *transducer* isometrik (Ugo Basile No. 7004) dengan tonus 2 g dihubungkan pada komputer *Macintosh LC 575, Mac Lab./8e AD Instrument, Program Chard versi 3.5* buatan Michael Macknight. Setelah percobaan selesai, dihitung *cross sectional area* (CSA) [27]. Selanjutnya tegangan aorta diekspresikan per CSA.

#### Respons kontraksi aorta

Setelah ekuilibrisasi tercapai, respons kontraksi aorta dengan pemberian kumulatif dosis PE. Setelah respons maksimal PE tercapai, cairan di *organ bath* diganti secara serial sampai kembali ke *base line*.

#### HASIL

##### MDA-plasma terhadap pemberian L-arginin

Hasil rerata kadar MDA akibat pemberian L-arginin pada tiap kelompok tikus dapat dilihat pada tabel 1. Hasil Uji Anova didapatkan hasil yang signifikan ( $p=0.000$ ). Untuk mengetahui seberapa besar perbedaan rerata MDA pada tiap kelompok, dilanjutkan dengan uji Tukey.

Hasil Uji Tukey, didapatkan hasil MDA yang berbeda bermakna jika kelompok tikus A dibandingkan dengan kelompok K ( $0.803 \pm 0.126$ )  $p=0.000$ , tikus S ( $0.628 \pm 0.126$ )  $p=0.001$ , dan kelompok D ( $0.807 \pm 0.126$ )  $p=0.000$ ; tetapi didapatkan hasil yang tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok L ( $0.180 \pm 0.126$ )  $p=0.169$ .

Hasil yang berbeda signifikan juga didapatkan jika kelompok K dibandingkan dengan kelompok L ( $-0,623 \pm 0.126$ )  $p=0.001$ , tetapi didapatkan hasil yang tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok (- $0.175 \pm 0.126$ )  $p=0.641$  dan kelompok D ( $4.200.10^{-3} \pm 0.126$ )  $p=1.000$ . Kelompok D jika dibandingkan dengan kelompok L akan didapatkan hasil yang berbeda signifikan (- $0,627 \pm 0.126$ )  $p=0.001$ , tetapi didapatkan hasil yang tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok S (- $0.179 \pm 0.126$ )  $p=0.621$ . MDA kelompok S jika dibandingkan dengan kelompok L didapatkan hasil yang berbeda signifikan, yaitu (- $0.448 \pm 0.126$ )  $p=0.015$ . Dari hasil uji regresi menunjukkan bahwa peningkatan dosis peroral L-arginin pada

tikus diabetes dapat mempengaruhi pencegahan peningkatan MDA-plasma ( $r^2=0.442$ ,  $p=0.001$ ).

**Tabel 1.** MDA-plasma terhadap pemberian L-arginin

Kelompok	Rerata MDA ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )
K	$0.194 \pm 0.039$
A	$0.997 \pm 0.128^{\#}$
L	$0.817 \pm 0.116^{\#}$
S	$0.369 \pm 0.069$
D	$0.190 \pm 0.060$

Keterangan:

K= tikus kontrol.

A= tikus diabetes.

L= tikus diabetes + L-arginine  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{BB}\cdot\text{hari}^{-1}$ .

S= tikus diabetes + L-arginine  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{BB}\cdot\text{hari}^{-1}$ .

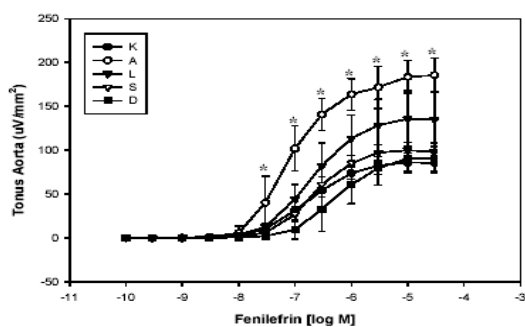
D= tikus diabetes + L-arginine  $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{BB}\cdot\text{hari}^{-1}$ .

Data dinyatakan dalam mean  $\pm$  SE, n=5 ekor tikus tiap kelompok. Hasil Uji statistik berbeda sangat nyata jika  $p<0.05$ .

<sup>#</sup> Berbeda sangat nyata terhadap kelompok K, S, dan D.

### Respons Reseptor Adrenergik- $\alpha_1$ terhadap Pemberian L-arginin.

Untuk mengetahui pengaruh pemberian L-arginin subakut secara oral pada tikus diabetes terhadap respons kontraksi aorta pada reseptor adrenergik- $\alpha_1$  maka dilakukan percobaan dengan menggunakan organ terpisah aorta. Hasil gambar rekaman kekuatan tonus kontraksi aorta terhadap pemberian fenilefrin pada tiap kelompok hewan coba di komputer McLab dalam  $\mu\text{V}$  seperti yang terlihat pada gambar 1.



**Gambar 2.** Kurva dosis respons PE terhadap besarnya tonus kontraksi aorta

Keterangan:

K= tikus kontrol.

A= tikus diabetes.

L= tikus diabetes + L-arginine  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{BB}\cdot\text{hari}^{-1}$ .

S= tikus diabetes + L-arginine  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{BB}\cdot\text{hari}^{-1}$ .

D= tikus diabetes + L-arginine  $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{BB}\cdot\text{hari}^{-1}$ .

Hasil Uji statistik berbeda sangat nyata jika  $p<0.05$ .

\*Berbeda sangat nyata, jika dibandingkan dengan kelompok tikus diabetes.

Pada penambahan dosis PE di organ terpisah aorta terlihat peningkatan tonus kontraksi aorta

yang tergantung pada konsentrasi PE di *organ bath* pada semua kelompok, seperti terlihat pada gambar 2 pada bentuk kurva dosis respons PE terhadap besarnya tonus kontraksi aorta. Dari hasil Uji Anova, terlihat peningkatan kekuatan tonus kontraksi aorta pada kelompok diabetes secara bermakna jika dibandingkan kelompok lainnya, mulai bermakna pada dosis PE  $[3\cdot 10^{-8}] \text{ M}$  ( $p=0.003$ ). Dengan semakin meningkatnya dosis PE akan semakin meningkat tonus kontraksinya.

Dari tabel 2 dapat dilihat nilai  $E_{\text{maks}}$  PE dan hasil uji Anova bermakna ( $p=0.000$ ). Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda signifikan dan berapa besar perbedaan reratanya, maka dilanjutkan dengan uji Tukey. Hasilnya, nilai  $E_{\text{maks}}$  PE pada kelompok A mendapatkan hasil yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok K ( $99.350 \pm 11.908$ ) dengan  $p=0.000$ , kelompok tikus L ( $49.932 \pm 11.908$ ) dengan  $p=0.004$ , kelompok S ( $85.962 \pm 11.908$ ) dengan  $p=0.000$ , kelompok D ( $92.978 \pm 11.908$ ) dengan  $p=0.000$ .

**Tabel 2.**  $E_{\text{maks}}$  dan  $pD_2$  PE akibat pemberian L-arginin

Kelompok	$E_{\text{maks}}$ ( $\mu\text{V}\cdot\text{mm}^{-2}$ )	$pD_2$
K	$86.45 \pm 5.07^{\#}$	$6.83 \pm 0.10$
A	$185.80 \pm 8.45$	$7.13 \pm 0.08$
L	$135.87 \pm 14.23$	$6.78 \pm 0.12$
S	$99.84 \pm 4.20^{\#}$	$6.37 \pm 0.03$
D	$92.82 \pm 6.15^{\#}$	$6.36 \pm 0.13^*$

Keterangan:

K= tikus kontrol.

A= tikus diabetes.

L= tikus diabetes + L-arginine  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{BB}\cdot\text{hari}^{-1}$ .

S= tikus diabetes + L-arginine  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{BB}\cdot\text{hari}^{-1}$ .

D= tikus diabetes + L-arginine  $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{BB}\cdot\text{hari}^{-1}$ .

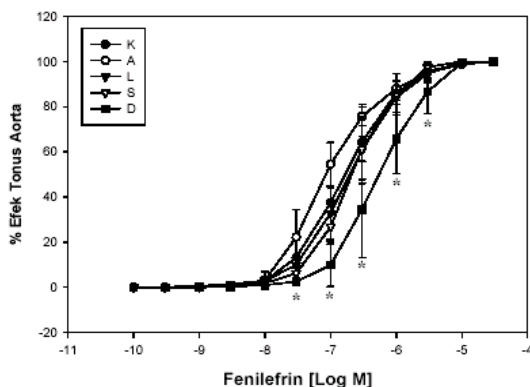
Data dinyatakan dalam mean  $\pm$  SE, n=5 ekor tikus tiap kelompok. Hasil Uji statistik berbeda sangat nyata jika  $p<0.05$ .

<sup>#</sup> Berbeda sangat nyata terhadap kelompok K, S, dan D.

Nilai  $E_{\text{maks}}$  PE pada kelompok L akan mendapatkan hasil yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok K ( $49.422 \pm 11.908$ ) dengan  $p=0.004$ , kelompok S ( $36.030 \pm 11.908$ ) dengan  $p=0.047$ , kelompok D ( $43.046 \pm 11.908$ ) dengan  $p=0.013$ . Nilai  $E_{\text{maks}}$  PE pada kelompok S jika dibandingkan dengan kelompok K dan D didapatkan hasil yang tidak signifikan, yaitu ( $13.392 \pm 11.908$ ) dengan  $p=0.792$  dan ( $7.016 \pm 11.908$ ) dengan  $p=0.975$ ; sedangkan kelompok D jika dibandingkan dengan kelompok K akan didapatkan hasil yang tidak signifikan, yaitu ( $6.376 \pm 11.908$ ) dengan  $p=0.982$ . Hasil Uji regresi menunjukkan peningkatan dosis peroral L-arginine pada tikus diabetes mencegah terjadinya peningkatan  $E_{\text{maks}}$  PE ( $r^2=0.314$ ,  $p=0.010$ ).



Pada gambar 3 terlihat adanya pergeseran kurva persen efek pada tikus diabetes yang diberi L-arginin. Hal ini menandakan adanya perubahan afinitas reseptor adrenergik- $\alpha_1$  terhadap PE. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat dari nilai  $pD_2$  PE pada tabel 2. Dari hasil uji Anova berbeda signifikan ( $p=0.000$ ). Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda signifikan dan berapa besar perbedaan reratanya nilai  $pD_2$  PE, maka dilanjutkan dengan uji Tukey. Hasilnya, nilai  $pD_2$  PE kelompok A jika dibandingkan dengan kelompok D didapatkan hasil yang signifikan, yaitu  $(0.763 \pm 0.136)$  dengan  $p=0.000$ ; sedangkan kelompok A jika dibandingkan dengan kelompok K, L, S didapatkan hasil yang tidak signifikan, yaitu  $(0.294 \pm 0.136)$   $p=0.237$ ,  $(0.345 \pm 0.136)$   $p=0.123$ ,  $(0.396 \pm 0.136)$   $p=0.006$ ; kelompok D jika dibandingkan dengan kelompok K dan L didapatkan hasil yang signifikan, yaitu  $(-0.470 \pm 0.136)$   $p=0.019$  dan  $(-0.418 \pm 0.136)$   $p=0.042$ . Hasil uji regresi menunjukkan bahwa peningkatan dosis peroral L-arginine pada tikus diabetes dapat menurunkan  $pD_2$  PE ( $r^2=0.492$ ,  $p=0.001$ ).



**Gambar 3.** Kurva dosis respons fenilefrin terhadap persen efek

Keterangan:

K= tikus kontrol.

A= tikus diabetes.

L= tikus diabetes + L-arginine  $10 \text{ mg.kg}^{-1}\text{BB.hari}^{-1}$ .

S= tikus diabetes + L-arginine  $100 \text{ mg.kg}^{-1}\text{BB.hari}^{-1}$ .

D= tikus diabetes + L-arginine  $1 \text{ g.kg}^{-1}\text{BB.hari}^{-1}$ .

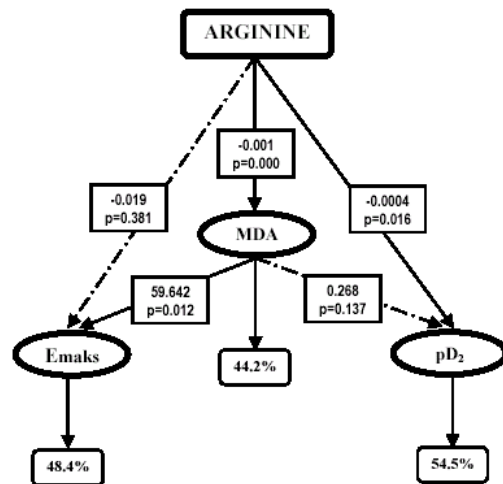
Hasil Uji statistik berbeda sangat nyata jika  $p < 0.05$ .

\* Berbeda sangat nyata jika dibandingkan dengan kelompok tikus diabetes.

#### Model Pengaruh Dosis L-arginin terhadap $E_{maks}$ dan $pD_2$ Fenilefrin melalui MDA.

Untuk menelusuri model pengaruh pemberian berbagai dosis arginin pada tikus diabetes terhadap  $E_{maks}$  dan  $pD_2$ , aorta tikus pada sediaan organ terpisah melalui MDA, dilakukan analisis jalur (*Path Analysis*). Jadi Analisis jalur dilakukan terhadap nilai yang telah distandardkan.

Jadi analisis jalur digunakan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh pemberian dosis arginine pada tikus diabetes terhadap  $E_{maks}$  dan  $pD_2$ , serta untuk mengetahui peran variable antara (MDA) terhadap perubahan  $E_{maks}$  dan  $pD_2$  aorta tikus seperti yang terlihat pada gambar 4.



**Gambar 4.** Model pengaruh dosis L-arginin terhadap  $E_{maks}$  dan  $pD_2$  fenilefrin melalui MDA

Keterangan:

→ : Jalur dominan, jika  $p < 0.05$ .

Dari hasil analisa jalur menunjukkan bahwa pengaruh pemberian berbagai dosis L-arginin pada tikus diabetes terhadap pencegahan peningkatan MDA besarnya 44.2%, dengan koefisien jalur  $-0.001$  dan  $p=0.000$ . Pengaruh pemberian berbagai dosis L-arginin peroral pada tikus diabetes dan MDA terhadap pencegahan peningkatan nilai  $E_{maks}$  PE besarnya 48.4%. Hubungan pemberian peroral dosis L-arginin pada tikus diabetes terhadap nilai  $E_{maks}$  PE mempunyai koefisien jalur sebesar  $-0.019$  dan  $p=0.381$ , sedangkan hubungan MDA terhadap nilai  $E_{maks}$  PE mempunyai koefisien jalur sebesar 59.642 dan  $p=0.012$ . Jadi perubahan pada nilai  $E_{maks}$  PE lebih dominan melalui MDA dibandingkan jalur langsung. Pengaruh pemberian berbagai dosis L-arginin peroral pada tikus diabetes dan MDA terhadap penurunan nilai  $pD_2$  PE besarnya 54.4%. Hubungan pemberian peroral dosis L-arginin pada tikus diabetes terhadap nilai  $pD_2$  PE mempunyai koefisien jalur sebesar  $-0.0004$  dan  $p=0.016$ , sedangkan hubungan MDA terhadap nilai  $pD_2$  PE mempunyai koefisien jalur sebesar 0.268 dan  $p=0.137$ . Jadi perubahan pada nilai  $pD_2$  PE lebih dominan melalui jalur langsung.

## PEMBAHASAN

### MDA-plasma

Pemeriksaan MDA-plasma merupakan salah satu parameter untuk membuktikan peningkatan stress oksidatif pada diabetes. Penelitian ini telah membuktikan pemberian L-arginin subakut secara oral pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan MDA-plasma, dimana besarnya efek pencegahan peningkatan MDA-plasma tergantung pada dosis L-arginin yang diberikan. Semakin besar dosis L-arginin yang diberikan pada tikus diabetes akan semakin besar pula mencegah terjadinya peningkatan MDA-plasma, dimana pemberian L-arginin 100 mg.kg<sup>-1</sup>BB.hari<sup>-1</sup> pada tikus diabetes sudah terjadi keadaan MDA-plasma yang tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kontrol.

### Stress Oksidatif

Hasil Uji regresi menunjukkan besarnya efek pencegahan peningkatan stress oksidatif pengaruh yang signifikan dengan besarnya dosis L-arginin yang diberikan ( $r^2=0.442$ ;  $p=0.001$ ). Hal ini dapat terjadi karena salah satu mekanisme peningkatan stress oksidatif pada diabetes adalah berkurangnya substrat L-arginin di endotel sehingga terjadi keadaan yang disebut 'uncoupled eNOS', maka superoksid dihasilkan melimpah [17-20]. Berbagai bukti menunjukkan penurunan L-arginin di dalam plasma dan vaskular tikus diabetes dan penderita diabetes [21-25].

Penurunan arginin bisa disebabkan oleh: (1) kebutuhan arginin yang meningkat karena peningkatan ekspresi eNOS yang berhubungan dengan peningkatan *moderate* oksidasi LDL dan lisofosfatidilkolin. Peningkatan ekspresi eNOS berfungsi sebagai mekanisme pertahanan anti atero-sklerosis pada stadium awal pembentukan lesi aterosklerosis [20]; (2) penghancuran arginin yang meningkat karena: (a) pembentukan arginin-imidazolone *adduct*, arginin-dehidroimidazolone *adduct* dan arginin-lisin *crosslink* karena glikosilasi non-enzimatik meningkat [13], (b) katabolisme arginin yang meningkat karena overekspresi arginase [28-30]; (3) gangguan sistem transport arginin yang afinitas tinggi untuk *uptake* arginin ke dalam sel endotel akibat peningkatan radikal bebas [19,31-34]. Maka diperlukan upaya peningkatan L-arginin yang lebih besar dari biasanya untuk mempertahankan *uptake* arginin ke dalam sel endotel. Berbagai bukti telah menunjukkan bahwa pemberian L-arginin peroral akan meningkatkan konsentrasi arginin dalam plasma [35]. Maka pemberian L-

arginin pada tikus diabetes dapat diasumsikan meningkatkan arginin di plasma, peningkatan arginin di plasma akan meningkatkan arginin di endotel sehingga keadaan 'uncoupled eNOS' dapat diperbaiki, hasilnya pembentukan anion superoksid berkurang. Penurunan pembentukan superoksid menyebabkan penurunan peroksidasi lipid, maka pengukuran peroksidasi lipid dengan menggunakan metoda TBA akan menghasilkan penurunan MDA-plasma. Jadi pemberian L-arginin pada tikus diabetes dapat mencegah terjadinya peningkatan MDA-plasma.

Hasil Uji Regresi memperlihatkan dosis L-arginin pada tikus diabetes terhadap pencegahan peningkatan MDA-plasma pengaruhnya sebesar 44.2%. Hal ini dapat diartikan sebesar 65.8% tidak dapat mencegah peningkatan MDA-plasma pada diabetes dengan pemberian L-arginin. Hal ini wajar saja dapat terjadi karena 'uncoupled eNOS' tidak saja disebabkan oleh arginin yang menurun, tetapi bisa juga karena penurunan kofaktor tetrahidrobiopterin [36,37].

Selain itu, 'uncoupled eNOS' bukan satu-satunya penyebab peningkatan stress oksidatif pada diabetes, masih banyak mekanisme peningkatan stress oksidatif pada diabetes yaitu: (1) meningkatnya jalur sorbitol; (2) glikosilasi non-enzimatik; (3) auto-oksidasi; (4) peningkatan PKC; (5) peningkatan siklooksigenase; (6) peningkatan angiotensin II [8-12,14-16]. Keadaan ini semua dapat menyebabkan peningkatan MDA-plasma, tetapi pengaruh arginin tampaknya cukup besar dalam mencegah peningkatan MDA-plasma jika dilihat dari hasil Uji Regresi.

### Respon Kontraksi Aorta

Untuk mengetahui respons kontraksi aorta maka agonis yang digunakan adalah fenilefrin sebagai agonis selektif yang bekerja pada adrenergik- $\alpha_1$  di otot polos pembuluh darah, menyebabkan kontraksi pada otot polos pembuluh darah [38], dan menjadi pertimbangan untuk digunakan karena pada aorta tikus reseptor adrenergiknya lebih dominan adrenergik- $\alpha_1$  [39,40].

Berdasarkan pengamatan hasil, tampak peningkatan respons kontraksi aorta tergantung pada dosis fenilefrin di *organ bath* pada semua kelompok tikus. Secara umum dapat diketahui peningkatan respons kontraksi aorta diabetes dibandingkan dengan kontrol terhadap pemberian fenilefrin seperti yang terlihat pada kurva dosis respons fenilefrin terhadap besarnya tonus kontraksi aorta (gambar 2). Pada kelompok tikus

diabetes respons kontraksi aorta lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol, dimana mulai bermakna pada dosis fenilefrin [ $3.10^{-8}$ ] M ( $p=0.003$ ). Semakin tinggi dosis fenilefrin yang diberikan akan semakin tinggi respons kontraksi aortanya dan semakin bermakna perbedaannya ( $p=0.000$ ). Tampak juga pemberian L-arginin pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan respons kontraksi aorta dan semakin besar dosis L-arginin yang diberikan akan semakin besar juga efek pencegahan peningkatan respons tersebut. Jadi pada penelitian ini terbukti pemberian L-arginin subakut secara oral dapat mencegah peningkatan respons kontraksi aorta tikus diabetes.

#### Nilai $E_{maks}$ dan $pD_2$ Fenilefrin

Salah satu cara untuk mengetahui mekanisme pencegahan peningkatan respons kontraksi aorta tikus diabetes setelah diberi L-arginin subakut secara oral adalah dengan mengukur nilai  $E_{maks}$  dan  $pD_2$  fenilefrin. Nilai  $E_{maks}$  dapat digunakan untuk memperkirakan jumlah maksimal reseptor yang ditempati oleh agonis untuk menimbulkan efek maksimum (respons maksimum) dan juga menggambarkan mekanisme sinyal transduksinya. Besarnya efek agonis adalah proporsional dengan fraksi reseptor yang ditempati oleh agonis dan efek maksimal dihasilkan jika semua reseptor telah ditempati. Artinya efek suatu agonis berbanding lurus dengan jumlah reseptor yang ditempati dan efek suatu agonis akan mencapai maksimal jika seluruh reseptornya ditempati oleh agonis [41]. Secara fungsional reseptor terdiri dari domain *ligand-binding* dan domain efektor [41]. Domain *ligand-binding* adalah tempat interaksi antara agonis dengan reseptor, sedangkan domain efektor berinteraksi dengan berbagai molekul seluler lainnya dalam sistem sinyal transduksi.

Nilai  $pD_2$  menggambarkan afinitas agonis terhadap reseptornya atau kemampuan agonis untuk menempati 50% reseptornya [42-43]. Bila nilai ini besar berarti afinitas reseptor terhadap agonis meningkat, artinya konsentrasi agonis yang diperlukan untuk menimbulkan respons lebih kecil sehingga dapat juga disebut sensitifitas reseptor meningkat atau dengan perkataan lain kepekaan reseptor meningkat.

Pemberian L-arginin subakut secara oral pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan respon kontraksi aorta terhadap fenilefrin melalui pencegahan nilai  $E_{maks}$  fenilefrin. Semakin tinggi dosis L-arginin yang diberikan pada tikus diabetes akan semakin signifikan pence-

gahan peningkatan nilai  $E_{maks}$  fenilefrin. Pada pemberian L-arginin dosis  $100 \text{ mg.kg}^{-1}\text{BB.hari}^{-1}$  sudah mencapai suatu kondisi yang tidak berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kontrol ( $p=0.792$ ) dan diabetes + L-arginin dosis  $1 \text{ g.kg}^{-1}\text{BB.hari}^{-1}$  ( $p=0.975$ ).

#### Regulasi Reseptor Adrenergik- $\alpha_1$

Fenomena diatas secara umum bisa diasumsikan bahwa pada diabetes terjadi perubahan regulasi reseptor adrenergik- $\alpha_1$  kearah *upregulasi* reseptor adrenergik- $\alpha_1$  (peningkatan jumlah reseptor adrenergik- $\alpha_1$ ) yang diketahui dari peningkatan nilai  $E_{maks}$  fenilefrin. Pemberian L-arginin secara oral pada tikus diabetes dapat diasumsikan mencegah terjadinya *upregulasi*/peningkatan jumlah reseptor tersebut. Mekanisme perubahan tersebut karena terjadinya regulasi reseptor untuk mempertahankan keadaan homeostasis. Jadi tidak tertutup kemungkinan *upregulasi* reseptor tersebut karena neuropathi pada tikus diabetes dan pemberian L-arginin dapat mencegah terjadinya neuropati. Penurunan kecepatan konduksi saraf motorik dan sensorik berhubungan dengan neuropathi pada tikus diabetes delapan minggu [44]. Adapun penelitian lain menemukan penurunan transmisi saraf neuron di *prejunctional sympathetic* pada tikus diabetes 12 minggu [45].

Terjadinya neuropathi pada diabetes dapat menyebabkan perubahan keseimbangan sistem saraf otonom, salah satu mekanisme tubuh untuk memperbaiki keseimbangan tersebut bisa melalui peningkatan jumlah reseptor. Hal ini dapat menjadi pertimbangan jika melihat besarnya nilai  $E_{maks}$  fenilefrin. Sedangkan pemberian L-arginin secara oral pada tikus diabetes diasumsikan dapat mencegah terjadinya neuropathi pada tikus diabetes, sehingga didapatkan nilai  $E_{maks}$  fenilefrin yang tidak berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kontrol yang dapat diartikan relatif tidak terjadi *upregulasi* reseptor adrenergik- $\alpha_1$  tetapi perlu dibuktikan lebih lanjut. Jadi tidak tertutup kemungkinan peningkatan  $E_{maks}$  PE pada diabetes karena *upregulation* reseptornya, sedangkan pemberian L-arginin pada tikus diabetes dapat mencegah *upregulation* pada reseptornya.

Perubahan dalam sinyal transduksi juga perlu dipikirkan karena nilai  $E_{maks}$  juga menggambarkan mekanisme sinyal transduksinya. Beberapa mekanisme yang sudah diketahui adalah perubahan  $\text{Ca}^{2+}$  yang masuk melalui *voltage-*

dependent  $Ca^{2+}$  channel [46] dan perubahan konsentrasi  $Ca^{2+}$  ekstraseluler [1]. Pada percobaan ini, peningkatan nilai  $E_{maks}$  fenilefrin kemungkinan besar karena peningkatan radikal bebas. Hasil ini dipertegas dari Analisis *Pathway* yang menunjukkan jalur dominan pencegahan peningkatan nilai  $E_{maks}$  fenilefrin melalui pencegahan peningkatan MDA-plasma (gambar 4). Karena pemberian dosis L-arginin peroral pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan MDA-plasma secara signifikan, sehingga berpengaruh terhadap nilai  $E_{maks}$  fenilefrin secara bermakna pula.

Telah kita ketahui bahwa peningkatan radikal bebas dapat mengurangi fluiditas membran karena terjadinya peroksidasi lipid di membrannya sehingga dapat mengganggu berbagai kanal ion yang terdapat di membran. Karenanya mempengaruhi keseimbangan ion kalsium di sitosol otot polos pembuluh darah. Pemberian xanthine oksidase / hypoxanthine (menghasilkan anion superoksid) pada otot polos arteri uterine manusia kontrol akan lebih meningkatkan ion kalsium sitosol setelah pemberian noradrenalin [6]. Hal ini juga meningkatkan kekuatan kontraksinya sebesar 81% seperti pada penderita diabetes dibandingkan dengan tanpa pemaparan xanthine oksidase/hypoxanthin. Sebaliknya, pemberian SOD akan meniadakan peningkatan ion kalsium dan perubahan dalam kontraksinya.

Peningkatan respons kontraksi arteri tikus diabetes disebabkan oleh peningkatan ion kalsium sitosol setelah pemberian noradrenalin dibandingkan dengan kontrol [47]. Peningkatan kontraksi arteri tikus diabetes juga dibuktikan terhadap noradrenalin karena meningkatnya influks ion kalsium ekstraseluler melalui ligan kanal kalsium [27]. Peningkatan respons kontraksi arteri mesenterika tikus diabetes terhadap noradrenalin juga dibuktikan karena peningkatan produksi inositol trifosfat [1]. Peningkatan nilai  $E_{maks}$  fenilefrin tidak merubah afinitasnya, melainkan pemberian pyrogallol (menghasilkan anion superoksid) akan meningkatkan respons kontraksi aorta pada tikus diabetes dan kontrol, dimana pemberian SOD dapat mencegah peningkatan respons kontraksinya akibat pyrogallol [2].

Peningkatan  $E_{maks}$  PE pada diabetes karena perubahan pada sinyal transduksi PKC perlu dipikirkan. Peningkatan PKC dapat meningkatkan sensitifitas protein kontraktil [48], sedangkan Kawasaki [49] membuktikan adanya peningkatan

PKC pada tikus diabetes menyebabkan peningkatan influks ion kalsium melalui kanal kalsium transmembran, selain itu harus diingat pula radikal bebas dapat juga meningkatkan PKC [50, 51].

Tetapi tertutup kemungkinan peningkatan  $E_{maks}$  fenilefrin karena penurunan  $E_{maks}$  asetilkolin, karena Dresner *et al.* [5] mendapatkan hasil pada tikus diabetes yang diberi L-NAME (suatu kompetitif inhibitor eNOS) dan diabetes tanpa diberi L-NAME juga mendapatkan hasil respons kontraksi arteri mesenterika yang sama peningkatannya.

Jadi pada penelitian ini telah dibuktikan pemberian L-arginin secara oral pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan  $E_{maks}$  fenilefrin melalui mekanisme pencegahan peningkatan MDA, sehingga tidak terjadi perubahan dalam sinyal transduksinya. Tetapi tidak tertutup kemungkinan karena pencegahan *upregulation* reseptor adrenergik- $\alpha_1$ .

#### Afinitas Reseptor Adrenergik- $\alpha_1$

Pada kurva dosis respons fenilefrin terhadap persen efek, tampak adanya pergeseran kurva ke kiri pada tikus diabetes. Pergeseran kurva ke kiri menandakan peningkatan afinitas reseptor adrenergik- $\alpha_1$ . Peningkatan afinitas reseptor adrenergik- $\alpha_1$  pada tikus diabetes akan tampak lebih jelas jika kita membandingkannya dalam bentuk nilai  $pD_2$  fenilefrin, karena nilai  $pD_2$  menggambarkan afinitas reseptor adrenergik- $\alpha_1$  terhadap fenilefrin.

Pada percobaan ini ditemukan peningkatan afinitas reseptor adrenergik- $\alpha_1$  pada kelompok tikus diabetes tetapi tidak signifikan jika dibandingkan dengan kontrol, karena tikus diabetes yang digunakan adalah delapan minggu. Sedangkan pada penelitian Murray *et al.* [3] menggunakan tikus diabetes 12-15 mg. Jadi lamanya waktu juga mempengaruhi terjadinya perubahan pada afinitas reseptornya. Hasil ini sama seperti yang diperoleh Dresner *et al.* [5] yang mendapatkan hasil afinitas reseptor adrenergik- $\alpha_1$  meningkat pada kelompok tikus diabetes tapi tidak signifikan jika dibandingkan dengan kontrol. Head *et al.* [52] juga mendapatkan hasil yang tidak berbeda signifikan pada peningkatan afinitas reseptor tikus diabetes jika dibandingkan dengan kontrol tapi untuk noradrenarine, dimana keduanya menggunakan tikus diabetes delapan minggu.

Pemberian peroral L-arginin pada tikus diabetes selama delapan minggu terbukti dapat

mencegah terjadinya peningkatan afinitas reseptor adrenergik- $\alpha_1$ , semakin tinggi dosis L-arginin yang diberikan akan semakin menurunkan afinitas reseptor, tetapi penurunannya yang bermakna hanya pada pemberian L-arginin dosis 1 g.kg<sup>-1</sup>BB.hari<sup>-1</sup> ( $p=0.000$ ). Penurunan afinitas reseptor akibat pemberian L-arginin pada tikus diabetes dengan dosis 1 g.kg<sup>-1</sup>BB.hari<sup>-1</sup> juga signifikan jika dibandingkan kontrol ( $p=0.019$ ). Tetapi untuk dosis 10 dan 100 mg.kg<sup>-1</sup>BB.hari<sup>-1</sup> penurunannya tidak berbeda signifikan yaitu ( $p=0.995$ ) dan ( $p=0.994$ ). Fenomena ini secara umum bisa diasumsikan bahwa pada diabetes terjadi perubahan dalam regulasi reseptor adrenergik- $\alpha_1$  ke arah super-sensitif tetapi hasil penelitian menunjukkan peningkatan nilai  $pD_2$  tidak signifikan jika dibandingkan dengan kontrol. Pemberian L-arginin pada tikus diabetes akan menyebabkan perubahan regulasi reseptor ke arah desensitisasi dimana penurunan afinitas reseptor ini bermakna untuk pemberian L-arginin dosis 1 g.kg<sup>-1</sup>BB.hari<sup>-1</sup> jika dibandingkan dengan kelompok tikus diabetes ( $p=0.000$ ) dan kontrol ( $p=0.019$ ).

Terjadinya peningkatan afinitas reseptor pada tikus diabetes diduga juga berhubungan dengan terjadinya neuropathi, sehingga ada upaya tubuh untuk mempertahankan suatu keadaan homeostasis yang normal dengan cara meningkatkan afinitas *ligand binding* reseptor tersebut yang dapat dilihat pada meningkatnya nilai  $pD_2$  walaupun tidak signifikan. Pengaruh pemberian L-arginin pada tikus diabetes diperkirakan dapat mencegah terjadinya neuropathi, bahkan dosis besar (1 g.kg<sup>-1</sup>BB.hari<sup>-1</sup>) dapat merubah regulasi reseptor tersebut ke arah desensitisasi untuk mempertahankan keadaan homeostasis.

Mekanisme molekular yang terjadi untuk menerangkan hal ini masih belum diketahui, mungkin berhubungan dengan pembentukan NO yang meningkat yang dipertegas oleh Analisis *Pathway*. Tampak ada jalur dominan secara langsung antara dosis L-arginin dengan penurunan nilai  $pD_2$  fenilefrin. Hal ini dimungkinkan karena NO mempunyai efek biologis yang luas dalam vasoprotektif, salah satunya adalah memadamkan radikal superoksida yang banyak dihasilkan oleh tikus diabetes. Keadaan ini dimungkinkan karena interaksi antara NO dan anion superoksida sangat cepat yaitu tiga kali lebih cepat dari kecepatan reaksi superoksida dismutase (SOD) dengan anion superoksida [17, 53,54].

Bila ditinjau dari pemberian dosis L-arginin pada tikus diabetes terhadap efek pencegahan

peningkatan  $E_{maks}$  fenilefrin melalui MDA sebesar 48.4%. Ini dapat diartikan 51.6% tidak dipengaruhi oleh pemberian L-arginin. Hal ini wajar saja dapat terjadi karena mekanisme terjadinya peningkatan stress oksidatif tidak hanya disebabkan oleh penurunan L-arginin, masih banyak penyebab lainnya seperti: (1) peningkatan jalur sorbitol; (2) glikosilasi non-enzimatik; (3) auto-oksidasi; (4) peningkatan PKC; (5) peningkatan siklooksigenase; (6) peningkatan angiotensin II [8-16]. Dimana berbagai mekanisme tersebut mungkin berpengaruh pada regulasi reseptor terhadap terjadinya peningkatan  $E_{maks}$  fenilefrin. Hal yang sama juga berlaku untuk nilai  $pD_2$  fenilefrin, tetapi mungkin juga berhubungan dengan terjadinya peningkatan pembentukan NO karena adanya jalur langsung yang dominan tidak melalui MDA, maka perlu penelitian lanjutan.

Jadi pada penelitian ini telah terbukti bahwa pemberian L-arginin subakut secara oral pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan respons kontraksi aorta melalui mekanisme pencegahan peningkatan stress oksidatif, selain itu juga terlihat adanya jalur langsung pencegahan peningkatan respons kontraksi aorta terhadap penurunan afinitas reseptornya. Hal ini perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk membuktikan apakah jalur langsung ini berhubungan dengan terjadinya peningkatan pembentukan NO sehingga dapat mempengaruhi regulasi reseptor ke arah desensitisasi melalui pemeriksaan isolasi organ terpisah aorta dengan endotel utuh. Selain itu juga diperlukan penelitian lanjutan pemeriksaan densitas reseptor dan sinyal transduksi lainnya karena  $E_{maks}$  mencerminkan jumlah reseptor yang ditempati oleh agonis dan sinyal transduksinya.

## KESIMPULAN

Pemberian L-arginin 100, 1000 mg.kg<sup>-1</sup>BB.hari<sup>-1</sup> pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan MDA-plasma ( $p<0.001$ ). Pemberian L-arginin dosis 100, 1000 mg.kg<sup>-1</sup>BB.hari<sup>-1</sup> dapat mencegah peningkatan respons kontraksi aorta terhadap PE melalui pencegahan peningkatan  $E_{maks}$  ( $p<0.000$ ) dan menurunkan  $pD_2$  pada dosis 1000 mg.kg<sup>-1</sup>BB.hari<sup>-1</sup> ( $p<0.001$ ). Hasil Jalur Hubungan menunjukkan pencegahan peningkatan  $E_{maks}$  melalui jalur pencegahan peningkatan MDA ( $p<0.012$ ) dan penurunan  $pD_2$  melalui jalur langsung ( $p<0.016$ ). Pemberian suplemen L-arginin pada tikus diabetes dapat mencegah peningkatan respons kontraksi aorta terhadap PE dengan cara: (1) mencegah

peningkatan  $E_{maks}$  melalui pencegahan peningkatan MDA (jalur tidak langsung); dan (2) secara langsung menurunkan afinitas reseptor adrenergik- $\alpha_1$ .

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Pemda TK I Kalimantan Timur dan Program Pendidikan Dokter Universitas Mulawarman. Ucapan terima kasih kepada Ka. Lab. Farmakologi DR. dr. Setyawati S Karyono, MKes atas penggunaan fasilitas Laboratoriumnya, dra. Husnul Khotimah yang membantu pelaksanaan perekaman dengan komputer McLab.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] Abebe, W., K. M. MacLeod. 1992. Augmented inositol phosphate production in mesenteric arteries from diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 225. 29-36.
- [2] Chang, K. C., S. Y. Chung, W. S. Chong, J. S. Suh, S. H. Kim, H. K. Noh, B. W. Seong, H. J. Ko, K. W. Chun. 1993. Abstrak: Possible superoxide radical-induced alteration of vascular reactivity in aortas from streptozotocin-treated rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 7. 992-1000.
- [3] Murray, P., B. Pitt, R. C. Webb. 1994. Abstrak: Ramipril prevents hypersensitivity to phenylephrine in aorta from streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia.* 37. 664-70.
- [4] Harris, K. H., K. M. MacLeod. 1988. Abstrak: Influence of the endothelium on contractile responses of arteries from diabetic rats. 153. 55-64.
- [5] Dresner, L. S., S. P. Wang, M. W. West, I. N. Ponomarenko, C. M. Mueller, R. B. Wait. 1997. Abstrak: Nitric oxide inhibition stimulates the enhancement of alpha 1 agonist-induced vasoconstriction in diabetes. *J. Surg. Res.* 70. 119-23.
- [6] Fleischhacker, E., V. E. Esenabhalu, M. Spitaler, S. Holzmann, F. Skrabal, B. Koidl, G. M. Kostner, W. F. Graier. 1999. Human diabetes is associated with hyperreactivity of vascular smooth muscle cells due to altered subcellular  $Ca^{2+}$  distribution. *Diabetes.* 48. 1323-30.
- [7] Tesfamarian, B., R. A. Cohen. 1992. Abstrak: Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am. J. Physiol.* 263. 321-6.
- [8] Griendling, K. K., C. A. Minieri, J. D. Ollerenshaw, R. W. Alexander. 1994. Abstrak: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 74. 1141-1148.
- [9] Giugliano, D., G. Paulisso, A. Ceriello. 1996. An oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetic Care.* 19. 257-267.
- [10] Ushio-Fukai, M., A. M. Zafari, T. Fukui, N. Ishizaka, K. K. Griendling. 1996. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensinII-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 271. 23317-23321.
- [11] Cohen, R. A. 1997. Endothelial dysfunction in diabetic vascular disease. *Medicographia.* 19. 157-161.
- [12] Pagano, P. J., S. J. Chanock, D. A. Siwik, W. S. Colucci, J. K. Clark. 1998. Angiotensin II induces p67<sup>phox</sup> mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension.* 32. 331-7.
- [13] Baynes, J. W., S. R. Thorpe. 1999. Perspectives in diabetes: role of oxidative stress in diabetic complications, a new perspective on an old paradigm. *Diabetes.* 48. 1-9.
- [14] Laight, D. W., M. J. Carrier, E. E. Anggard. 2000. Antioxidant, diabetes and endothelial dysfunction. *Elsevier Cardiovas. Res.* 47. 457-464.
- [15] Touyz, R. M., E. L. Schiffrin. 2000. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Rev.* 52. 639-672.
- [16] Hink, U., H. Li, H. Mollnau, M. Oelze, E. Matheis, M. Hartmann, M. Skatchkov, F. Thaiss, R. A. K. Sthal, A. Warnholtz, T. Meinertz, K. Griendling, D. G. Harrison, U. Forstermann, T. Munzel. 2001. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ. Res.* 88. 14-22.
- [17] Cai, H., D. G. Harrison. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87. 840-844.
- [18] Mather, T. J. 2000. L-arginine. In: Continuing Education Module. New Hope Institute of Retailing.
- [19] Ogonowski, A. A., W. H. Kaesemeyer, L. Jin, V. Ganapathy, F. H. Leibach, R. W. Caldwell. 2000. Effects of NO donors and synthase agonist on endothelial cell uptake of L-arg

- and superoxide production. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278. C136-143.
- [20] Govers, R., and T.J. Rabelink. 2001. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280. F193-206.
- [21] Mans, A. M., R. DeJoseph, D. W. Davis, R. A. Hawkins. 1987. Abstrak: Regional amino acid transport into brain during diabetes: effect of plasma amino acids. *Am. J. Physiol.* 253. 575-583.
- [22] Pierce, G. N., R. E. Beamish, N. S. Dhalla. 1988. Heart dysfunction in diabetes. In: Reaserch Models of Diabetes Mellitus. CRC Press Inc, Florida. 2. 23-50.
- [23] Pieper, G. M., L. A. Dondlinger. 1997. Plasma and vascular tissue arginine are decreased in diabetes: acut arginine supplementation restores endothelium-dependent relaxation by augmenting cGMP production. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283. 684-691.
- [24] Hagenfeldt, L., G. Dahlquest, B. Persson. 1989. Abstrak: Plasma amino acids in relation to metabolic control in insulin-dependent diabetic children. *Acta Pediatr. Scand.* 794. 278-282.
- [25] Grill, V., O. Björkman, M. Gutniak, M. Lindqvist. 1992. Abstrak: Brain uptake and release of amino acids in non diabetic and insulin-dependent diabetic subjects: important role of glutamine release for nitrogent balance. *Metabolism.* 41. 28-32.
- [26] Nurdiana. 1993. Efek asetilkolin pada kolon tikus dengan diabetes mellitus. Tesis. Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- [27] Abebe, W., Harris, K. H., Macleod, K. M., 1990. Enhanced contractile responses of arteries from diabetic rats to  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation in the absence and presence of extracellular calcium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16(2). 239-248.
- [28] Salimudin, K. C. Upadhyaya, N. Z. Baquer, 1999. Abstrak: Effect of vanadate on expression of liver arginase in experimental diabetic rats. *IUBMB Life.* 48(2).
- [29] Salimudin, K. C. Upadhyaya, J. Raju, N. Z. Baquer. 1999. Abstrak: Modulation of mRNA levels of liver arginase by insulin and vanadate in experimental diabetes. *Indian Biochem Biophys.* 36(2).
- [30] Bivalacqua, T. J., W. J. Hellstrm, P. J. Kadowitz, H. C. Champion. 2001. Abstrak: Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun.* 283(4).
- [31] Graier, W. F., T. C. Wascher, L. Lackner, H. Toplak, G. J. Krejs, W. R. Kukovetz. 1993. Exposure to elevated D-glucose concentrations modulates vascular endothelial cell vasodilatory response. *Diabetes.* 42. 1497-1505.
- [32] Kikuta, K-I., T. Sawamura, S. Miwa, M. Hashimoto, M. Masaki. 1998. High-affinity arginine transport of bovine aortic endothelial cells is impaired by lysophosphatidylcholine. *Circ. Res.* 83. 1088-1096.
- [33] Posch, K., S. Simecek, T. C. Wascher, G. Jürgens, S. Baumgartner-Parzer, G. M. Kostner, W. F. Graier. 1999. Glycated low-density lipoprotein attenuates shear stress-induced nitric oxide synthesis by inhibition of shear stress-activated L-arginine uptake in endothelial cells. *Diabetes.* 48. 1331-1337.
- [34] Posch, K., W F. Graier. 1999. Selective stimulation of L-arginine uptake contributes to shear stress-induced formation of nitric oxide. *Life Sci.* 64. 663-670.
- [35] Loscalzo, J. 2000. What we know and don't know about L-arginine and NO. *Circulation.* 101. 2126-2129.
- [36] Wever, R .M. F., T. VanDam, H. J. VanRijn, F. DeGroot, T. J. Rabelink. 1997. Abstrak: Tetrahydrobiopterine regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273. 340-344.
- [37] Vasquez-Vivar, J., B. Kalyanaraman, P. Martasek, N. Hogg, B. S. S. Masters, H. Karoui, P. Tordo, K.A. Pritchard. 1998. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95. 9220-9225.
- [38] Lefkowitz, R. J., S. Cotecchia, P. Samama, T. Costa. 1993. Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol. Sci.* 14. 303-307.
- [39] Han, C., J. Li., K. P. Minneman. 1990. Subtypes of  $\alpha_1$ -adrenoreceptor in rat blood vessel. *Eur. J. Pharmacol.* 190. 97-104.
- [40] Aboud, R., M. Shafi, J. R. Docherty. 1993. Investigation of the subtypes of  $\alpha_1$ -adrenoreceptor mediating contraction of rat aorta, vas deferens and spleen. *Br. J. Pharmacol.* 109. 80-87.

- [41] Ross, E. M. 1996. Pharmacodynamics: mechanisms of drug action and the relationship between drug concentration and effect. In: Hardman, J. G., L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon, A. G. Gilman (eds). Goodman and Gilman's: the pharmacological basis of therapeutic, editors-in-chief by Ninth edition. International edition. McGraw-Hill. 2. 29-41.
- [42] Ghosh, M. N. 1971. Fundamental of experimental pharmacology. Scientific Book Agency, Calcuta. 4. 16-24.
- [43] Bowman, W. C., M. J. Rand. 1984. Textbook of pharmacology. Second edition. Blackwell Scientific Publication.
- [44] Zochodne, D. W., V. M. K. Verge, C. Cheng, Höke, C. Joley, K. Thomsen, I. Rubin, M. Lauritzen. 2000. Nitric oxide synthase activity and expression in experimental diabetic neuropathy. *J. Neuropathol. Exp. Neuro.* 59. 798-807.
- [45] Ralevic, V., A. Belai, G. Burnstock. 1995. Abstrak: Effects of streptozotocin-diabetes on sympathetic nerve, endothelial and smooth muscle function in the rat mesenteric arterial bed. *Eur. J. Pharmacol.* 14. 286. 193-199.
- [46] Zhu, B. H., Y. Y. Guan, J. Min, H. He. 2001. Abstrak: Contractile responses of diabetic rat aorta to phenylephrine at different stages of diabetic duration. *Acta Pharmacol. Sin.* 22. 445-449.
- [47] Chow, W. L., L. Zhang, K. M. MacLeod. 2001. Noradrenalin-induced changes in intracellular  $Ca^{2+}$  and tension in mesenteric arteries from diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 134. 179-187.
- [48] Meier, M., G. L. King. 2000. Protein kinase C. In: LeRoith, D., S. I. Taylor, J. M. Olefsky (eds). Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text. Second edition. Lippincott Williams and Wilkins. 102. 1016-1027.
- [49] Kawasaki, H. 1997. Abstrak: Pharmacological studies on alterations in contractile reactivity in aortas isolated from experimental diabetic rats. *Hokkaido Igaku Zasshi.* 72. 649-565.
- [50] Konishi, H., M. Tanaka, Y. Takemura, H. Matsumaki, Y. Ono, U. Kikkawa, Y. Nishizuka. 1997. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to  $H_2O_2$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94. 11233-11237.
- [51] Drödge, W. 2001. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82. 47-95.
- [52] Head, R. J., P. A. Longhurst, R. L. Panek, R. E. Stizel. 1987. Abstrak: A contrasting effect of the diabetic state upon the contractile responses of aortic preparations from the rat and rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 91. 275-286.
- [53] Wolin, M.S. 2000. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20. 140-142.
- [54] Harrison, D. G. 1997. Endothelial function and oxidant stress. *Clin. Cardiol.* 20. 11-17.



## Hambatan Prostaglandin pada Pemberian OAINS dan Non-OAINS Pasca Pemakaian Alat Ortodontik

Shanty Sintessa<sup>1</sup>, H.M. Soemarmo<sup>2</sup>, Liliek Suprapti<sup>3</sup>, Iwan Hernawan<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Pascasarjana S2 Biomedik Universitas Brawijaya, Malang

<sup>2</sup>Bagian Ilmu Bedah Rumah Sakit Umum Syaiful Anwar, Malang

<sup>3</sup>Bagian Ortodontik Poligigi Rumah Sakit Umum Syaiful Anwar, Malang

<sup>4</sup>Ilmu Penyakit Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga, Surabaya

### Abstrak

Alat ortodontik pada bidang kedokteran digunakan untuk merapikan gigi agar tersusun rapi dan berada pada lengkung rahang. Sehingga mengakibatkan tekanan yang akan merangsang dan menimbulkan reaksi inflamasi jaringan sekitar. Salah satu mediator inflamasi yang mempengaruhi pergerakan gigi adalah prostaglandin (PGE<sub>2</sub>). Obat Antiinflamasi Non-Steroid (OAINS) digunakan didalam perawatan ortodontik untuk mengatasi rasa sakit akibat reaksi inflamasi yang terjadi. Sementara itu proses inflamasi diperlukan pada perawatan ortodontik melalui peran PGE<sub>2</sub> yang merangsang aktivitas osteoklas dan osteoblas, keduanya diperlukan agar gigi dapat bergerak. Pemilihan jenis selektivitas OAINS perlu diperhatikan mengingat inflamasi diperlukan dalam proses pergerakan gigi tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan pengaruh selektivitas OAINS dan non OAINS terhadap hambatan PGE<sub>2</sub> dan jumlah sel osteoklas - osteoblas tulang alveolus gigi rahang atas akibat pemakaian alat ortodontik. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan aspirin sebagai OAINS yang selektif terhadap cox 1, diklofenak sebagai OAINS selektif cox 2, dan paracetamol sebagai non OAINS. Pada penelitian ini digunakan hewan coba marmut yang terbagi menjadi kelompok kontrol (n=6), aspirin 87 mg.kg<sup>-1</sup> BB po(n=6), diklofenak 2 mg.kg<sup>-1</sup> BB po (n=6), dan paracetamol 200 mg.kg<sup>-1</sup> BB po(n=6). Perlakuan dengan alat ortodontik selama 3 hari. Konsentrasi PGE<sub>2</sub> diukur dengan spektrofotometer dan sel osteoklas-osteoblas dihitung secara histologis. Analisa anova digunakan untuk membandingkan hambatan PGE<sub>2</sub> pada pemberian aspirin, diklofenak, dan paracetamol terhadap kontrol. Uji korelasi untuk menghubungkan hambatan PGE<sub>2</sub> terhadap jumlah osteoklas-osteoblas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aspirin, diklofenak, dan paracetamol menurunkan PGE<sub>2</sub> dalam tulang dengan signifikan (p<0,01). Penurunan konsentrasi PGE<sub>2</sub> berhubungan dengan jumlah osteoklas-osteoblas yang terbentuk dengan uji korelasi yang tidak signifikan (p>0,05). Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemakaian OAINS dalam waktu 3 hari tidak mempengaruhi proses pergerakan gigi dan paracetamol dapat digunakan sebagai obat penghambat prostaglandin tanpa banyak mempengaruhi proses pergerakan gigi.

**Kata kunci:** PGE<sub>2</sub>, COX, OAINS, osteoklas, osteoblas, pergerakan gigi, alat ortodontik.

### Abstract

Orthodontic appliance in the medical field is used to straighten the teeth to be neat and on the arch of jaw, thus lead to the reaction of surround tissue inflammation. One of the inflammation mediator that affect the teeth movement is prostaglandin (PGE<sub>2</sub>). Occurred pain due to inflammation could be overcome by the administration of OAINS. However, the inflammation itself is needed for the orthodontic care through PGE<sub>2</sub> to stimulate the activity of osteoclast and osteoblast, both are essential for the teeth movement. Selectivity on OAINS become significant because inflammation is needed in the teeth movement. This study aimed to compare the effect of selectivity of OAINS and non OAINS towards the inhibition of PGE<sub>2</sub> and the cell number of osteoclast - osteoblast, on the Alveolar bone of the upper jaw teeth as a result of the use of orthodontic appliances. Aspirin as selective OAINS on cox 1, diclofenac as selective OAINS on cox 2, and paracetamol as non OAINS. We used marmot as experiment animal, grouped into control (n=6), aspirin 87 mg.kg<sup>-1</sup> BW po(n=6), diclofenac 2 mg.kg<sup>-1</sup> BW po (n=6), and paracetamol 200 mg.kg<sup>-1</sup> BW po(n=6). Orthodontic appliance were conducted for 3 days. PGE<sub>2</sub> measured by spectrophotometer and cell number of osteoclast-osteoblast were counted histologically. ANOVA was used to compare the inhibition of PGE<sub>2</sub> on the administration of aspirin, diclofenac, and paracetamol towards control. Correlation analysis was used for the inhibition of PGE<sub>2</sub> towards cell number of osteoclast-osteoblast. Results showed that aspirin, diclofenac, and paracetamol decreased PGE<sub>2</sub> significantly (p<0,01). The decreased PGE<sub>2</sub> was not correlated significantly to the cell number of osteoclast-osteoblast (p>0,05). Thus, we conclude that OAINS use in 3 days is not affecting the teeth movement and paracetamol could be used as medicine to inhibit prostaglandin with less affect on the teeth movement.

**Keywords:** PGE<sub>2</sub>, COX, OAINS, osteoclast, osteoblast, teeth movement, orthodontic appliance

\* Alamat korespondensi:

**Shanty Sintessa**

Alamat : Pascasarjana Biomedik, Universitas Brawijaya, Veteran Malang 65145

## PENDAHULUAN

Banyak persoalan gigi yang membuat orang tidak percaya diri diantaranya adalah gigi tonggos atau gigi bertumpuk [1]. Solusi bagi yang ingin giginya rapi adalah dengan menggunakan kawat gigi atau alat ortodontik [2]. Perawatan ortodontik dilakukan berdasarkan suatu prinsip bahwa bila suatu tekanan diberikan cukup lama pada gigi, terjadi pergerakan gigi. Pergerakan gigi terjadi akibat adanya proses resorpsi tulang dan pembentukan tulang atau yang disebut dengan proses remodeling tulang. Resorpsi tulang dilaksanakan oleh osteoklas, sedangkan pembentukan tulang dilaksanakan oleh osteoblas [3].

Prostaglandin sebagai mediator keradangan mempengaruhi osteoklas dan osteoblas melalui reseptornya. Prostaglandin yang berpengaruh adalah jenis Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). PGE<sub>2</sub> juga sebagai mediator penting dalam pemeliharaan massa dan struktur jaringan tulang terhadap respon kerusakan mekanis dan sintesanya di dalam tulang diatur oleh enzim siklooksigenase (cox) [4]. Terdapat 2 (dua) bentuk isoform cox yaitu cox 1 dan 2. Cox 1 berada pada semua jaringan tubuh, sebaliknya cox 2 merupakan enzim yang ada bila ada sebab dan berada dalam konsentrasi tinggi pada jaringan yang mengalami inflamasi. Obat Anti-inflamasi Non Steroid (OAINS) memiliki kemampuan untuk menghambat sintesa prostaglandin melalui enzim siklooksigenase. Obat OAINS digunakan selama perawatan dengan alat ortodontik bertujuan untuk mengurangi rasa sakit yang ditimbulkan akibat tekanan dari alat ortodontik. Pemilihan jenis OAINS perlu mendapat perhatian karena PGE<sub>2</sub> sebagai pencetus rasa sakit, diperlukan dalam mengaktifasi osteoklas dan osteoblas sehingga gigi dapat bergerak. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk membandingkan pengaruh selektivitas OAINS dan non OAINS terhadap hambatan PGE<sub>2</sub> dan jumlah sel osteoklas - osteoblas tulang alveolus gigi rahang atas akibat pemakaian alat ortodontik.

## METODE

### Persiapan

Pengamatan dilakukan dengan menggunakan hewan coba marmut dengan BB 350-500 gr dalam kondisi fisik sehat dan diberi makanan jagung. Alat ortodontik dipasang pada gigi seri atas kanan dan kiri. Perlakuan terbagi menjadi 4 (empat) kelompok berjumlah 6 ekor.

1. kelompok I : kontrol adalah marmut yang pemakaian alat ortodontik

2. kelompok II : perlakuan dengan alat ortodontik dengan pemberian aspirin
3. kelompok III: alat ortodontik dengan pemberian diklofenak
4. kelompok IV : alat ortodontik dengan pemberian paracetamol

### Pemasangan Alat Ortodontik

Marmut diletakkan pada meja kerja yang bersih dan sebelumnya ditimbang untuk mengukur berat badan. Suntikan ketalar dengan dosis 44 mgkg<sup>-1</sup> BB subkutan diberikan setelah marmut dalam kondisi tenang. Bentuk alat ortodontik adalah kawat dengan koil sederhana dengan sudut antara lengan kawat adalah 60° dan panjang lengan kawat sebesar 1 mm. Stabilisasi alat dengan menggunakan semen yang digunakan untuk penambalan gigi. Sebelum dipasang, alat diukur kekuatannya kemudian dipasang pada gigi seri atas diletakkan sepertiga dari tepi gusi dan dilingkarkan diantara gigi seri atas kanan dan kiri. Pemasangan alat ini diharapkan terjadinya pergerakan gigi kearah distal.

### Pengambilan Sampel

Marmut dibunuh dengan menggunakan metode dislokasi dan kemudian dipotong bagian kepala. Separasi rahang atas dengan menggunakan pisau bedah dan mikromotor. Rahang yang didapatkan kemudian dengan menggunakan mikromotor diambil 10 mg untuk pengukuran kadar PGE<sub>2</sub>. Rahang yang masih ada ditampung dan diberi asam sitrat selama 36 jam untuk dekalsifikasi. Tulang rahang hasil dekalsifikasi ditanam dalam parafin dan dipotong untuk dibuat slide preparat pengecatan.

### Pengukuran Konsentrasi PGE<sub>2</sub>

Serbuk dari tulang rahang ditambah dengan buffer tris-HCl sebanyak 1cc pada suhu 5°C selama 1 menit dengan tujuan memisahkan tulang alveolus yang sudah hancur dari jaringan ikat dan lemak. Homogenat disentrifugasi selama 10 menit pada 12,000 x g dan menghasilkan larutan supernatan. Supernatan kemudian difiltrasi dengan dua lapis kain katun dan disentrifugasi kembali selama 2,5 jam sehingga menghasilkan precipitat kemudian diinkubasi selama 3-5 detik pada suhu 37°C. Pemeriksaan dilanjutkan dengan penambahan KOH dalam methanol, dan methanol untuk memisahkan PGE<sub>2</sub>. Tube dibiarkan pada suhu ruangan selama 15 menit dan diabsorpsi pada panjang gelombang (λ) = 278 nm. Hasil pembacaan PGE<sub>2</sub> dari tulang alveolus tersebut kemudian

dicocokkan dengan kurva baku yang telah dibuat sebelumnya. Pengecatan Secara Histologis dengan Metode Hematoksilin-Eosin Untuk Menghitung Jumlah Osteoklas dan Osteoblas

Slide hasil potongan diletakkan pada kaca preparat kemudian dilakukan rehidrasi ulang dengan alkohol bertingkat yaitu absolut 96%, 80%, 70%, 50%, 30% dan ditambah dengan aquadest. Tetesi dengan meyer hematoksilin selama 10 menit dengan jumlah sekitar 500µl. Cuci dengan air mengalir kemudian dehidrasi dengan alkohol bertingkat dari 30%, 50%, dan 70%. Tetesi dengan eosin selama 1 menit dan cuci kembali dengan alkohol bertingkat mulai dari 70%, 50%, dan 30%. Bilas dengan aquadest dan keringkan dengan angin.

**Analisis Data**

Data hasil pengukuran konsentrasi PGE<sub>2</sub> sampel antar perlakuan dianalisa dengan menggunakan t test. Pengaruh hambatan PGE<sub>2</sub> terhadap jumlah osteoklas dan osteoblas dengan menggunakan korelasi.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Pengaruh Pemberian Aspirin, Diklofenak, dan Paracetamol Terhadap Kadar PGE<sub>2</sub>**

Pengamatan telah dilakukan untuk mengetahui hambatan PGE<sub>2</sub> pada pemberian aspirin, diklofenak, dan paracetamol terhadap pergerakan gigi dan jumlah sel osteoklas dan osteoblas tulang alveolus rahang atas akibat pemakaian alat ortodontik. Pada hasil pengamatan didapatkan perbedaan yang cukup bermakna dari hambatan PGE<sub>2</sub> pada pemberian aspirin, diklofenak, dan paracetamol (Tabel 1).

Hal ini dapat dijelaskan bahwa pemakaian obat aspirin, diklofenak, dan paracetamol dapat menurunkan konsentrasi PGE<sub>2</sub>. Aspirin dan

diklofenak merupakan obat OAINS. Mekanisme kerja obat tersebut adalah menghambat produksi PGE<sub>2</sub> melalui hambatan enzim cox [5]. Terdapat 2 bentuk isoform cox yaitu cox 1 dan 2. Cox 1 berada pada semua jaringan tubuh tetapi konsentrasi yang tinggi berada dalam ginjal saluran gastrointestinal dan platelet. Fungsi utama pada saluran gastrointestinal adalah untuk memelihara keutuhan mukosa [6].

Berdasarkan selektivitas hambatan pada cox, OAINS dikelompokkan menjadi selektif terhadap cox 1 dan cox 2. Aspirin masuk pada golongan yang lebih selektif terhadap cox 1. Pada pengamatan didapatkan hasil hambatan PGE<sub>2</sub> oleh aspirin lebih kecil bila dibandingkan dengan diklofenak (Gambar 1). Diklofenak termasuk dalam golongan OAINS yang selektif menghambat cox 2. Hal ini dapat dijelaskan bahwa cox 2 terutama sebagai enzim yang ada bila ada sebab. Ekspresi cox 2 yang rendah dapat ditingkatkan pengaturannya oleh beberapa rangsangan termasuk sitokin peradangan, racun bakteri, dan *growth factor*. Cox 2 berperan dalam proses peradangan, infeksi, dan proliferasi sel. Cox 2 berada pada konsentrasi tinggi pada jaringan yang mengalami peradangan [6]. Alat ortodontik ditetapkan sebagai penyebab tekanan [7]. Tekanan mekanis akibat pemakaian alat ortodontik menimbulkan proses peradangan pada jaringan periodontal sehingga permeabilitas pembuluh darah jaringan tersebut meningkat 20 menit setelah pemakaian alat [8].

Paracetamol juga diketahui sebagai obat yang mampu menghambat produksi PGE<sub>2</sub> yang bekerja pada pusat susunan syaraf melalui cox 3. Cox 3 diproduksi berlimpah hanya di dalam korteks serebral. Oleh karena itu hanya sedikit dalam menghambat PGE<sub>2</sub> lokal (Tabel 2).

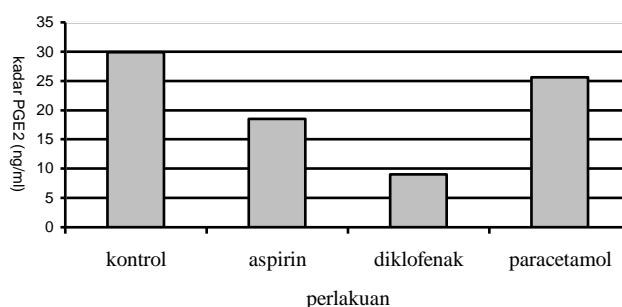
**Tabel 1.** Rerata hambatan kadar PGE<sub>2</sub> pada pemberian aspirin, diklofenak, paracetamol

Kelompok	Rerata	stdev	Analisa	Sig.
Kontrol (K)	29.867	1.086		
Aspirin (A)	18.483	1.501	*) Uji anova p = 0,0001	* P≤0.05
Diklofenak (D)	9.000	5.734	**) Uji Duncan p = 1,000	**
Paracetamol (P)	25.600	1.867		P ≥ 0,05

Keterangan :

\*) uji statistik terhadap rerata kadar PGE<sub>2</sub> pada kelompok kontrol, aspirin, diklofenak, dan paracetamol, terdapat perbedaan yang cukup bermakna antara keempat kelompok tersebut (p ≤ 0,05)

\*\*) uji statistika kadar PGE<sub>2</sub> tidak didapati kelompok perlakuan yang paling menghambat PGE<sub>2</sub> (p ≥ 0,05).



**Gambar 1.** Kadar PGE<sub>2</sub> pada perlakuan kontrol (K) tanpa pemberian obat, dengan pemberian aspirin (A), diklofenak (D), dan paracetamol (P). Pada uji anova didapatkan adanya perbedaan yang cukup bermakna ( $p \leq 0,05$ ) antara perlakuan, namun pada uji Duncan tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabel 2.** Uji Tukey HSD kadar PGE<sub>2</sub>

Perlakuan	K	A	D	P
K	-	0.000	0.000	0.122
A	0.000	-	0.000	0.004
D	0.000	0.000	-	0.000
P	0.122	0.004	0.000	-

Keterangan:

K = kelompok kontrol

A = kelompok aspirin

D = kelompok diklofenak

P = kelompok paracetamol

Cox 3 merupakan turunan dari gen cox 1 dengan perbedaan yang terletak pada intron pada mRNANYa. Cox 3 diekspresikan pada korteks serebral dan hanya dalam jumlah sangat sedikit pada jaringan lain. Pada manusia, mRNA cox 3 diekspresikan berlimpah di korteks serebral dan jantung. Simmona and Colleagues berhasil mengidentifikasi suatu enzim yang disebut dengan cox 3. Cox 3 merupakan bentuk isoform dari cox 1 tetapi diekspresikan apabila ada sebab. Kemungkinan lain bahwa cox 3 dihasilkan dari gen yang sama untuk mengkode ekspresi cox 2 dengan karakter molekuler yang berbeda. Hambatan cox 3 menggambarkan mekanisme obat yang bekerja pada sentral sehingga rasa sakit dapat tertangani dan kemungkinan juga demam. Secara selektif cox 3 hanya dapat dihambat oleh OAINS tertentu dan memiliki sensitifitas yang tinggi pada paracetamol [9]. Sebagian besar menganggap bahwa paracetamol merupakan jenis OAINS dengan kemampuan sebagai anti peradangan yang sedikit [9]. Paracetamol dapat menghambat rasa sakit dan demam seperti pada umumnya OAINS. Paracetamol lebih dikenal sebagai obat penghilang rasa sakit atau penurun panas.

Pada pengamatan yang telah dilakukan oleh Flower and Vane [9], menunjukkan bahwa paracetamol menghambat aktifitas enzim cox di

bagian otak lebih besar pengaruhnya dibanding bagian limfa. Bahkan cox 1 dan 2 tetap pada konsentrasi yang tinggi meskipun dosis paracetamol sudah dinaikkan. Berdasarkan hal tersebut maka dicurigai adanya isoenzim lain yang terkait langsung dengan kerja dari paracetamol [9].

### Pengaruh pemberian aspirin, diklofenak, dan paracetamol pada pergerakan gigi

Hasil pengukuran pergerakan gigi pada pengamatan menunjukkan bahwa pemberian aspirin, diklofenak, dan paracetamol tidak terdapat perbedaan pada pergerakan gigi akibat pemakaian alat ortodontik selama 3 hari (Tabel 3, Gambar 2). Semua jenis OAINS berhubungan dengan hambatan pembentukan prostaglandin. Pengaruh anti radang, anti demam, dan analgesik dari OAINS melalui hambatan cox 2.

**Tabel 3.** Rerata pergerakan gigi pada pemberian aspirin, diklofenak, dan paracetamol

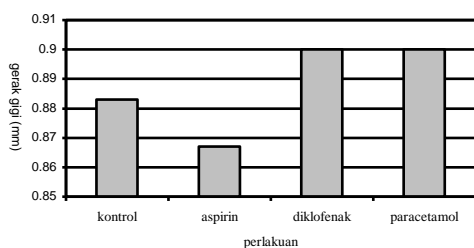
Kelompok	Rerata	stdev	Analisa	Sig.
Kontrol (K)	0.867	0.151	*)Uji anova p = 0,968	P <sub>≥</sub> 0.05
Aspirin (A)	0.883	0.147		
Diklofenak (D)	0.900	0.110		
Paracetamol (P)	0.900	0.126		

Keterangan :

\*) uji statistik terhadap rerata gerakan gigi pada kelompok kontrol, aspirin, diklofenak, dan paracetamol, tidak terdapat perbedaan yang cukup bermakna ( $p \geq 0,05$ ).

Hambatan produksi prostaglandin dipercaya merupakan mekanisme utama dari aksi OAINS melalui hambatan enzim cox dari asam arakhidonat. Penggunaan dari OAINS dapat menghambat pembentukan tulang karena hambatan pembentukan prostaglandin, tetapi tidak semua jenis NSAIDs. Jenis propionik mencegah hilangnya tulang pada beberapa

keadaan sekitarnya tetapi jenis asam asetat tidak. Dosis dan lama penggunaan juga merupakan faktor yang mempengaruhi hambatan pembentukan tulang [5]. Pengamatan pada babi dengan menggunakan indomethacin menunjukkan bahwa permukaan resorpsi yang relatif luas berkurang secara bermakna, permukaan pembentukan juga menurun tetapi tidak bermakna [10], sehingga hambatan prostaglandin perlu dihindari selama perawatan dengan alat ortodontik. Pengamatan juga dilakukan dengan pemberian indomethacin injeksi subkutan.



**Gambar 2.** Besar gerakan gigi pada perlakuan kontrol (K) tanpa pemberian obat, dengan pemberian aspirin (A), diklofenak (D), dan paracetamol (P). Pada uji anova didapatkan tidak adanya perbedaan yang bermakna ( $p \geq 0,05$ ) antara perlakuan.

Pemberian indomethacin dilakukan pada kelompok sebelum dibandingkan dengan sebelum memakai alat ortodontik. Pengamatan dilakukan setelah 3 hari pemakaian alat ortodontik. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa pada pemberian setelah pemakaian alat ortodontik, memiliki pengaruh yang sangat kecil terhadap penekanan jumlah osteoklas. Pada pemberian sebelum pemakaian menunjukkan hasil yang sebaliknya yaitu terdapat penekanan jumlah osteoklas yang cukup bermakna. Berdasarkan hasil tersebut maka apabila resorpsi tulang akan dihambat, pemberian indometachin akan lebih efektif jika diberikan sebelum pemakaian alat ortodontik [8]. Pergerakan karena alat ortodontik tergantung dari remodeling tulang tetapi mekanisme rangsangan mekanis yang dipindahkan ke dalam reaksi seluler belum secara keseluruhan dijelaskan. Beberapa faktor yang terlibat adalah neurotransmitter, siklik nukleida, sitokin, dan prostaglandin [10]. Gerakan gigi akibat pemakaian alat ortodontik mengakibatkan remodeling tulang yang berlanjut selama beberapa hari setelah pelepasan pemakaian alat

yang sesuai dengan beban, karena alat ortodontik merangsang resorpsi tulang pada sisi yang menerima beban tekanan. Perawatan ortodontik dilakukan berdasarkan suatu prinsip bahwa bila suatu tekanan diberikan cukup lama pada gigi, terjadi pergerakan karena tulang di sekeliling berubah [11].

Respon lokal akibat pemakaian alat ortodontik dipengaruhi oleh faktor sistemik seperti hormon paratiroid dan vitamin D [8]. Pemberian terapi hormon sulit dilakukan pada saat perawatan ortodontik karena pengaruhnya bersifat sistemik. Pemberian prostaglandin lebih memungkinkan dilakukan secara lokal untuk meningkatkan resorpsi tulang sehingga pergerakan gigi diharapkan lebih cepat terjadi [8].

**Pengaruh pemberian aspirin, diklofenak, dan paracetamol terhadap jumlah sel osteoklas dan osteoblas**

Tabel 4 dan Gambar 3 di bawah berikut digunakan untuk menjelaskan pengaruh pemberian aspirin, diklofenak, dan paracetamol terhadap jumlah sel osteoklas dan osteoblas. Hasil menunjukkan bahwa tidak didapatkan perbedaan yang bermakna antara penurunan jumlah sel osteoklas dan osteoblas pada pemberian aspirin, diklofenak, dan paracetamol. Kemungkinan apabila pengamatan dilakukan lebih dari 3 hari, maka pemberian aspirin, diklofenak, dan paracetamol dapat terlihat nyata perbedaannya, karena tulang alveolus melanjutkan remodeling tanpa secara langsung selama beberapa minggu setelah Bergeraknya terhadap beban alat ortodontik [11]. Pergantian tulang tetap meningkat setelah pemakaian alat ortodontik [11]. Pergerakan gigi dengan menggunakan alat ortodontik tergantung pada remodeling tulang [10].

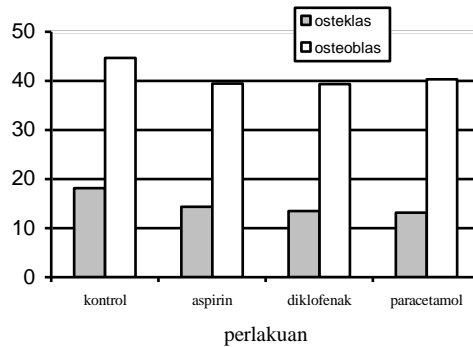
Proses remodeling tulang merupakan proses yang kompleks dan terkoordinasi yang terdiri dari proses resorpsi dan pembentukan tulang yang menghasilkan pertumbuhan dan pergantian tulang. Hasil akhir dari remodeling tulang adalah terpeliharanya matriks tulang. Proses pembentukan pada tulang dewasa hanya terjadi bila didahului oleh proses resorpsi tulang. Jadi urutan proses yang terjadi pada tempat remodeling adalah aktivasi-resorpsi-pembentukan [12].

**Tabel 4.** Rerata jumlah sel osteoklas pada pemberian aspirin, diklofenak, dan paracetamol

Kelompok	osteoklas	stdev	Analisa	osteoblas	stdev	Analisa
Kontrol (K)	18.17	8.08	*) Uji Anova p = 0,464 (tidak bermakna)	44.67	15.16	*) Uji Anova p = 0,948 (tidak bermakna)
Aspirin (A)	14.33	5.82				
Diklofenak (D)	13.50	6.28				
Paracetamol (P)	13.17	2.14				

Keterangan :

\*) uji statistik terhadap rerata jumlah sel osteoklas dan osteoblas pada kelompok kontrol, aspirin, diklofenak, dan paracetamol, tidak terdapat perbedaan yang cukup bermakna ( $p \geq 0,05$ ).



**Gambar 3.** Jumlah sel osteoklas dan osteoblas pada perlakuan kontrol (K) tanpa pemberian obat, dengan pemberian aspirin (A), diklofenak (D), dan paracetamol (P). Pada uji anova didapatkan tidak adanya perbedaan yang bermakna ( $p \geq 0,05$ ) dari jumlah osteoklas dan osteoblas antara perlakuan

BSP (*bone sialoprotein*) terlibat dalam mineralisasi tulang selama remodeling tulang secara fisiologis. Pada pemberian tekanan dari alat ortodontik, osteoblas diaktifkan dan diinduksi oleh mRNA yang diekspresikan oleh BSP. BSP ini terlibat dalam proses remodeling tulang selama pemakaian alat ortodontik [13]. Yun Cho [14] telah mengamati remodeling tulang alveolus pada pemakaian alat ortodontik yang diamati pada hari ke 1, 3, 5, 7, 14, dan 21. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada hari 1 osteoklas mulai aktif dan berada pada puncak aktivasi pada hari ke 3. pengamatan hari ke 3 menunjukkan bahwa osteoblas mulai aktif dan puncak aktivasi terjadi pada hari ke 14.

Osteoblas didapatkan pada daerah pembentukan tulang remodeling dan penyembuhan patah tulang. Aktivitas osteoblas ini selalu disertai aktivitas osteoklas [15]. Osteoblas merupakan sumber utama dari produksi prostaglandin dalam tulang [16]. Faktor yang mempengaruhi diferensiasi osteoblas antara lain BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) oleh berbagai sitokin lain seperti interleukin, *Insulin Growth Factor* (IGF), dan *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF). Berbagai sitokin dan BMP telah terbukti mempengaruhi diferensiasi osteoblas secara invitro. Aktivitas osteoblas selalu disertai aktivitas osteoklas. Kerjasama

osteoklas dan osteoblas dalam peristiwa resorpsi dan deposisi tulang merupakan mekanisme yang berpasangan. Osteoblas dapat mengalami apoptosis bila regulasi sintesis berhenti, dan osteosit rusak bila matriks mengalami siklus ulang [17]. Osteoklas merupakan sel yang mendasari terjadinya pergerakan gigi akibat alat ortodontik [17]. Osteoklas adalah makrofag polikarion khusus yang diferensiasinya terutama diatur oleh *macrophage colony stimulating factor*, *RANK ligand* dan *osteoprotegerin*. *Integrin-mediated signal* menyebabkan osteoklas menunjukkan sitoskeleton yang memungkinkan terbentuknya *microenvironment* tertentu antara dirinya dengan tulang dan kemudian terjadi degradasi matriks melalui proses transport proton [17]. Terjadinya remodeling tulang disebabkan oleh pemakaian alat ortodontik mengakibatkan jumlah osteoklas lebih banyak terdapat di daerah yang mengalami tekanan, sedangkan di daerah tarikan lebih banyak dijumpai sel osteoblas. Jumlah osteoklas dipengaruhi selain oleh besarnya tekanan juga oleh lamanya pemakaian alat. Selama pemakaian alat ortodontik sampai hari ke 16 menunjukkan bahwa adanya peninggian osteoklas di bagian mesial pada hari pertama setelah pemakaian alat digambarkan bahwa gelombang kedua dari sel

yang mengalami resorpsi, dilanjutkan dengan pergantian tulang alveolus setelah pemasangan alat dan pergerakan gigi juga perubahan secara histologis [11] sesuai dengan beban jaringan secara langsung, berlanjut pada waktu setelah pemakaian alat. Resorpsi merupakan proses awal dari remodeling tulang pada pemakaian alat ortodontik [18].

**Uji Korelasi Hambatan PGE<sub>2</sub> dengan Pergerakan Gigi dan Uji Korelasi Hambatan PGE<sub>2</sub> dengan Jumlah Sel Osteoklas**

Uji korelasi hubungan antara hambatan PGE<sub>2</sub> dengan pergerakan gigi (Tabel 5) dan jumlah sel osteoklas (Tabel 6) menunjukkan bahwa hanya pada perlakuan tanpa pemberian obat dan dengan pemberian diklofenak terdapat hubungan dan hubungannya bersifat berlawanan. Artinya penurunan kadar PGE<sub>2</sub> diikuti penambahan besar pergerakan gigi dan jumlah sel osteoklas, sedang pada pemberian aspirin dan paracetamol terdapat hubungan penurunan kadar PGE<sub>2</sub> dengan pergerakan gigi tetapi tidak bermakna. Hal ini dapat dijelaskan karena sifat PGE<sub>2</sub> yang *biphasic*. Pengaruh *biphasic* PGE<sub>2</sub> pada aktivitas alkalin fosfatase kemungkinan dimediasi melalui pengaruh rangsangan reseptor EP<sub>4</sub> dalam kadar yang rendah dan pengaruh hambatan dari kadar EP<sub>1</sub> yang tinggi [19]. Prostaglandin merupakan senyawa yang menyerupai hormon dan berperan penting pada berbagai proses fisiologis. Prostaglandin diproduksi secara lokal dan merangsang aktifitas sel didekat sisi produksi prostaglandin. Proses metabolisme prostaglandin berlangsung secara cepat dan pengaruhnya terhadap jaringan

beraneka tergantung pada jenis prostaglandin dan jaringannya [20].

PGE<sub>2</sub> bekerja dengan perantara reseptor membran. Terdapat empat sub tipe reseptor PGE<sub>2</sub> yaitu EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub>, dan EP<sub>4</sub>, yang masing-masing disandi oleh gen yang berbeda. Reseptor tersebut diekspresikan berbeda oleh sel imun, dan fungsi sel imun tersebut akan berbeda tergantung adanya PGE<sub>2</sub> pada daerah keradangan. Reseptor melanjutkan reaksi intraseluler setelah berikatan dengan ligan. Reseptor EP<sub>2</sub> dan EP<sub>4</sub> adalah suatu bentuk reseptor isoform dengan EP<sub>3</sub> yang dapat berpasangan dengan G protein untuk meningkatkan cAMP intraseluler.

Reseptor EP<sub>1</sub> menyebabkan peningkatan kadar calcium intraseluler. EP<sub>3</sub> berpasangan dengan Gi protein mengakibatkan penurunan cAMP, juga mobilisasi kalsium intraseluler. Jadi terdapat efek yang berlawanan pada banyak sel imun yang terekspresi pada banyak reseptor. Pengaturan EP<sub>2</sub> dan EP<sub>4</sub> dapat dijadikan contoh mekanisme pengaturan sel atas respon PGE<sub>2</sub>.

Walaupun kedua reseptor berikatan dengan PGE<sub>2</sub> secara seimbang dan berpasangan dengan Gs protein, sejumlah penelitian menunjukkan prostaglandin ini tidak mempunyai fungsi selular yang serupa. Terdapat perbedaan respon sel pada masing-masing reseptor. Jadi pengaruh PGE<sub>2</sub> selama proses keradangan pada sel imun ditentukan susunan reseptor yang terekspresi dan *intracellular pathway* dari sel.

Belum banyak pengamatan tentang peranan reseptor tersebut, tetapi terdapat petunjuk bahwa PGE<sub>2</sub> merangsang diferensiasi osteoblas melalui reseptor EP<sub>4</sub> pada pengamatan dengan menggunakan kultur *bone marrow* [4].

**Tabel 5.** Korelasi *pearson* antara kadar PGE<sub>2</sub> dengan besar pergerakan gigi

Sel osteoklas	Nilai uji korelasi	Kadar PGE <sub>2</sub>			
		Kontrol	Aspirin	Diklofenak	Paracetamol
Kontrol	Korelasi <i>pearson</i>	-0.528			
	p	0.282			
	n	6			
Aspirin	Korelasi <i>pearson</i>		0.349		
	p		0.498		
	n		6		
Diklofenak	Korelasi <i>pearson</i>			-0.248	
	p			0.636	
	n			6	
Paracetamol	Korelasi <i>pearson</i>				-0.271
	p				0.604
	n				6

Keterangan : Dinyatakan ada korelasi apabila  $0,2 \leq r$  atau  $r \leq -0,2$ . Korelasi bermakna apabila  $p \leq 0,05$ . n= jumlah sampel

**Tabel 6.** Korelasi *pearson* antara kadar PGE<sub>2</sub> dengan jumlah sel osteoklas

Sel osteoklas	Nilai uji korelasi	Kadar PGE <sub>2</sub>			
		Kontrol	Aspirin	Diklonofak	Paracetamol
Kontrol	Korelasi <i>pearson</i>	-0.528			
	p	0.282			
	n	6			
Aspirin	Korelasi <i>pearson</i>		0.349		
	p		0.498		
	n		6		
Diklonofak	Korelasi <i>pearson</i>			-0.248	
	p			0.636	
	n			6	
Paracetamol	Korelasi <i>pearson</i>				-0.271
	p				0.604
	n				6

Keterangan : Dinyatakan ada korelasi apabila  $0,2 \leq r$  atau  $r \leq -0,2$ . Korelasi bermakna apabila  $p \leq 0,05$ . n= jumlah sampel

Peranan reseptor EP<sub>4</sub> terhadap pembentukan osteoklas juga telah dilakukan melalui pemberian obat antagonis reseptor tersebut dan menunjukkan adanya hubungan dengan resorpsi tulang [4]. Peranan EP<sub>2</sub> diduga berpengaruh pada pertumbuhan jaringan tulang [4] Reseptor PGF<sub>2α</sub> memediasi kemampuan prostaglandin dalam menghambat sintesis kolagen dan menginduksi prostaglandin G/H sintase didalam sel.

**Uji Korelasi Hambatan PGE<sub>2</sub> dengan Jumlah Sel Osteoblas dan Uji Korelasi Pergerakan Gigi dengan Jumlah Sel Osteoklas**

Proses Bergeraknya gigi akibat pemakaian alat ortodontik adalah merupakan hasil dari respon biologis terhadap tekanan mekanis. Perubahan yang terjadi pada tulang akibat tekanan mekanis

antara lain terjadi resorpsi tulang, pembentukan tulang, dan perubahan yang terjadi pada ligamen periodontal, perubahan komposisi kimia dan perubahan enzimatik [8]. Pembuktian peranan prostaglandin terhadap pergerakan gigi telah dilakukan. Pengamatan ini dilakukan dengan cara memberikan injeksi submukosa prostaglandin. Hasilnya terdapat jumlah osteoklas yang lebih banyak jika dibandingkan dengan kontrol dan resorpsi tulang lebih besar terjadi (Tabel 7 dan 8). Prostaglandin dihasilkan dari membran lipid jaringan periodontal pada daerah bebas. Tekanan mekanis dari alat ortodontik menimbulkan gangguan membran sel jaringan periodontal sehingga sintesis dan sekresi prostaglandin meningkat. Mekanisme peranan prostaglandin melalui cAMP dan kalsium intrasel [8].

**Tabel 7.** Korelasi *pearson* antara kadar PGE<sub>2</sub> dengan jumlah sel osteoblas

Osteoblas	Nilai uji korelasi	Kadar PGE <sub>2</sub>			
		Kontrol	Aspirin	Diklonofak	Paracetamol
Kontrol	Korelasi <i>pearson</i>	0.226			
	p	0.666			
	n	6			
Aspirin	Korelasi <i>pearson</i>		0.098		
	p		0.854		
	n		6		
Diklonofak	Korelasi <i>pearson</i>			0.495	
	p			0.318	
	n			6	
Paracetamol	Korelasi <i>pearson</i>				0.760
	p				0.079
	n				6

Keterangan : K=kontrol, A=aspirin, D=diklofenak, P=paracetamol. Dinyatakan ada korelasi apabila  $0,2 \leq r$  atau  $r \leq -0,2$ . Korelasi bermakna apabila  $p \leq 0,05$ . n= jumlah sampel



**Tabel 8.** Korelasi *pearson* antara pergerakan gigi dengan jumlah sel osteoklas

Gerak gigi	Nilai uji korelasi	Sel osteoklas			
		Kontrol	Aspirin	Diklonofak	Paracetamol
Kontrol	Korelasi <i>pearson</i>	0.449			
	p	0.372			
	n	6			
Aspirin	Korelasi <i>pearson</i>		0.521		
	p		0.289		
	n		6		
Diklonofak	Korelasi <i>pearson</i>			0.261	
	p			0.617	
	n			6	
Paracetamol	Korelasi <i>pearson</i>				0.666
	p				0.149
	n				6

Keterangan : Dinyatakan ada korelasi apabila  $0,2 \leq r$  atau  $r \leq -0,2$ . Korelasi bermakna apabila  $p \leq 0,05$ . n= jumlah sampel

**Uji Korelasi Pergerakan Gigi dengan Jumlah Sel Osteoblas dan Uji Korelasi Jumlah Sel Osteoklas dengan Osteoblas**

Uji korelasi hubungan antara pergerakan gigi dengan jumlah sel osteoklas dan osteoblas (Tabel 9) menunjukkan bahwa pada perlakuan tanpa pemberian obat dan dengan pemberian diklofenak dan paracetamol, terdapat hubungan tetapi tidak bermakna. Hal ini berhubungan

dengan hari perlakuan. Pada hari ke tiga dikatakan bahwa osteoklas sedang berada dalam puncak aktivitas dan berlanjut sampai pada hari ke 7, sedangkan osteoblas baru mulai teraktivasi dan dalam puncak aktivasi pada hari ke 14 [13]. Jumlah sel osteoklas dan osteoblas pada perlakuan dengan pemberian aspirin, diklofenak, dan paracetamol, terjadi penurunan dibandingkan dengan kontrol tanpa pemberian obat.

**Tabel 9.** Korelasi *pearson* antara pergerakan gigi dengan jumlah sel osteoblas

Gerak gigi	Nilai uji korelasi	Sel osteoblas			
		Kontrol	Aspirin	Diklonofak	Paracetamol
Kontrol	Korelasi <i>pearson</i>	-0.216			
	p	0.681			
	n	6			
Aspirin	Korelasi <i>pearson</i>		0.879*		
	p		0.021		
	n		6		
Diklonofak	Korelasi <i>pearson</i>			0.494	
	p			0.319	
	n			6	
Paracetamol	Korelasi <i>pearson</i>				0.294
	p				0.572
	n				6

Keterangan : Dinyatakan ada korelasi apabila  $0,2 \leq r$  atau  $r \leq -0,2$ . Korelasi bermakna apabila  $p \leq 0,05$ . n= jumlah sampel

**Tabel 10.** Korelasi *pearson* antara jumlah sel osteoklas dengan osteoblas

Sel osteoblas	Nilai uji korelasi	Sel osteoklas			
		Kontrol	Aspirin	Diklonofak	Paracetamol
Kontrol	Korelasi <i>pearson</i>	0.152			
	p	0.773			
	n	6			
Aspirin	Korelasi <i>pearson</i>		0.112		
	p		0.833		
	n		6		
Diklonofak	Korelasi <i>pearson</i>			0.946**	
	p			0.004	
	n			6	
Paracetamol	Korelasi <i>pearson</i>				0.006
	p				0.992
	n				6

Keterangan : Dinyatakan ada korelasi apabila  $0,2 \leq r$  atau  $r \leq -0,2$ . Korelasi bermakna apabila  $p \leq 0,05$ . n= jumlah sampel

Tetapi pada uji korelasi hubungan antara jumlah sel osteoblas dengan jumlah sel osteoklas (Tabel 10) menunjukkan bahwa hanya pada perlakuan dengan pemberian aspirin terdapat hubungan yang sangat bermakna. Hal ini juga berhubungan dengan hari perlakuan karena perbedaan hari aktivasi dari sel osteoklas dan sel osteoblas.

#### KESIMPULAN

Pemberian aspirin, diklofenak, dan paracetamol pada pemakaian alat ortodontik menghambat produksi PGE<sub>2</sub> tulang alveolus rahang melalui hambatan kerja enzim cox 1, 2, dan 3. Pemberian OAINS selektif cox 1, selektif cox 2, dan non OAINS pada pemakaian alat ortodontik selama 3 hari tidak mempengaruhi besar pergerakan gigi. Pemberian OAINS selektif cox 1, selektif cox 2, dan non OAINS pada pemakaian alat ortodontik selama 3 hari tidak menurunkan jumlah sel osteoklas dan osteoblas secara nyata. Selain itu kadar PGE<sub>2</sub> yang menurun pada OAINS selektif cox 1, selektif cox 2, dan non OAINS tidak berpengaruh pada proses pergerakan gigi pada pemakaian alat ortodontik selama 3 hari. Kadar PGE<sub>2</sub> yang menurun pada pemberian OAINS selektif cox 1, selektif cox 2, dan non OAINS tidak cukup mempengaruhi penurunan jumlah sel osteoklas dan osteoblas tulang alveolus rahang akibat pemakaian alat ortodontik selama 3 hari. Pergerakan gigi pada pemberian OAINS selektif cox 1, selektif cox 2, dan non OAINS tidak berpengaruh pada jumlah sel osteoklas dan osteoblas tulang alveolus rahang akibat pemakaian alat ortodontik selama 3 hari.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] Buletin Mingguan Melsa. 2002. Tampil Cantik dengan Kawat Gigi. Melsa-i-net Weekly Bulletin 1-3.
- [2] Situs Gigi Indonesia. 2001. Solusi bagi yang ingin giginya rapi. Konsultasi gigi.com. h. 1-3. [http://www/konsultasiGIGI\\_com-situs\\_gigi\\_Indonesia-Topik\\_Juni\\_2001.htm](http://www/konsultasiGIGI_com-situs_gigi_Indonesia-Topik_Juni_2001.htm)
- [3] Soeatmadji, J. W. 2002. Kendali Hormonal Metabolisme Calcium dan Skeletal. Dalam: Soeatmadji, D. W., A. Rudijanto, P. M. Arsana (Eds). Kursus Dasar Metabolisme Kalsium dan Penyakit Tulang. Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. PB. Perkeni. IV (3).
- [4] Nulend, J. K., E. H. Burger. 1999. Prostaglandins and Bone. Department of

Oral Cell Biology. The European Calcified Tissue Society, 1-8. [http://www.etcsoc.org/review/006\\_klei.htm](http://www.etcsoc.org/review/006_klei.htm).

- [5] Bandolier. 2002. Do NSAIDs Inhibit bone healing?. Evidence Based Health Care. <http://www/DoNSAIDsInhibitBoneHealing.htm>.
- [6] Feldman, M., T. A. McMahon. 2000. Do cyclooxygenase-2 inhibitor provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs, with less gastrointestinal toxicity?. *Ann. Intern. Med.* 132 (2). 134-43.
- [7] Forsea, J. N. 1997. Physiologic changes in orthodontists in response to specific orthodontic procedures. Orthodontics Research NYU College of Dentistry, 1-19.
- [8] Yamasaki, K., F. Miura, T. Suda. 1980. Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats. *J. Dent. Rest.* 59(10). 1635-1642.
- [9] Chandrasekharan, N. V., H. Dai, K. L. Roos, N. K. Evanson, J. Tomsik, T. S. Elton, D. L. Simmons. 2002. Cox 3, a cyclooxygenase 1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/ antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. Department of Chemistry and Biochemistry. 99 (21). 13371-13373.
- [10] Giunta, D., J. Keller, F. F. Nielson, B. Melson. 1995. Influence of Indometracin on bone turnover related to orthodontic tooth movement in miniature pigs. *Am. Assoc. Orthod.* 108 (4). 361-365.
- [11] King, G. J., L. Latta, J. Rutenberg, A. Ossi, S. D. Kelling. 1997. Alveolar bone turnover and tooth movement in male rats after removal of orthodontic appliances. *Am. J. Orthod. Dentofac Orthop.* 111(3). 266-275.
- [12] Setyohadi, B. 2007. Osteoporosis. Buku ajar penyakit dalam. Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia. Jakarta. 1259-1274.
- [13] Domon, S., H. Shimokawa, S. Yamaguchi, K. Soma. 2000. Temporal and spatial mRNA expression of bone sialoprotein and type I collagen during rodent tooth movement. *Eur. J. Orthod.* 23(4). 339-48.
- [14] Yun Cho. 1996. A histologic study of The alveolar bone remodelling on The Periosteal side incident to experimental tooth movement. *Dentistry in Japan.* 33. 79-82.
- [15] Dradjat, R. S. 2002. Struktur dan fungsi skeleton. Dalam: Soeatmadji, D. W., A. Rudijanto, P. M. Arsana (Eds). Kursus Dasar

- Metabolisme Kalsium dan Penyakit Tulang. Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. PB. Perkeni. III. 1-9.
- [16] Brian, D., Golden, and S.B. Ambramson. 1999. Selective COX-2 Inhibitors for Arthritis: from Bench to Beside. Cutting Edge Report. Department of Rheumatology, Hospital for Joint Diseases. New York University School of Medicine. 1-4. <http://www.rheuma21st.com>.
- [17] Suryana, B. P. P., H. Kalim. 2002. Osteoporosis primer. Dalam: Soeatmadji, D. W., A. Rudijanto, P. M. Arsana (Eds). Kursus Dasar Metabolisme Kalsium dan Penyakit Tulang. Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. PB. Perkeni. VII.
- [18] Melsen, B. 2001. Tissue reaction to orthodontic tooth movement-a new paradigm. *Eur. J. Orthod.* 23 (6). 671-81.
- [19] Calabrese, E. J. 2001. Prostaglandins: biphasic dose responses. *Critical Rev. Toxicol.* 31(4-5). 475-487.
- [20] Kreutz, S. 2002. Prostaglandins-hormone-like substances with great potential, 1-4. [http://www/JamulIndonesia\\_com-prostaglandins-hormons-like-substances.htm](http://www/JamulIndonesia_com-prostaglandins-hormons-like-substances.htm)

## Proteksi Kombinasi Minyak Wijen dan $\alpha$ -tocopherol Terhadap Glomerular Injury Melalui Penghambatan Stres Oksidatif Tikus Hiperkolesterolemia

Dewi Sukmawati\*

Program Pascasarjana, Universitas Brawijaya, Malang

### Abstrak

Minyak wijen (MW) kaya akan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) terutama linoleat yang diketahui dapat menurunkan kadar lipid dalam darah. Namun, salah satu kelemahan PUFA sebagai hipolipidemik adalah cenderung mudah untuk teroksidasi karena struktur ikatan rangkapnya. Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) diketahui dapat melindungi struktur PUFA terhadap oksidasi serta dapat menghambat stres oksidatif. Peningkatan stres oksidatif pada hiperkolesterolemia diduga kuat berperan penting dalam patogenesis *glomerular injury*. Tujuan penelitian ini untuk membuktikan bahwa penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen mempunyai efek sinergis dalam mencegah *glomerular injury* melalui penurunan stres oksidatif. Penelitian ini menggunakan *Rattus novergicus* strain Wistar jantan (200 g) yang dibagi menjadi tujuh kelompok masing – masing 4 ekor, kelompok hiperkolesterol (HK), kelompok ke-2, ke-3 dan ke-4 adalah kelompok HK + MW (dosis masing-masing 0,3; 0,6, dan 1,2 ml), sedangkan kelompok ke-5, ke-6 dan ke-7 adalah kelompok HK + MW (dosis masing – masing 0.3, 0.6 dan 1.2 ml) +  $\alpha$ -tocopherol 20 mg). Pengukuran kadar kolesterol total, *Low Density Lipoprotein* (LDL), ureum dan kreatinin darah dilakukan pada minggu ke-10. Aktivitas stres oksidatif jaringan ginjal diukur dari kadar *malondialdehyde* (MDA) menggunakan uji *thiobarbituric acid* (TBA) dan kadar *superoxyde dismutase* (SOD) jaringan dengan uji *Nitroblue tetrazolium* (NBT). Pemeriksaan histologis dilakukan untuk melihat deposit matriks dan jumlah sel mesangial pada glomerulus dengan pengecatan *Periodic Acids Schiff* (PAS). Hasil penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan bermakna penurunan kadar MDA antara kelompok MW dengan MW +  $\alpha$ -tocopherol pada dosis 0.3 ( $p = 0.000$ ) dan 0.6ml ( $p = 0.001$ ) yang menunjukkan interaksi sinergistik MW +  $\alpha$ -tocopherol serta kecenderungan penurunan kadar SOD. Terdapat dugaan interaksi secara potensiasi dengan penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen terhadap penurunan kadar kolesterol total dan LDL. Gambar histologis *glomerular injury* menunjukkan bahwa kombinasi MW +  $\alpha$ -tocopherol dapat menghambat peningkatan jumlah sel ( $p = 0.000$ ) dan matriks mesangial ( $p = 0.614$ ). Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen mempunyai efek yang lebih baik dibanding minyak wijen sendiri dalam menghambat *glomerular injury* melalui penghambatan stres oksidatif di jaringan ginjal secara sinergis.

**Kata kunci:**  $\alpha$ -tocopherol, *glomerular injury*, minyak wijen, stres oksidatif.

### Abstract

Sesame oil is rich of polyunsaturated fatty acid (PUFA) especially linoleic acid which is known to reduce lipid content in blood. However, one susceptibility of PUFA as hypolipidemic is it tends to be oxidized because of its double bond structure. Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) was known to protect the structure of PUFA towards oxidation and inhibit oxidative stress. The increase of oxidative stress on hypercholesterolemia is strongly expected to have important role in pathogenesis of glomerular injury. This study aimed to assess the addition of  $\alpha$ -tocopherol on sesame oil that has the effect of synergy in inhibiting glomerular injury through the decrease of oxidative stress. We used male *Rattus novergicus* strain Wistar (BW 200 g) in seven groups, 4 rats for each group. The groupss are: hypercholesterol (HC), group 2, 3 and 4 is HC + sesame oil (Each dose 0.3; 0.6, and 1.2 ml, respectively), while group 5, 6 and 7 is HC + sesame oil (Each dose 0.3; 0.6, and 1.2 ml, respectively) +  $\alpha$ -tocopherol 20 mg. Total cholesterol, Low Density Lipoprotein (LDL), ureum and creatinine of blood were measured on the 10<sup>th</sup> week. Oxidative stress activity on the tissues of kidney measured by its malondialdehyde (MDA) content with the test of thiobarbituric acid (TBA) and superoxyde dismutase (SOD) of the tissues with Nitroblue tetrazolium (NBT). Histological analysis was conducted to assess the matrix of deposit and the number of mesangial cell in glomerulus by the staining of Periodic Acids Schiff (PAS). The results showed significant differences of the decreased MDA content between the group of sesame oil with the group of Sesame oil +  $\alpha$ -tocopherol on the dose of 0.3 ml ( $p = 0.000$ ) and 0.6ml ( $p = 0.001$ ). It implied that the synergic interaction of sesame oil +  $\alpha$ -tocopherol and the tendency of SOD decrease. We assumed the potential interaction is the addition of  $\alpha$ -tocopherol on sesame oil decrease the cholesterol and LDL. Histology image of glomerular injury showed the combination of sesame oil +  $\alpha$ -tocopherol inhibit the increasing of cell number and ( $p = 0.000$ ) and mesangial matrix ( $p = 0.614$ ). It indicates the addition of  $\alpha$ -tocopherol on sesame oil has better effect than only sesame oil in inhibiting the glomerular injury by inhibit the oxidative stress in kidney tissues synergically.

**Keywords:**  $\alpha$ -tocopherol, *glomerular injury*, sesame oil, oxidative stress

\* Alamat korespondensi:

Dewi Sukmawati

Address : Program Pascasarjana, Universitas Brawijaya, Jl. Mayjen Haryono No. 169 Malang 65145

## PENDAHULUAN

Hiperkolesterol merupakan salah satu faktor resiko pada penyakit ginjal kronis selain diabetes dan hipertensi. Studi Kohort prospektif di Boston pada tahun 1982–1996 terhadap 4.483 orang laki-laki sehat menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara parameter kolesterol dengan peningkatan kreatinin dan berkurangnya kecepatan filtrasi glomerulus (GFR). Pasien yang mempunyai kadar *high density lipoprotein* (HDL) rendah ( $<40 \text{ mg.dl}^{-1}$ ), kadar kolesterol non-HDL yang meningkat ( $\geq 196.1 \text{ mg.dl}^{-1}$ ) dan peningkatan rasio kolesterol/HDL ( $\geq 6.8$ ) mempunyai resiko 2 kali lipat untuk terjadinya *renal insufficiency* [1].

Data rekam medis dari Rumah Sakit Dr. Kariadi Jawa Tengah tahun 1995-1998 menunjukkan bahwa penyakit gagal ginjal kronis menduduki tempat ke-2 (16.6%) setelah glomerulonephritis kronis (46.6%). Sedangkan di Amerika, prevalensi *End-Stage Renal Disease* (ESRD) meningkat 2 kali lipat dalam 10 tahun terakhir [1]. Insiden pasien baru dengan ESRD di Amerika tahun 1998 adalah 85.520. Hal ini menunjukkan rata-rata insiden sebesar 308 kasus per satu juta populasi [2].

Berbagai bentuk penyakit renal yang berkembang menjadi *renal failure* ditandai oleh proliferasi sel mesangial dan akumulasi matriks mesangial yang nyata, sebagai gambaran dari glomerulosklerosis dan *nephropathy* [3]. Mekanisme yang mendasari progresifitas penyakit renal masih belum jelas. Salah satu faktor yang diduga berperan penting dalam patogenesis penyakit renal kronis adalah stres oksidatif [4]. Penelitian terhadap 37 pasien dengan gagal ginjal kronis (*Chronic Renal Failure*) menunjukkan bahwa *lag time* fraksi lipoprotein (sebagai antioksidan marker) untuk teroksidasi adalah lebih lama pada kelompok kontrol pasien sehat dibanding pada pasien dengan insufisiensi renal. Kadar *diene conjugates* dan LOOH (sebagai marker lipid peroksidasi) juga lebih tinggi secara bermakna pada pasien dengan insufisiensi renal [5].

Penelitian pada hewan coba mendukung adanya hubungan sebab-akibat antara kadar lipid dan terjadinya *glomerular injury* yang mengarah pada terjadinya glomerulosklerosis. Bukti tersebut menunjukkan bahwa stres oksidatif merupakan faktor patogenetik untuk terjadinya *nephropathy* yang diinduksi oleh lipid (*lipid-induced nephropathy*). Penelitian pada tikus dengan *uninephrectomy* yang diberi diet tinggi lemak (40%), kolesterol (5%) dan asam kolat

(0.35%) secara signifikan meningkatkan kapasitas pembentukan radikal bebas yang disertai dengan meningkatnya aktivitas *xanthine oxidoreductase* (XO) dalam glomerulus secara bermakna. Seiring dengan hal tersebut, juga terjadi peningkatan bermakna terhadap jumlah monosit/makroflag glomerular, densitas sel dan matriks mesangial [3].

Hiperkolesterolemia diduga merupakan faktor resiko yang dapat berdiri sendiri dan memperparah *nephropathy* yang terjadi dengan menyebabkan *glomerular injury* melalui produksi kolagen proteoglikan, fibronektin dan *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF). Studi pada model penyakit renal menunjukkan adanya hubungan antara kadar kolesterol dalam sirkulasi dengan *glomerular injury*, berupa glomerulosklerosis, ekspansi mesangial dan hialinosis. Hiperkolesterolemia juga dapat menyebabkan perubahan hemodinamik, berupa meningkatnya tekanan hidraulik kapiler glomerular, vasokonstriksi renal; baik arteriol aferen dan eferen serta meningkatnya resistensi vaskuler [6].

Hingga saat ini belum terdapat terapi spesifik untuk sebagian besar *nephropathy* kronik yang berkembang menjadi ESRD, maka tindakan pencegahan berperan penting untuk mengatasi penyakit ini. Identifikasi faktor resiko yang dapat dimodifikasi, yang mengawali terjadinya disfungsi renal merupakan langkah awal yang diperlukan untuk menegakkan strategi pencegahan dan alternatif pemikiran pengobatan terbaru [1].

Berdasarkan hal tersebut, *National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III* (NCEP- ATP III) Mei 2001, menekankan pentingnya terapi nonfarmakologi pada penderita hiperkolesterolemia. Perubahan gaya hidup merupakan salah satu terapi yang dianjurkan, termasuk disini adalah diet. Konsumsi lemak yang dianjurkan adalah dengan mengganti asam lemak jenuh (*saturated*) dengan asam lemak tak jenuh, baik yang *monounsaturated* maupun *polyunsaturated* yang terutama terkandung dalam minyak tanaman [7].

Minyak wijen (*Sesame oil*) merupakan salah satu sumber asam lemak tak jenuh, 85 % asam lemaknya berupa asam lemak tak jenuh, yang bersifat lebih stabil dengan adanya antioksidan alami berupa sesamin [8]. Penelitian ahli gizi menunjukkan bahwa minyak wijen kaya akan asam lemak esensial yaitu linolenat (0.67%), linoleat (49.5%) dan oleat (37.5%) [9].

Selain itu minyak wijen juga mengandung sejumlah lignan yang mempunyai efek

hipolipidemik dan juga antioksidan. Sesamin, salah satu lignan dalam minyak wijen mempunyai efek hipolipidemik dengan menurunkan secara bermakna kadar kolesterol dalam serum dan hepar pada tikus yang diberi diet kolesterol 0.5% selama 4 minggu, melalui hambatan absorpsi kolesterol di intestinal dan menurunkan aktivitas *HMG-CoA reductase*, enzim yang membatasi sintesis kolesterol dalam mikrosom hepar [10]. Sedangkan efek antioksidan ditunjukkan oleh lignan sesamolin, yang secara bermakna menurunkan lipid peroksidasi di ginjal dan hepar [11].

Adanya ikatan rangkap dalam asam lemak tak jenuh (PUFA) menyebabkan strukturnya mudah teroksidasi. Sehingga bila dikonsumsi dalam jumlah banyak dapat meningkatkan proses oksidasinya. Oleh karena itu harus disertai dengan konsumsi antioksidan, yang dapat mencegah terjadinya oksidasi ikatan rangkap. Penggunaan  $\alpha$ -tocopherol sebagai antioksidan telah diketahui luas. *Alpha-tocopherol* merupakan antioksidan kuat yang larut dalam lemak dan efektif sebagai antioksidan pemutus rantai yang melindungi lipid *unsaturated* dari kerusakan radikal bebas [12]. Pemberian  $\alpha$ -tocopherol 200 mg/hari selama 6 dan 12 minggu pada tikus diabetes yang diinduksi dengan *streptozotocin* (STZ) secara signifikan menurunkan konsentrasi *malondial-dehyde* (MDA) ginjal serta menurunkan ketebalan *glomerular basement membrane*

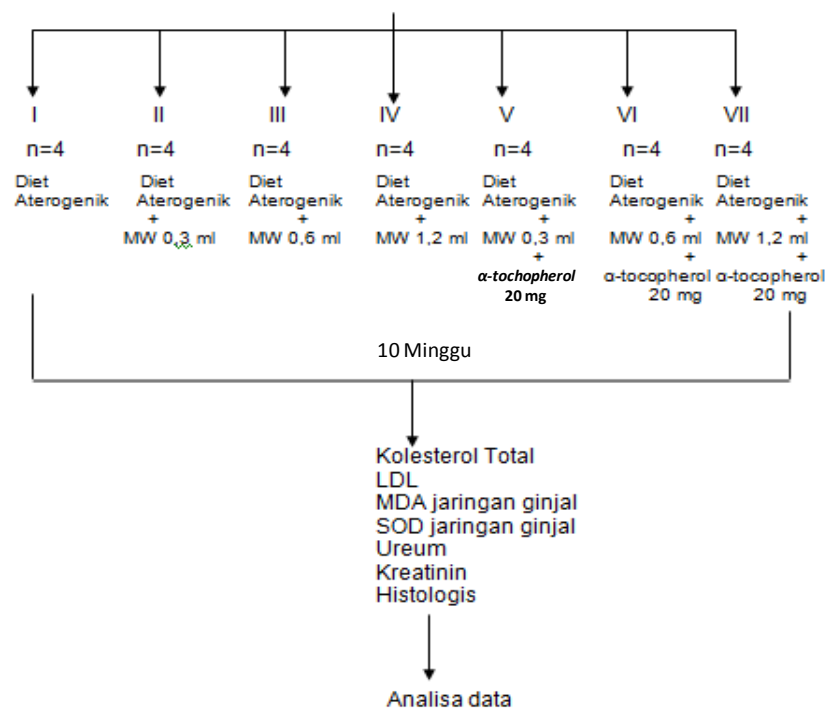
(GBM) dibanding kontrol [13]. Sedangkan studi *Secondary Prevention with Antioxidant of Cardiovascular disease in End-stage renal disease* [14], terhadap 196 pasien hemodialisis dengan penyakit kardiovaskuler yang mendapat  $\alpha$ -tocopherol 800 IU.hari<sup>-1</sup> melaporkan adanya penurunan kejadian penyakit kardiovaskuler secara signifikan sebesar 54% dibanding kontrol [15].

Hingga saat ini masih belum diketahui apakah dengan penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen dapat memberikan efek yang lebih baik daripada minyak wijen sendiri dalam menghambat *glomerular injury* melalui penghambatan stres oksidatif akibat hiperkolesterolemia.

Untuk itu perlu dilakukan penelitian eksperimental untuk mengetahui efek penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen, dibanding minyak wijen sendiri dalam menghambat *glomerular injury* melalui penghambatan stres oksidatif.

#### METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan *Rattus novergicus* strain Wistar jantan (200 g) yang dibagi menjadi tujuh kelompok masing-masing 4 ekor, kelompok hiperkolesterol (HK), kelompok ke-2, ke-3 dan ke-4 adalah kelompok HK + MW (dosis masing-masing 0,3; 0,6, dan 1,2 ml), sedangkan kelompok ke-5, ke-6 dan ke-7 adalah kelompok HK + MW (dosis masing – masing 0.3, 0.6 dan 1.2 ml) +  $\alpha$ -tochopherol 20 mg). Alur penelitian dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Alur Penelitian

### Pembuatan Tikus Hiperlipidemia

Dari studi terdahulu diketahui bahwa kebutuhan makanan tikus dewasa tiap ekor perhari adalah 40 g, yang terdiri dari *comfeed PAR-S*, terigu dan air (pakan standar). Untuk perlakuan hiperkolesterol, digunakan diet atherogenik dari laboratorium biomedik yang sudah terbukti membuat model tikus atherosklerosis dalam waktu 8–10 minggu. Komposisi diet atherogenik merujuk pada studi Ali dan Muliarta [16].

### Pengukuran Kadar Kolesterol Serum

Pengukuran kadar kolesterol total dilakukan pada akhir minggu ke-10. Reagen yang digunakan adalah “*Dia Sys Cholesterol FS*” yang dibaca dengan menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 500 dλ.

### Prosedur Pengukuran LDL

LDL diukur secara tidak langsung dengan menggunakan rumus :

$$\text{LDL} = \text{Kolesterol} - (\text{Trigliserida}/5) - \text{HDL} = \text{mg.dl}^{-1}$$

Catatan: Data trigliserida dan HDL menggunakan data bersama dari kelompok penelitian minyak wijen, digunakan oleh peneliti lain

### Pemeriksaan Kadar Protein Ginjal

Sampel jaringan ginjal 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 (di laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya).

### Pemeriksaan SOD Jaringan Ginjal

Sampel jaringan direaksikan dengan *xantin* dan *xantin oxidase* serta KCN 10mM. Kemudian ditambahkan NBT sebagai pewarna, dan dibaca menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm (di laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya).

### Pemeriksaan Kadar MDA Jaringan Ginjal

Digunakan dua sampel jaringan ginjal untuk tes dan kontrol. Masing-masing direaksikan dengan TCA dan HCl untuk menghentikan reaksi yang berlangsung dan kemudian diwarnai menggunakan NaTHIO. Dibaca menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 531 nm (Laboratorium Biomedik, Universitas Brawijaya).

### Pemeriksaan Histologi Ginjal

Untuk pemeriksaan histologi ginjal dilakukan dengan proses parafin blok serta menggunakan pewarnaan PAS (*Periodic Schiff Acid*) untuk mewarnai komponen polisakarida dan oligosakarida yang dimiliki sel, dalam hal ini terdapat pada matriks mesangial dan membran dari kapsula Bowman, serta mengamati sel mesangial [17].

### Metode pengumpulan data histologis

Dilakukan pengamatan dan penghitungan terhadap persentase matriks mesangial dan jumlah sel mesangial dengan menggunakan mikroskop binokuler. Pada tiap slide diamati/ditentukan *counting area* glomerulus pada daerah korteks ginjal secara acak sebanyak 4 area.

#### a. Persentase matriks mesangial

Dengan perbesaran 400x dihitung luas area matriks yang mengisi square mikrometer (1 kotak = 1 x1 um), kemudian dihitung luas area glomerulus beserta matriksnya. Persentase matriks di peroleh dengan membagi luas area matriks dibagi luas area glomerulus dikalikan dengan 100.

#### b. Jumlah sel mesangial

Dengan perbesaran 1000x dan munyak emersi dihitung jumlah sel mesangial, yang mempunyai ciri – ciri: sel terbenam dalam matriks mesangial, terletak diantara kapiler dan inti hiperkromatik.

### Pemeriksaan kadar ureum

Bahan yang digunakan adalah *Urea kit* (Unimate 5 Art. 07 3685 6) dan serum tikus. Bahan dicampur (Tabel 1) kemudian diinkubasi 15 menit dan dibaca pada photometer dengan panjang gelombang 365 nm.

Tabel 1. *Solution* untuk pengukuran kadar urenum

Bahan	Tes (T)	Kalibrator (K)
Working Reagen	1000 ul	1000 ul
Sampel	10 ul	-
Standar/ kalibrator	-	10 ul

$$\text{Penghitungan hasil} = \frac{\text{Absorbansi T} \times \text{konsentrasi standar}}{\text{Absorbansi K}}$$

(Lab. Patologi Klinik Rumah Sakit Saiful Anwar)

### Pemeriksaan kadar kreatinin

Bahan yang digunakan adalah Reagen kreatinin (Unimate 7 Art. 07 3667 8 ) dan serum tikus. Bahan dicampur (Tabel 2) kemudian diinkubasi 15 menit dan dibaca pada photomteer

dengan panjang gelombang 365 nm. Bahan dicampur kemudian diinkubasi 15 menit dan dibaca pada photometer dengan panjang gelombang 500 nm.

Penghitungan hasil =  $\frac{\text{Absorbansi T}}{\text{Absorbansi K}} \times \text{konsentrasi standar}$   
(Lab. Patologi Klinik Rumah Sakit Saiful Anwar)

**Tabel 2.** Solution untuk pengukuran kadar kretinin

Bahan	Tes (T)	Kalibrator (K)
Working Reagen	1000 ul	1000 ul
Sampel	100 ul	-
Standar/ kalibrator	-	100 ul

### Analisis statistik

Untuk mengetahui apakah penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen berbeda secara bermakna dengan minyak wijen sendiri maka data dari pengukuran kadar kolesterol total, LDL, MDA, SOD, Ureum, Kreatinin, % matriks mesangial dan jumlah sel mesangial dianalisa serentak dengan MANOVA dan bila ada perbedaan bermakna ( $p < 0.05$ ) dilanjutkan dengan Post Hoc Tukey HSD untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda [18]. Selanjutnya dilakukan regresi untuk mengetahui hubungan kausal atau fungsional [19] efek penambahan  $\alpha$ -tocopherol dibanding minyak wijen sendiri pada tiap dosis. Analisa korelasi dilakukan untuk mengetahui ada-tidaknya hubungan kausal antara parameter stres oksidatif dengan glomerular injury dan seberapa besar hubungan tersebut [18]. Untuk mengetahui perubahan histopatologi pada ginjal maka mula-mula di baca secara deskriptif kemudian di coba dikuantifikasi.

## HASIL

### Hasil pengukuran kadar kolesterol total

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan adanya penurunan kadar serum kolesterol total, pada semua kelompok minyak wijen (MW), dengan atau tanpa penambahan  $\alpha$ -tocopherol. Kelompok MW pada semua dosis (0.3, 0.6 dan 1.2 ml) menunjukkan efek menurunkan kadar kolesterol total. Demikian pula dengan kelompok MW +  $\alpha$ -tocopherol pada semua dosis (0.3, 0.6 dan 1.2 ml) mempunyai efek menurunkan kadar kolesterol (Tabel 3).

Hasil analisis regresi menunjukkan adanya dua persamaan garis linear yang berbeda, antara kelompok minyak wijen saja dengan yang ditambah  $\alpha$ -tocopherol. Kelompok MW tampak berbentuk linear dan menunjukkan

adanya hubungan dosis – efek, yang berarti bahwa penambahan dosis minyak wijen berpengaruh terhadap penurunan kadar kolesterol total. Dosis 0.3 ml menunjukkan penurunan kadar kolesterol yang lebih bermakna daripada dosis 0.6 dan 1.2 ml. Pada dosis 0.6 dan 1.2 ml memberikan efek penurunan kadar kolesterol yang sama. Sedangkan untuk kelompok MW +  $\alpha$ -tocopherol, menunjukkan bentuk linear dan juga terdapat hubungan dosis–efek. Dosis 1.2 ml menurunkan kadar kolesterol lebih bermakna daripada dosis 0.3 dan 0.6 ml. Sedangkan pada dosis 0.3 dan 0.6 memberikan efek penurunan kolesterol yang tidak berbeda. Demikian pula tiap pasang kelompok MW dengan MW +  $\alpha$ -tocopherol pada semua dosis menunjukkan efek penurunan kolesterol yang tidak berbeda.

**Tabel 3.** Efek kombinasi minyak wijen dengan  $\alpha$ -tocopherol pada kadar kolesterol serum

MW (ml)	$\alpha$ -tocopherol (mg)	n	Rerata kadar Kolesterol serum (mg.dl <sup>-1</sup> )	Analisis
0.3	-	4	131.025 ± 8.68	*Manova (p = 0.012)
0.3	20	4	120.903 ± 8.52	
0.6	-	4	109.092 ± 1.97	
0.6	20	4	95.565 ± 5.21	
1.2	-	4	93.845 ± 4.37	
1.2	20	4	92.917 ± 5.80	

\*Uji statistika Manova terhadap rerata kadar kolesterol serum didapatkan perbedaan yang signifikan antara kelompok minyak wijen (MW) dan kelompok kombinasi minyak wijen dengan  $\alpha$ -tocopherol ( $p = 0.012$ ).

### Hasil pengukuran kadar LDL serum

Data hasil pengukuran kadar LDL serum (Tabel 4) menunjukkan bahwa terjadi penurunan kadar serum LDL, pada semua kelompok minyak wijen, dengan atau tanpa penambahan  $\alpha$ -tocopherol. Kelompok MW pada semua dosis (0.3, 0.6 dan 1.2 ml) menunjukkan efek menurunkan kadar LDL. Demikian pula dengan kelompok MW +  $\alpha$ -tocopherol pada semua dosis (0.3, 0.6 dan 1.2 ml) mempunyai efek menurunkan kadar LDL. Analisa lanjutan dengan Tukey HSD menunjukkan bahwa kadar LDL yang dibandingkan antar pasangan kelompok MW dengan MW +  $\alpha$ -tocopherol pada dosis yang sama, menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna. Selanjutnya dilakukan analisa regresi untuk mengetahui efek penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen dibandingkan dengan minyak wijen sendiri.



**Tabel 4.** Efek Kombinasi Minyak Wijen dengan  $\alpha$ -Tocopherol pada Kadar LDL Serum

MW (ml)	$\alpha$ -tocopherol (mg)	n	Rerata kadar LDL serum (mg.dl <sup>-1</sup> )	Analisis
0.3	-	4	31.82 ± 1.03	*Manova (p=0.045)
0.3	20	4	19.65 ± 1.07	
0.6	-	4	18.28 ± 0.58	
0.6	20	4	15.15 ± 0.76	
1.2	-	4	16.50 ± 1.11	
1.2	20	4	14.57 ± 0.54	

\*Uji statistika Manova terhadap rerata kadar LDL serum, didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok minyak wijen (MW) dan kelompok kombi-nasi minyak wijen dengan  $\alpha$ -tocopherol (p = 0.045)

Hasil analisis regresi menunjukkan adanya dua persamaan garis yang berbeda, antara kelompok minyak wijen saja dengan yang ditambah  $\alpha$ -tocopherol. Kelompok MW menunjukkan adanya hubungan dosis – efek, yang berarti bahwa penambahan dosis minyak wijen berpengaruh terhadap penurunan kadar LDL. Dosis 0.3 ml menunjukkan penurunan kadar LDL yang lebih bermakna daripada dosis 0.6 dan 1.2 ml. Pemberian dosis 0.6 dan 1.2 ml akan memberikan efek penurunan kadar LDL yang tidak berbeda. Sedangkan pada perlakuan MW +  $\alpha$ -tocopherol, menunjukkan tidak adanya garis linear, hal ini menunjukkan terdapat hubungan dosis – efek tetapi efek tiap dosis belum tentu diikuti dengan besarnya penurunan kadar LDL yang sama. Dosis 1.2 ml menurunkan kadar kolesterol lebih bermakna daripada dosis 0.3 dan 0.6 ml. Pada dosis 0.3 dan 0.6 ml memberikan efek penurunan yang tidak berbeda. Demikian pula terhadap tiap pasang kelompok MW dengan MW +  $\alpha$ -tocopherol pada tiap dosis menunjukkan efek penurunan LDL yang tidak berbeda.

**Hasil pengukuran kadar MDA jaringan ginjal**

Data pada Tabel 5 menunjukkan bahwa terjadi penurunan kadar MDA, pada semua kelompok minyak wijen, dengan atau tanpa penambahan  $\alpha$ -tocopherol. Kelompok MW pada semua dosis (0.3, 0.6 dan 1.2 ml) menunjukkan efek menu-runkan MDA. Demikian pula dengan kelompok MW +  $\alpha$ -tocopherol pada semua dosis (0.3, 0.6 dan 1.2 ml) mempunyai efek menu-runkan kadar MDA. Analisis lanjutan dengan Tukey HSD menunjukkan bahwa kadar MDA yang diban-dingkan antar pasangan kelompok MW dengan MW +  $\alpha$ -tocopherol pada dosis yang sama, menunjukkan perbedaan yang bermakna

pada pasangan kelompok MW dengan MW +  $\alpha$ -tocopherol pada dosis 0.3 ml (p =0.000) dan dosis 0.6 ml (p = 0.001). Selanjutnya dilakukan analisa regresi untuk mengetahui efek penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen dibandingkan dengan minyak wijen sendiri.

**Tabel 5.** Efek Kombinasi Minyak Wijen dengan  $\alpha$ -Tocopherol pada Kadar MDA jaringan ginjal

MW (ml)	$\alpha$ -tocopherol (mg)	n	Rerata kadar MDA (nmol.gr <sup>-1</sup> jaringan)	Analisis
0.3	-	4	0.822 ± 0.506	*Manova (p = 0.000) **Tukey HSD
0.3	20	4	0.558 ± 0.413	
0.6	-	4	0.654 ± 0.162	
0.6	20	4	0.432 ± 0.209	
1.2	-	4	0.506 ± 0.230	
1.2	20	4	0.366 ± 0.197	

\*Uji statistika Manova terhadap rerata kadar MDA menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok MW dan kelompok kombinasi MW dengan  $\alpha$ -tocopherol (p = 0.000)

\*\*Uji statistik lanjutan Tukey HSD menunjukkan terdapat perbedaan bermakna kadar MDA antara pasangan kelompok MW dengan MW +  $\alpha$ -tocopherol pada dosis 0.3 ml (p=0.000) dan dosis 0.6 ml (p=0.001)

Hasil analisis regresi menunjukkan adanya dua persamaan garis yang berbeda, antara kelompok MW dengan MW +  $\alpha$ -tocopherol. Kelompok MW tampak menunjukkan adanya hubungan dosis – efek, yang berarti bahwa penambahan dosis minyak wijen berpengaruh terhadap penurunan kadar MDA. Pada masing - masing dosis (0.3, 0.6 dan 1.2 ml) kelompok MW menunjukkan penurunan kadar MDA yang berbeda. Sedangkan dari garis MW +  $\alpha$ -tocopherol, juga menunjukkan terdapat hubungan dosis – efek. Seperti halnya pada kelompok MW, kelompok MW +  $\alpha$ -tocopherol menunjukkan bahwa pada masing – masing dosis terjadi penurunan kadar MDA yang berbeda. Bila dibandingkan penurunan kadar MDA antara pasangan kelompok MW dan MW +  $\alpha$ -tocopherol menunjukkan perbedaan bermakna pada dosis 0.3 dan 0.6 ml.

**Hasil pengukuran kadar SOD jaringan ginjal**

Data pengukuran kadar SOD jaringan ginjal menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar SOD, pada semua kelompok minyak wijen, dengan atau tanpa penambahan  $\alpha$ -tocopherol (Tabel 6). Kelompok MW pada semua dosis (0.3, 0.6 dan 1.2 ml) menunjukkan efek meningkatkan SOD. Demikian pula dengan kelompok MW +  $\alpha$ -tocopherol pada semua dosis (0.3, 0.6 dan 1.2 ml) mempunyai efek meningkatkan kadar SOD.

Analisa lanjutan dengan Tukey HSD menunjukkan bahwa kadar SOD yang dibandingkan antar pasangan kelompok MW dengan MW +  $\alpha$ -tocopherol pada dosis yang sama, menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna. Selanjutnya dilakukan analisa regresi untuk mengetahui efek penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen dibandingkan dengan minyak wijen sendiri.

**Tabel 6.** Efek Kombinasi Minyak Wijen dengan  $\alpha$ -Tocopherol pada Kadar SOD

MW (ml)	$\alpha$ -tocopherol (mg)	n	Rerata kadar SOD serum (U.gr <sup>-1</sup> jaringan)	Analisis
0.3	-	4	209.46±15.20	*Manova (p = 0.000)
0.3	20	4	229.08±11.84	
0.6	-	4	241.77±16.07	
0.6	20	4	267.82±17.82	
1.2	-	4	284.45±16.32	
1.2	20	4	340.52±17.38	

\*Uji statistika Manova terhadap rerata kadar SOD, menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok minyak wijen dan kelompok kombinasi minyak wijen dengan  $\alpha$ -tocopherol (p = 0.000).

Hasil analisis regresi menunjukkan adanya dua persamaan garis yang berbeda, antara kelompok minyak wijen saja dengan yang ditambah  $\alpha$ -tocopherol. Kelompok MW tampak berbentuk linear dan menunjukkan adanya hubungan dosis – efek, yang berarti bahwa penambahan dosis minyak wijen berpengaruh terhadap peningkatan kadar SOD. Berdasarkan data tersebut, kelompok MW menunjukkan bahwa dosis 0.3 ml dan 0.6 ml memberikan efek peningkatan kadar SOD yang tidak berbeda, demikian pula dengan dosis 0.6 dan 1.2 ml; hal ini berarti bahwa pada dosis 0.6 memberikan efek peningkatan kadar SOD yang paling nyata. Sedangkan kelompok MW +  $\alpha$ -tocopherol, menunjukkan bentuk linear dan juga terdapat hubungan dosis – efek. Pada kelompok ini juga menunjukkan bahwa pada dosis 0.3 dan 0.6

memberikan efek peningkatan SOD yang tidak berbeda, sedangkan pada dosis 1.2 efek peningkatan kadar SOD nya paling bermakna. Analisa Tukey HSD terhadap tiap pasang dosis MW dengan MW +  $\alpha$ -tocopherol menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna.

#### Hasil pengamatan histologis glomerulus

Data pengamatan luas matriks mesangial (Tabel 7) menunjukkan terjadi penurunan % matriks baik pada minyak wijen sendiri maupun dengan penambahan  $\alpha$ -tocopherol. Dari analisa statistik didapatkan perbedaan tidak bermakna pada % luas matriks mesangial antara kelompok MW dengan kelompok MW +  $\alpha$ -tocopherol (p = 0.614). Hasil penghitungan % matriks selanjutnya dilakukan *grading* terhadap *glomerular injury* berdasarkan % luasnya matriks. Terdapat penurunan *grading glomerular injury*, dimana grade yang lebih rendah didapatkan pada kelompok kombinasi MW dan  $\alpha$ -tocopherol pada dosis 0,6 ml dan 1,2 ml.

Hasil penghitungan terhadap rerata jumlah sel mesangial menunjukkan adanya penurunan jumlah sel mesangial pada semua kelompok perlakuan (Tabel 8) . Kelompok MW pada semua dosis menunjukkan efek menurunkan jumlah sel mesangial. Demikian pula pada kelompok MW +  $\alpha$ -tocopherol. Analisa lanjutan dengan Tukey HSD menunjukkan bahwa jumlah sel mesangial yang dibandingkan antar pasangan kelompok MW dengan MW +  $\alpha$ -tocopherol pada dosis yang sama, menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna.

Hasil analisis regresi menunjukkan adanya dua persamaan garis linear yang berbeda, antara kelompok MW saja dengan yang ditambah  $\alpha$ -tocopherol. Garis kelompok MW tampak berbentuk linear dan menunjukkan adanya hubungan dosis-efek. Hal ini berarti bahwa penambahan dosis minyak wijen berpengaruh terhadap penurunan jumlah sel mesangial.

**Tabel 7.** Efek Kombinasi Minyak Wijen (MW) dengan  $\alpha$ -Tocopherol terhadap Presentase Luas Matriks Mesangial

MW (ml)	$\alpha$ -tocopherol (mg)	n	Rerata Presentase Luas Matriks (%)	Grading	Analisis
Hiperkolesterol		4	53.95 ± 2.09	3	
0.3	-	4	52.91 ± 2.09	3	*Manova (p = .614)
0.3	20	4	50.38 ± 3.48	3	
0.6	-	4	50.98 ± 3.21	3	
0.6	20	4	49.15 ± 2.10	3	
1.2	-	4	49.90 ± 2.97	3	
1.2	20	4	46.16 ± 1.19	3	

\*Uji statistika manova terhadap rerata persentase luas matriks mesangial menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna pada antara kelompok minyak wijen (MW) dan kelompok kombinasi minyak wijen dengan  $\alpha$ -tocopherol pada berbagai dosis (p = 0.614).

**Tabel 8.** Efek Kombinasi Minyak Wijen dengan  $\alpha$ -Tocopherol terhadap Jumlah Sel Mesangial

MW (ml)	$\alpha$ -tocopherol (mg)	n	Rerata Jumlah Sel Mesangial	Analisis
Hiperkolesterol		4	27.75 $\pm$ 1.2	
0.3	-	4	22.12 $\pm$ 0.85	*Manova (p = 0.000)
0.3	20	4	20.31 $\pm$ 0.47	
0.6	-	4	20.94 $\pm$ 0.33	
0.6	20	4	18.88 $\pm$ 0.66	
1.2	-	4	17.62 $\pm$ 0.46	
1.2	20	4	16.31 $\pm$ 0.40	

\*Uji statistika manova terhadap rerata jumlah sel mesangial, menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok MW dan kelompok kombinasi MW dengan  $\alpha$ -tocopherol (p < 0.05).

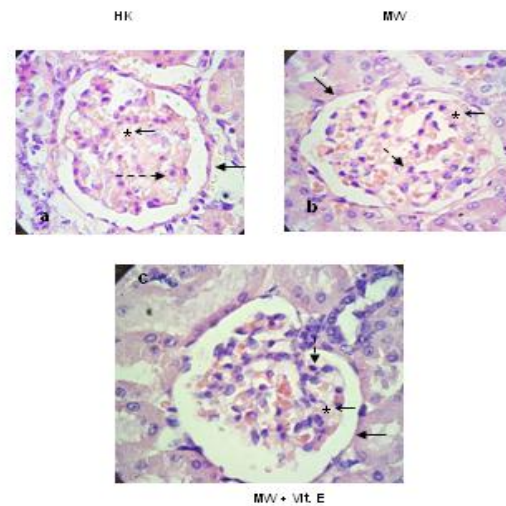
Hal ini berarti bahwa penambahan dosis minyak wijen berpengaruh terhadap penurunan jumlah sel mesangial. Pada kelompok MW menunjukkan bahwa pada dosis 0.3 dan 0.6 ml menunjukkan efek penurunan jumlah sel mesangial yang tidak berbeda. Pada dosis 1.2 ml memberikan efek penurunan jumlah sel yang bermakna. Sedangkan dari garis MW +  $\alpha$ -tocopherol menunjukkan bentuk linear dan juga terdapat hubungan dosis – efek. Seperti halnya kelompok MW, pada kelompok MW +  $\alpha$ -tocopherol, pada dosis 0.3 dan 0.6 ml menunjukkan efek penurunan jumlah sel mesangial yang tidak berbeda. Sedangkan pada dosis 1.2 ml menunjukkan efek penurunan yang bermakna. Analisa terhadap pasangan kelompok MW dengan MW +  $\alpha$ -tocopherol pada dosis yang sama menunjukkan perbedaan tidak bermakna.

Hasil pengamatan dan analisis sediaan histologis glomerulus menunjukkan bahwa jumlah sel mesangial dan luas matriks adalah lebih banyak didapatkan pada kelompok hiperkolesterol daripada kelompok minyak wijen. Pada kelompok hiperkolesterol (Gambar 2) tampak adanya peningkatan densitas dalam glomerulus (adanya penebalan pada lapisan luar kapsul pembungkus glomerulus (*parietal layer of Bowman's capsule*), meningkatnya jumlah sel intraglomerulus disertai peningkatan matriks ekstraseluler. Juga didapatkan kapiler dalam glomerulus tidak tampak terbuka.

Sedangkan pada kelompok perlakuan minyak wijen baik sendiri menunjukkan adanya perbaikan struktur glomerulus dibanding kelompok hiperkolesterol, ditandai kapsula Bowman yang lebih tipis, berkurangnya jumlah sel intraglomerulus dan matriks ekstraseluler, serta tampak adanya kapiler yang terbuka.

Demikian pula pada kelompok kombinasi dengan  $\alpha$ -tocopherol (Gambar 2) tampak lebih

baik lagi, ditandai dengan lapisan kapsul luar yang tidak menebal, jumlah sel intraglomerular dan matriks ekstraseluler sedikit, sehingga tampak kapiler yang terbuka dan terisi sel – sel darah. Penambahan  $\alpha$ -tocopherol menunjukkan gambaran histologis glomerulus yang lebih baik dibanding kelompok hiperkolesterol dan minyak wijen sendiri.



**Gambar 2.** Perubahan histopatologi pada glomerulus ginjal dengan pengecatan *Periodic Acids Schiff* pembesaran 1000x

- \* : matriks mesangial
- : penebalan membran luar glomerulus (kapsula Bowman)
- ➡ : sel mesangial

**Hasil pengukuran kadar ureum dan kreatinin**

Tabel 9 dan 10 menunjukkan bahwa kadar ureum dan kreatinin tidak banyak berubah dengan pemberian minyak wijen saja maupun dengan penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada keadaan hiperkolesterol. Hal ini ditunjukkan dengan hasil analisa manova yang tidak signifikan.

**Tabel 9.** Efek Kombinasi Minyak Wijen dengan  $\alpha$ -Tocopherol pada Kadar Ureum

MW (ml)	$\alpha$ -tocopherol (mg)	n	Rerata Kadar Ureum (mg.dl <sup>-1</sup> )	Analisis
Hiperkolesterol		4	29.80 $\pm$ 2.03	
0.3	-	4	28.40 $\pm$ 0.89	*Manova (p = 0.716)
0.3	20	4	28.75 $\pm$ 2.23	
0.6	-	4	27.65 $\pm$ 1.59	
0.6	20	4	27.53 $\pm$ 1.18	
1.2	-	4	26.15 $\pm$ 1.49	
1.2	20	4	30.32 $\pm$ 0.37	

\*Uji statistika manova terhadap rerata kadar ureum, terdapat perbedaan yang tidak bermakna antara kelompok MW dan kelompok kombinasi MW dengan  $\alpha$ -tocopherol (p = 0.716)

**Tabel 10.** Efek Kombinasi Minyak Wijen dengan  $\alpha$ -Tocopherol pada Kadar Kreatinin

MW (ml)	$\alpha$ -tocopherol (mg)	n	Rerata Kadar Kreatinin (mg.dl <sup>-1</sup> )	Analisis
0.3	-	4	0.698 ± 2.03	
0.3	20	4	0.692 ± 0.005	
0.6	-	4	0.657 ± 0.049	*Manova (p=0.711)
0.6	20	4	0.657 ± 0.053	
1.2	-	4	0.622 ± 0.060	
1.2	20	4	0.607 ± 0.070	
Hiperkolesterol		4	0.788 ± 00.40	

\*Uji statistika menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna antara kelompok MW dan kelompok kombinasi MW dengan  $\alpha$ -tocopherol pada berbagai dosis (p = 0,711).

**Keterkaitan stres oksidatif dan glomerular injury**

Dari hasil analisa korelasi antara parameter stres oksidatif dengan parameter *glomerular injury* pada kelompok MW dan kelompok MW +  $\alpha$ -tocopherol menunjukkan bahwa pada kelompok MW terdapat korelasi bermakna antara MDA dengan SOD (p = 0.021); MDA dengan jumlah sel (p = 0.002) dan SOD dengan jumlah sel (p = 0.031). Sedangkan pada kelompok MW +  $\alpha$ -tocopherol terdapat korelasi bermakna antara kadar MDA dengan SOD (p = 0.040) dan kadar MDA dengan jumlah sel mesangial (p = 0.015) .

**PEMBAHASAN**

Berdasarkan penelitian ini diperoleh hasil bahwa minyak wijen dapat menurunkan kadar kolesterol total dan LDL serum pada pada semua kelompok. Mekanisme yang mendasari efek hipolipidemi minyak wijen diduga adalah karena kandungan PUFA nya yang tinggi, yaitu 85 % dari asam lemaknya [8]. Hipotesis terbaru menyatakan bahwa PUFA mampu mengendalikan ekspresi gen oksidatif melalui aktivasi faktor transkripsi *peroxisome proliferator-activated receptor-  $\alpha$*  (PPAR-  $\alpha$ ), yang merupakan suatu *lipid-activated transcription factor*, berperan sebagai ligan dan meningkatkan interaksi PPAR- $\alpha$  dengan DNA (*deoxyribo nukleat acid*). PUFA juga menurunkan produksi enzim *malonyl-CoA* di hepar yang berperan dalam menghambat enzim *carnitine palmitoyl-transfe rase* yang berfungsi memperantarai masuknya asam lemak ke dalam mitokondria dan peroksisom, untuk mengalami proses oksidasi.

Minyak wijen juga mengandung ligan sesamin. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa sesamin mempunyai efek hipolipidemik. Sesamin merupakan suatu ligan PPAR aktif dan merupakan induser kuat terhadap oksidasi asam lemak. Sesamin juga menurunkan ekspresi gen

enzim—enzim lipogenik hepar dengan menurunkan SREBP-1. Perubahan kecepatan sintesis dan oksidasi asam lemak dalam hepar dapat mempengaruhi konsentrasi lipid serum. Hal ini selanjutnya berpengaruh terhadap avabilitas asam lemak untuk sintesis triasilgliserol, yang pada akhirnya akan mempengaruhi produksi VLDL oleh hepar. Berkurangnya produksi lipoprotein oleh hepar mendasari efek hipolipidemik dari sesamin [20].

Hasil penelitian ini menunjukkan penurunan kadar serum kolesterol total dan LDL yang paling baik adalah pada dosis minyak wijen 1.2 ml (24% kalori) baik dengan tambahan  $\alpha$ -tocopherol maupun tidak. Sehingga dapat diasumsikan bahwa ini merupakan dosis minyak wijen yang paling baik dalam menurunkan kadar kolesterol dan LDL. Pada tikus dengan diet kolesterol dan asam kolat yang diberi minyak wijen 24% juga menunjukkan penurunan signifikan kadar serum kolesterol total dan LDL [21].

Dari analisis data didapatkan hasil bahwa pada semua kelompok dapat menurunkan kadar kolesterol total dan LDL, baik yang diberi tambahan  $\alpha$ -tocopherol maupun tidak. Hal ini menunjukkan bahwa minyak wijen mempunyai efek hipolipidemik, penambahan  $\alpha$ -tocopherol menunjukkan kemampuan lebih menurunkan kadar kolesterol dan LDL, meskipun tidak bermakna. Namun diduga terdapat kecenderungan adanya interaksi antara  $\alpha$ -tocopherol dengan minyak wijen secara potensiasi. Yaitu bahwa efek penurunan kadar kolesterol dan LDL cenderung meningkat dengan penambahan  $\alpha$ -tocopherol (yang tidak mempunyai efek hipolipidemik) pada minyak wijen yang diketahui mempunyai efek hipolipidemik. Hal ini berdasarkan pada analisis regresi yang menunjukkan 2 garis dengan persamaan yang berbeda dari hasil regresi, yang menggambarkan hubungan dosis—efek. Selain itu antar pasangan kelompok MW dengan MW +  $\alpha$ -tocopherol pada dosis yang sama menunjukkan bahwa penambahan  $\alpha$ -tocopherol tampak lebih mampu menurunkan kadar kolesterol, meskipun secara statistik efek masing—masing pasangan dosis tersebut tidak bermakna. Hal ini kemungkinan berhubungan dengan jumlah sampel yang sedikit serta perlunya penambahan dosis  $\alpha$ -tocopherol secara serial untuk mengetahui dosis efektifnya.

Pemberian minyak wijen mampu menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA) jaringan ginjal pada semua kelompok. Penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada dosis minyak wijen 0.3 dan 0.6

menunjukkan perbedaan yang bermakna bila dibandingkan dengan minyak wijen saja pada dosis yang sama. MDA merupakan salah satu indikator terjadinya peroksidasi lipid, akibat adanya stres oksidatif. Kemampuan minyak wijen untuk menurunkan kadar MDA adalah karena kandungan antioksidan alaminya yang berupa lignan, yaitu sesamol [8]. Sesamol merupakan antioksidan yang bekerja sebagai scavenger terhadap radikal peroksil yang terbentuk. Pemberian sesamol 1% pada tikus *Sprague-Dawley* terbukti menurunkan kadar MDA pada jaringan ginjal dan hepar secara bermakna [11].

$\alpha$ -Tocopherol diketahui sebagai antioksidan yang bekerja dengan memutus reaksi berantai dengan melakukan scavenger terhadap radikal peroksil. Dalam hal ini penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen menunjukkan efek yang sinergistik. Artinya efek minyak wijen dalam menurunkan kadar MDA diperkuat dengan penambahan  $\alpha$ -tocopherol. Kadar TBARS hepar lebih rendah pada kelompok dengan penambahan vitamin E dalam minyak ikan dibanding yang tanpa suplemen  $\alpha$ -tocopherol [22].

SOD merupakan antioksidan enzimatis yang pertama kali bekerja ketika ROS dihasilkan. Minyak wijen terbukti dapat meningkatkan kadar SOD pada semua kelompok. Penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen menunjukkan kecenderungan untuk lebih meningkatkan kadar SOD dibanding kelompok MW saja pada ketiga dosis. Hal ini kemungkinan karena dengan adanya  $\alpha$ -tocopherol maka kerja dari SOD menjadi lebih berkurang karena stres oksidatif yang terjadi sudah diatasi oleh minyak wijen dan  $\alpha$ -tocopherol yang diduga saling berinteraksi secara sinergis. Dugaan sinergistik antara  $\alpha$ -tocopherol dengan minyak wijen terhadap kadar SOD adalah berdasarkan analisis regresi yang menunjukkan bahwa terdapat dua garis linier dengan persamaan yang berbeda dan menunjukkan adanya hubungan dosis-efek. Masing-masing garis/ kelompok juga menunjukkan efek yang berbeda dalam meningkatkan kadar SOD.

Gambaran histologis menunjukkan adanya perubahan glomerulus pada kelompok hiperkolesterolemia. Perubahan ini ditandai dengan adanya penebalan pada membran luar (kapsula Bowman), akumulasi matriks mesangial serta adanya proliferasi sel mesangial. Perubahan ini mengarah pada terjadinya sklerosis glomerular. Hal ini dapat dijelaskan bahwa hiperkolesterolemia meningkatkan pembentukan ROS. Selanjutnya ROS dapat menyebabkan oksidasi

dan modifikasi LDL. Sel mesangial mengekspresikan reseptor scavenger yang terlibat dalam kecenderungan untuk melakukan ambilan (uptake) LDL teroksidasi dan termodifikasi. Paparan terhadap LDL teroksidasi ini selanjutnya akan menstimulasi sel mesangial untuk mensekresi sejumlah faktor kemotaktik dan molekul adhesi (M-CSF, ICAM-1, VCAM-1) yang akan meningkatkan pengerahan makrofag intramesangial.

Makrofag teraktivasi ini selanjutnya menstimulasi pelepasan ROS dan ekspresi sitokin prosklerotik dan proliferasi seperti transforming growth factor -  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) dan platelet-derived growth factor-AB (PDGF-AB). Sitokin ini akan menstimulasi produksi protein matriks ekstraseluler dan proliferasi sel mesangial. Studi in vitro menunjukkan bahwa LDL dan LDL teroksidasi juga dapat menstimulasi ekspresi gen TGF- $\beta$  pada sel mesangial dan epitelial glomerular [23].

Hasil pengamatan sediaan histologis menunjukkan bahwa dengan pemberian minyak wijen pada semua kelompok terdapat gambaran efek perbaikan terhadap glomerular injury. Hal ini ditandai dengan berkurangnya penebalan pada membran luar glomerulus, akumulasi matriks mesangial (dinyatakan dalam % luas matriks mesangial) juga berkurang, serta menurunnya jumlah sel mesangial. Luas matriks mesangial ditunjukkan dalam % luas matriks menunjukkan penurunan dengan pemberian kombinasi minyak wijen dengan  $\alpha$ -tocopherol, namun tidak bermakna ( $p=0.614$ ). Hal ini menunjukkan bahwa ada faktor lain yang lebih berpengaruh terhadap akumulasi matriks mesangial, dan tidak hanya melalui aktivitas stres oksidatif. Kemungkinan adanya interaksi sejumlah growth faktor yang berperan secara autokrin dan parakrin dalam mempengaruhi sintesis matriks mesangial, sehingga penambahan  $\alpha$ -tocopherol untuk meningkatkan efek penghambatan terhadap stres oksidatif tidak banyak berpengaruh.

Hasil penurunan % luas matriks mesangial yang tidak bermakna juga dapat disebabkan oleh faktor keterbatasan cara pengukuran luas matriks. Pada penelitian ini % luas matriks dihitung dengan membagi luas matriks dengan luas total glomerulus yang mengisi kotak mikrometer square. Sehingga kemungkinan kurang menggambarkan luas matriks yang sesungguhnya, karena didalam matriks tersebut juga terdapat sel-sel intraglomerular yang dapat ikut terhitung/mempengaruhi penghitungan luas

matriks mesangial. Disamping itu, teknik pengecatan yang digunakan adalah metode PAS yang bertujuan mewarnai gugus polisakarida dari glikosaminoglikan yang merupakan komponen penting dari matriks jaringan ikat. Sehingga tidak spesifik mewarnai komponen matriks yang meningkat, yang dapat lebih memudahkan kuantifikasi terhadap luas matriks mesangial.

Gambaran histologis pada semua kelompok juga menunjukkan penurunan jumlah sel mesangial. Hasil pengamatan terhadap kepadatan sel intraglomerulus menunjukkan berkurangnya jumlah sel mesangial pada semua kelompok dengan pemberian minyak wijen, dibanding kelompok hiperkolesterol. Kepadatan sel ini tampak semakin berkurang dengan meningkatnya dosis minyak wijen, dan tampak lebih baik dengan penambahan  $\alpha$ -tocopherol. Hal ini menunjukkan bahwa minyak wijen diduga mempunyai kemampuan menghambat proliferasi sel mesangial. Penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen tampak lebih menurunkan jumlah sel mesangial, dibanding minyak wijen sendiri meskipun secara statistik tidak bermakna. Namun terdapat dugaan adanya interaksi potensiasi antara  $\alpha$ -tocopherol dengan minyak wijen terhadap penurunan jumlah sel mesangial.

$\alpha$ -tocopherol diketahui mempunyai efek antiproliferasi pada sel otot polos pembuluh darah melalui hambatan terhadap Protein Kinase-C (PKC). Sejumlah penelitian lain juga menunjukkan adanya efek penghambatan PKC pada sel makrofag, neutrophil, fibroblas dan sel mesangial oleh  $\alpha$ -tocopherol [24]. Sedangkan minyak wijen tidak mempunyai efek antiproliferasi. Dari hasil regresi, menunjukkan dugaan adanya interaksi potensiasi antara  $\alpha$ -tocopherol dengan minyak wijen.

Hasil penghitungan terhadap jumlah sel mesangial yang menurun namun tidak bermakna secara statistik ini kemungkinan juga dapat disebabkan faktor keterbatasan identifikasi sel mesangial saat menghitung sel. Meskipun disebutkan bahwa sel mesangial dapat diidentifikasi dengan keakuratan yang beralasan berdasarkan lokasinya yang terletak di antara kapiler, mempunyai multiple proses ekstraseluler, inti reguler dengan sitoplasma kurang padat dan kadang terdapat granula sitoplasmik, namun juga diketahui bahwa normal jumlah sel mesangial hanya sekitar sepertiga dari total jumlah sel dalam glomerulus tikus Wistar [25] sehingga lebih didominasi sel yang lain. Selain itu juga disebutkan bahwa hampir semua glomeruli pada

tikus dapat terkontaminasi/mengandung subpopulasi sel yang mengekspresikan reseptor *Ia antigen* dan reseptor Fc dengan kemampuan fagositosis, yang diduga adalah infiltrasi sel makrofag, terutama pada glomeruli yang mengalami inflamasi dan terletak pada area mesangium. Sel ini tidak dengan mudah dapat dibedakan dari sel mesangial intrinsik, kecuali dengan pewarnaan khusus terhadap reseptor tersebut atau pengamatan dengan mikroskop elektron [25]. Hal – hal ini dapat mempengaruhi penghitungan jumlah sel mesangial.

Secara umum, pemberian minyak wijen sendiri maupun kombinasi dengan  $\alpha$ -tocopherol terhadap parameter *glomerular injury*, yaitu jumlah sel mesangial dan % luas matriks mesangial menunjukkan efek perbaikan/protektif dengan menurunkan jumlahnya, meskipun secara statistik tidak bermakna. Hal ini kemungkinan juga dipengaruhi adanya sel lain yang tidak ikut dihitung, namun dapat berpengaruh terhadap proses terjadinya *glomerular injury*; yaitu sel makrofag.

Meningkatnya sintesis matriks ekstraseluler terutama tergantung pada aktivasi sel mesangial (proliferasi, produksi matriks dan *cytokine-growth factor*). Sel mesangial dapat teraktivasi secara langsung oleh LDL atau LDL teroksidasi, yang akan menstimulasi sintesis matriks, protein kinase C (PKC) serta sintesis TGF- $\beta$  dan PDGF dengan efek autokrin. Sementara, secara *in vivo* sel mesangial dapat distimulasi secara tidak langsung oleh suatu tipe sel yang terdapat dalam glomerulus, diduga sel ini adalah makrofag. Karena kemampuannya untuk menginfiltrasi jaringan dari aliran darah dan untuk menghasilkan *paracrine growth factor*. Makrofag ini diketahui ikut terlibat pada berbagai kondisi patologis *injury* pada ginjal.

Pengerahan makrofag dalam glomerulus tikus yang diinduksi hiperglikemia dengan model *Streptozotocin*, adalah berkaitan dengan meningkatnya sintesis mRNA rantai  $\alpha_1$  kolagen tipe IV dalam glomeruli dan juga berkaitan dengan perubahan struktur glomerulus. Infiltrasi makrofag ini diperantarai oleh ekspresi molekul adhesi dan faktor kemotaktik. Selain itu juga melibatkan IL-1 $\beta$ , yang ikut berperan dalam sintesis kolagen tipe IV dan molekul adhesi [26].

Hasil analisis korelasi menunjukkan bahwa penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen meningkatkan efek protektif dalam menghambat *glomerular injury* melalui penghambatan stres

oksidatif, dibanding minyak wijen sendiri. Sedangkan pada analisis kadar SOD dengan jumlah sel mesangial menunjukkan korelasi yang tidak bermakna ( $p = 0.60$ ), hal ini menunjukkan bahwa kerja dari SOD sebagai antioksidan menjadi berkurang dengan penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen, karena sudah dibantu oleh  $\alpha$ -tocopherol, sehingga efeknya terhadap jumlah sel mesangial menjadi berkurang/ tidak nyata.

Hasil analisis pengaruh diet hiperkolestrol terhadap fungsi ginjal menunjukkan tidak terdapat pengaruh signifikan antara diet hiperkolestrol terhadap gangguan fungsi ginjal. Seiring dengan hal tersebut, pemberian minyak wijen, baik sendiri maupun kombinasi dengan vitamin E tidak memberikan pengaruh yang bermakna. Hal ini dapat dimengerti karena perubahan konsentrasi kreatinin serum baru terlihat bila didahului gangguan fungsi ginjal yang signifikan, seringkali  $> 50\%$  penurunan kecepatan filtrasi glomerular (GFR). Demikian pula dengan kadar ureum, peningkatan kadar ureum plasma harus didahului dengan kerusakan glomerular sebesar 70 – 80% [27].

Selain itu, hal ini kemungkinan juga berarti bahwa kerusakan jaringan/*glomerular injury* yang terjadi memang belum cukup parah. Induksi dengan hiperkolestrol saja selama 10 minggu pada penelitian ini ternyata belum menimbulkan kerusakan yang parah pada glomerulus. Hal ini sesuai dengan keadaan pada sejumlah pasien dengan hiperkolestrol primer, yang tidak selalu disertai dengan penyakit renal. Kadar kolesterol plasma yang tinggi saja tidak selalu berkorelasi dengan glomerulosklerosis (yang ditandai dengan meningkatnya jumlah sel intraglomerulus dan ekspansi matriks ekstra-suler), namun perlu disertai keterlibatan faktor lain yang dapat mempercepat dan mempengaruhi perkembangan disfungsi renal yang diinduksi oleh lipid. Faktor ini antara lain adalah terdapatnya hipertensi intra-renal dan proses inflamasi dalam glomerulus [28].

#### KESIMPULAN

Penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen cenderung lebih menurunkan kadar kolesterol total dan LDL dibanding minyak wijen saja, dan diduga terdapat interaksi secara potensiasi. Penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen lebih menurunkan kadar MDA jaringan ginjal dibanding minyak wijen saja, dan terdapat interaksi secara sinergistik, sedangkan terhadap

kadar SOD penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen cenderung lebih meningkatkan kadar SOD dibanding minyak wijen saja, dan diduga bahwa keduanya berinteraksi secara sinergis. Penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen cenderung lebih menurunkan % luas matriks mesangial dan jumlah sel mesangial dibanding minyak wijen saja, dan diduga terdapat interaksi potensiasi penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen terhadap penurunan jumlah sel mesangial. Penambahan  $\alpha$ -tocopherol pada minyak wijen menunjukkan efek penghambatan aktifitas stress oksidatif yang lebih baik dibanding minyak wijen sendiri dan hal ini dapat menghambat *glomerular injury*.

#### Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai: efek potensiasi minyak wijen dengan  $\alpha$ -tocopherol terhadap kadar kolesterol dengan dosis  $\alpha$ -tocopherol serial dan jumlah sampel yang lebih banyak; peningkatan matriks ekstrasuler dengan lebih tepat, misalnya dengan pewarnaan khusus (imunohistokimia) terhadap komponen matriks yang meningkat, terutama terhadap kolagen tipe IV; pengaruh kombinasi minyak wijen dengan  $\alpha$ -tocopherol in vitro terhadap proliferasi sel; serta menghitung jumlah makrofag glomerulus dan kaitannya dengan jumlah sel mesangial dan matriks mesangial.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] Scaeffner, S. E., T. Kurth, G. C. Curhan, R. J. Glynn, K. M. Rexrode, C. Baigent, J. E. Buring, J. M. Gaziano. 2003. Cholesterol and the risk of renal dysfunction in apparently healthy men. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14. 2084-2091.
- [2] Mauro, V. 2004. Chronic renal failure. [www.emedicine.com.htm](http://www.emedicine.com.htm).
- [3] Cheng, G., P. Latha, K. Yuko, S. I. Pravin, D. Wenlan, P. Sivaram. 2001. A protective role for kidney Apolipoprotein E: regulation of Mesangial cell proliferation and matrix expansion. *J. Biol. Chem.* 52 (276). 49142-49147.
- [4] Bonnet, F., M. E. Cooper. 2000. Potential influence of lipids in Diabetic Nephropathy: insight from experimental data and clinical studies. *Diabetes Metab.* 26. 254-264.
- [5] Annuk, M., Z. Mihkel, L. Lars, L. Torbjorn, F. Bengt. 2001. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12. 2747-2752.

- [6] Sharma, M., N. Nitya, H. K. Aggarwal, N. Daya. 2004. Evaluation of effects of Lovastatin on Hypercholesterolaemia and renal functions in Nephrotic Syndrome. *JIACM*. 5(2). 143-146.
- [7] Safeer, R. S., P. S. Ugalat. 2002. Cholesterol treatment guidelines update. *Am. Fam. Physician*. 65(5). 871-880.
- [8] Winarno, F. G. 1990. Tempe, misteri gizi dari Jawa, info pangan. Teknologi Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- [9] Handayani, S., A. Isti, Kusnandar, N. C. Ahmad. 2003. The potential of products based on sesame on agriculture sustainability system in Sukoharjo district, Central Java Province, Sebelas Maret University. International Conference of Food and Agricultura System for Developing Countries. Yogyakarta.
- [10] Hirose, N., I. Tsotumo, N. Kazuyoshi, S. Michihiro, A. Kengo, S. Sakayu, Y. Hideaki. 1991. Inhibition of cholesterol absorption and synthesis in rats by sesamin. *J. Lipid Res*. 32. 629-638.
- [11] Kang, M., N. Michitaka, T. Nobuko, O. Toshihiko. 1998. Sesamol inhibits lipid peroxidation in rat liver and kidney. *J. Nutr*. 128. 1018-1022.
- [12] Gutteridge, J. M. C., H. Barry. 1996. Antioxidants in nutrition, health and disease. Oxford University Press. Oxford. New York. 63- 81.
- [13] Kedziora-Kornatowska, K., S. Szram, T. Kornatowski, I. Szadujkis-Szadurski, G. Bartosz. 2003. Effects of vitamin E and vitamin C supplementation on antio and renal glomerular basement membrane thickness in diabetic kidney. *Nephrol*. 95. 134-143.
- [14] Boaz, M. S. Smetana, T. Weinstein, Z. Matas, U. Gafter, A. Iaina, A. Knecht, Y. Weissgarten, D. Brunner, M. Fainaru, M. S. Green. 2000. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 356(9237). 1213-1218.
- [15] Brigelius-F, R., J.K. Frank, T.S. Jukka, N. Jiri, Z. Jean-Marc, A. Angelo. 2002. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr*. 76. 703-16.
- [16] Ali, M., I. K., Muliarta. 2002. Model binatang coba tikus Atherosklerosis. Basic Molecular Biology Course in Cardiovascular. Laboratorium Biomedik. Universitas Brawijaya. Malang.
- [17] Luna, G. L. 1968. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology 3<sup>rd</sup> Edition. McGraw-Hill Book Company. New york. 158-160.
- [18] Santoso. 2000. SPSS statistik parametrik. PT. Elex Media Komputindo. Jakarta.
- [19] Sugiyono. 2006. Statistika untuk penelitian. Alfabeta. Bandung.
- [20] Ide, T., K. Masayo, T. Yoko, S. Kazuki, F. Nobuhiro, S. Y. Satoko. 2003. Sesamin, a Sesame Lignan, as a potent serum lipid-lowering food component. *JARQ*. 37(3). 151-158.
- [21] Satchithanandam, S., R. Chanderbhan, A.T. Kharroubi, R. J. Calvert, D. Klurfeld, S. A. Tepper, D. Kritchevsky. 1996. Effect of sesame oil on serum and liver lipid profiles in the rat. *Int. J. Vitam. Nutr. Res*. 66(4). 386-392.
- [22] Ibrahim, W., L. Ung-Soo, Y. Che-C, S. Joseph, B. Geza, K. C. Ching. 1997. Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver : effects of dietary lipid, vitamin E and iron. *J. Nutr*. 127. 1401-1406.
- [23] Bonnet, S. G. Rochefort, G. Sutendra, et al. 2007. The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104(27). 11418-11423.
- [24] Azzi, A., B. Isabel, F. Maria, R. Roberta, S. Achim, Z. Sabine, Z. Jean-Marc. 2001. Nonantioxidant Functions of  $\alpha$ -Tocopherol in Smooth Muscle Cells. *J. Nutr*. 131. 3785-3815.
- [25] Mene, P., S. Michael, Simonson, J. D. Michael. 1989. Physiology of the Mesangial Cell. *Am. Physiol. Soc*. 69 (4). 1347-1412.
- [26] Prigent, C. S., H. Didier, M. Chantal, B. Marie-France, M. Odile, P. Bernard, B. Jean, B. Patrick. 2000. Early glomerular macrophage recruitment in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 49. 466-475.
- [27] Hristova, E. N., B. H. John. 2001. Metabolic intermediates, inorganic ions and biochemical markers of bone metabolism. In: Clinical diagnosis and management by laboratory 20<sup>th</sup> Ed. W. B. Saunders company. Phyladelphia. 165-169, 180-183.
- [28] Ruan, Z. X. V. Zac, F. M. John. 2003. Inflammation modifies lipid-mediated renal injury. *Nephrol. Dial. Transplant*. 18. 27-32.



## 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<sup>1\*</sup>, Second Author<sup>2</sup>, Third Author<sup>3</sup> (Calibri 12 Center, without title)

<sup>1</sup>First Author Affiliation, Correspondence author should be indicated by \* symbol (Calibri 9 Center)

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Brawijaya, Malang, Indonesia

<sup>3</sup>Laboratorium 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  $25g\ l^{-1}$ ; 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		

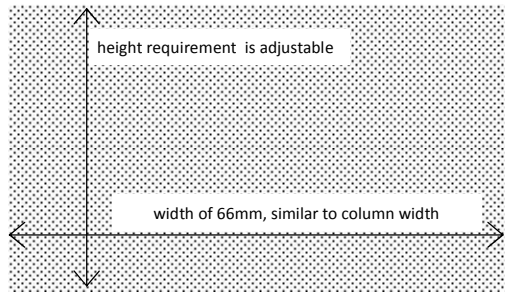
Sources: Journal of PPSUB (Calibri 8.5 Left)

**Figures**

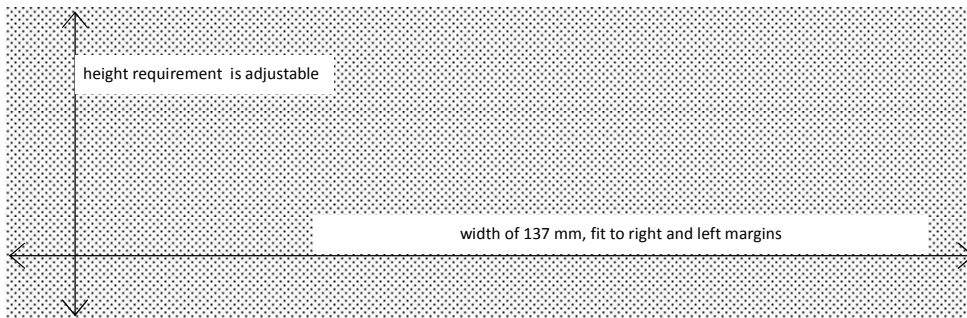
Figures should be in high resolution and well contrast in JPEG or PDF with the following conditions:

- 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- $\alpha$  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<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> 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](mailto:jels@ub.ac.id)

Web: [jels.ub.ac.id](http://jels.ub.ac.id)

