

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Hasil Penelitian

Pada penelitian ini telah dilakukan uji coba pada empat kelompok mencit (*mus musculus*) yang dikelompokkan secara random untuk melihat ekspresi *tumor necrosis factor* (TNF)  $\alpha$  dari jaringan hepar pada mencit dalam kondisi sepsis. Kelompok I merupakan kontrol negatif yang diberi *carboxymethyl cellulose* (CMC) 0,5%, kelompok II merupakan kontrol positif yang diberi CMC 0,5%, kelompok III diberi ekstrak etanol akar alang-alang dosis 90 mg/KgBB, kelompok IV diberi ekstrak etanol akar alang-alang dosis 115 mg/KgBB. Pemberian ekstrak etanol akar alang-alang dilakukan selama 2 minggu secara peroral. Pada akhir minggu kedua, semua kelompok kecuali kelompok I diinduksi lipopolisakarida (LPS) dosis 10 mg/KgBB secara intraperitoneal agar menjadi sepsis. Selanjutnya, observasi selama 8 jam dan dinilai *murine sepsis score* (MSS) dinyatakan sepsis bila jumlah nilai MSS pada masing-masing mencit lebih dari sama dengan 21 atau mencit memiliki kualitas pernapasan ataupun laju *respiratory rate* dengan nilai 3 atau lebih,<sup>25</sup> dan telah dipastikan bahwa 20 mencit sebagai sampel penelitian telah mengalami sepsis. Hal ini dapat dilihat pada tabel 4.1 yang telah sesuai dengan skor MMS. Selanjutnya semua kelompok mencit dikorbankan dan organ heparnya diambil untuk dilakukan pemeriksaan ekspresi TNF  $\alpha$  menggunakan *Realtime-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

#### 4. 1. 1 Hasil *Murine Sepsis Score* pada tiap kelompok perlakuan

Tabel 4.1 Data MMS

Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III	Kelompok IV
0	24	21	21
0	24	21	21
0	21	21	21
0	24	21	21
0	23	21	21
0	21	21	21
	23	21	

Dari tabel 4.1.1 dapat disimpulkan bahwa pada kelompok II kelompok III, dan kelompok IV mencit mengalami sepsis sesuai dengan MMS yang menunjukkan jumlah nilai pada kelompok II, kelompok III, kelompok IV masing-masing mencit lebih dari sama dengan 21.

#### 4. 1. 2 Pengaruh Ekstrak Etanol Akar Alang-Alang (*Imperata Cylindrica L*) terhadap Ekspresi TNF $\alpha$ pada Jaringan Hepar Mencit (*mus musculus*) yang Diinduksi Sepsis

##### 4.1.2.1 Gambaran Analisis Rata-Rata Ekspresi TNF $\alpha$

Analisis dilakukan untuk mengetahui nilai rata-rata (*mean*) dari jumlah ekspresi TNF  $\alpha$ .

**Tabel. 4.2 Rata-rata ekspresi TNF  $\alpha$  tiap kelompok**

Kelompok	Ekspresi TNF $\alpha$		
	Mean $\pm$ Std	Median	Range(min-max)
<b>Kelompok I</b>	1.00 $\pm$ 0.921	0.96	0.02 - 2.39
<b>Kelompok II</b>	1.95 $\pm$ 1.024	1.67	0.77 -3.57
<b>Kelompok III</b>	4.01 $\pm$ 4.803	1.06	0.31- 12.9
<b>Kelompok IV</b>	5.85 $\pm$ 8.543	2.88	0.12- 23.1

Dalam tabel 4.1 terlihat bahwa nilai rata-rata ekspresi TNF  $\alpha$  pada kelompok I (kontrol negatif) sebesar 1.00  $\pm$  0.921. Nilai rata-rata ekspresi TNF  $\alpha$  pada kelompok II (kontrol positif) sebesar 1.95  $\pm$  1.024. Nilai rata-rata ekspresi TNF  $\alpha$  pada kelompok III sebesar 4.01  $\pm$  4.803. Nilai rata-rata ekspresi TNF  $\alpha$  pada kelompok IV sebesar 5.85  $\pm$  8.543. Selain itu, di lihat dari rerata ekspresi TNF  $\alpha$  pada kelompok II, kelompok III, dan kelompok IV dapat dibuktikan bahwa ketiga kelompok mencit tersebut telah mengalami sepsis. Hal ini sesuai dengan penelitian Claudia dkk, bahwa rerata dari mencit yang mengalami sepsis ialah > 1 ng/ml.<sup>4</sup>

#### 4.1.2.2 Uji Normalitas

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui distribusi data yang telah dilakukan dengan menggunakan metode *Shapiro Wilks*. Hasil uji normalitas dapat dilihat pada tabel 4.3.

**Tabel. 4.3 Uji Normalitas Ekspresi TNF  $\alpha$  dengan *Shapiro Wilks*.**

Kelompok	Jumlah (n)	Nilai P	Distribusi Data
I	6	0.589	Normal
II	7	0.633	Normal
III	7	0.041	Tidak Normal
IV	6	0.001	Tidak Normal

Keterangan: Nilai p dihitung berdasarkan uji *Shapiro Wilks*, nilai  $p > 0.05$  menunjukkan data berdistribusi normal.

Pada tabel 4.3 dijelaskan bahwa pada hasil uji normalitas, terdapat data yang berdistribusi tidak normal karena terdapat dua kelompok dengan *P value* < 0.05, selanjutnya dilakukan transformasi data dan dilakukan uji normalitas data kembali dengan menggunakan uji *Shapiro Wilks Test*, dapat dilihat pada tabel 4.4

**Tabel 4.4 Uji Normalitas Hasil Transformasi Log Ekspresi TNF  $\alpha$  dengan *Shapiro Wilks Test*.**

Kelompok	Jumlah (n)	Nilai P	Distribusi Data
I	6	0.249	Normal
II	7	0.621	Normal
III	7	0.561	Normal
IV	6	0.257	Normal

Keterangan: Nilai p dihitung berdasarkan uji *Shapiro Wilks*, nilai  $p > 0.05$  menunjukkan data berdistribusi normal.

Dari hasil analisis diatas dapat dilihat bahwa ekspresi TNF  $\alpha$  berdistribusi normal karena seluruh kelompok memiliki  $P \text{ value} > 0.05$ , sehingga selanjutnya dianalisis dengan One Way Anova, hasil dapat dilihat pada tabel 4.5.

**Tabel 4.5 Uji One Way Anova Ekspresi TNF  $\alpha$**

Kelompok	Jumlah (n)	Mean	P value
I	6	-0.348	<b>0.180</b>
II	7	0.235	
III	7	0.279	
IV	6	0.385	

Berdasarkan hasil perhitungan statistik dengan menggunakan uji *One Way Anova* diperoleh nilai P sebesar 0.180 ( $P > 0.001$ ) hal ini menyatakan bahwa tidak terdapat pengaruh yang signifikan terhadap ekspresi TNF  $\alpha$  pada semua kelompok perlakuan, sehingga dapat disimpulkan tidak ada perbedaan signifikan rerata kadar ekspresi TNF  $\alpha$  antar kelompok perlakuan. Rerata tertinggi terdapat pada kelompok IV dan rerata terendah pada kelompok I yang menunjukkan nilai negatif (-0.348).

#### 4.2 Pembahasan

Pemberian lipopoliskarida terhadap ekspresi *tumor necrosis factor* (TNF)  $\alpha$  jaringan hepar menunjukkan bahwa ekspresi TNF  $\alpha$  pada kelompok II (kontrol positif) rerata dari jumlah ekspresi TNF  $\alpha$  memiliki nilai lebih tinggi dibandingkan kelompok I (kontrol negatif). Hal ini membuktikan bahwa lipopolisakrida dengan dosis 10 mg/KgBB dapat menyebabkan sepsis sesuai

dengan hasil pada tabel 4.1 berdasarkan MSS. Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Ren et.al, penginduksian LPS akan mengakibatkan perubahan patofisiologis pada mencit.<sup>26</sup> Selama sepsis, LPS akan memulai kaskade kejadian yang kompleks pada sel responsif khususnya monosit, makrofag, dan polimorfonuklear neutrofil yang akan menyebabkan produksi mediator inflamasi.<sup>28</sup> Pada penelitian Yung-Li dkk, menunjukkan bahwa penginduksian lipopolisakarida menyebabkan peningkatan produksi sitokin proinflamasi. Produksi sitokin dan mediator proinflamasi yang berlebih menyebabkan kerusakan jaringan. Beberapa sitokin proinflamasi seperti TNF  $\alpha$ , interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, serta mediator poinflamasi seperti oksida nitrit (NO) yang dikeluarkan oleh makrofag akibat induksi LPS. NO disintesis dari L-arginin oleh *inducible NO synthase* (iNOS) yang akan memberikan efek anti mikroba dan antiinflamasi, tetapi kelebihan produksi NO menyebabkan kerusakan pada berbagai jaringan. Meskipun inflamasi adalah mekanisme pertahanan melawan infeksi, namun respon inflamasi sistemik dapat menyebabkan kegagalan organ multipel atau kematian seperti, sepsis dan syok sepsis. Selain itu, TNF  $\alpha$  adalah sitokin proinflamasi yang paling awal meningkat dalam patogenesis sepsis<sup>29</sup> melalui *LPS-binding protein* yang menempel pada reseptor CD14. Penempelan ini akan mengaktifkan jalur sinyal *toll like receptor* (TLR4) pada sel kuffer dalam hepar yang akan menginisiasi produksi dan pelepasan mediator sitokin proinflamatori yang berlebih selama sepsis seperti *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF  $\alpha$ ), *interleukin 1 (IL-1)*, *interleukin 6 (IL-6)*, *interleukin 12 (IL-12)*, *interferon gamma (IFN  $\gamma$ )*.<sup>3</sup>

Sindrom respons peradangan sistemik (SIRS) dan sepsis mungkin disebabkan oleh infeksi bakteri. Endotoksin, LPS adalah faktor penting untuk menginduksi respon inflamasi yang parah dan sistemik serta cedera jaringan akut pada organ seperti hepar selama sepsis.

Hasil antara kelompok II (kontrol positif), kelompok III dan kelompok IV menunjukkan adanya peningkatan tren ekspresi TNF  $\alpha$ . Pada kelompok III dan kelompok IV masing-masing diberi ekstrak etanol akar alang-alang dengan dosis 90 mg/KgBB dan 115 mg/KgBB lalu ketiga kelompok tersebut diinduksi LPS. Hal ini menunjukkan bahwa pada penelitian ini senyawa yang terkandung dari ekstrak etanol akar alang-alang tidak berpengaruh dalam menurunkan ekspresi TNF  $\alpha$  pada mencit sepsis.

Tetapi pada penelitian kami belum menunjukkan bahwa ekstrak etanol akar alang-alang mampu mempengaruhi dalam menurunkan ekspresi TNF  $\alpha$  pada keadaan sepsis. Hal ini kemungkinan ekstrak etanol akar alang-alang mampu memberikan efek potensial terhadap pencegahan perburukan sepsis melalui peran sitokin proinflamasi lain seperti beberapa penelitian sebelumnya terhadap sitokin proinflamasi *Interleukin 6* (IL-6) dan *Interleukin 1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ). Penelitian tersebut dengan menggunakan dosis 90 mg/kgBB dan 115 mg/KgBB membuktikan bahwa ekstrak etanol akar alang-alang mampu memberikan pengaruh dalam menurunkan ekspresi sitokin proinflamsi melalui mekanisme dari sitokin proinflamasi lainnya. Pada penelitian Mirasari (belum diterbitkan) ekstrak etanol akar alang-alang mampu menurunkan sitokin proinflamasi seperti *Interleukin 6* (IL-6). Selain itu, penelitian Fadlianisa (belum diterbitkan) juga membuktikan bahwa ekstrak etanol

akar alang-alang dapat berpengaruh dalam menurunkan ekspresi sitokin proinflamasi berupa *Interleukin 1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ).

Menurut penelitian Rahate dkk, didalam ekstrak etanol akar alang-alang ini mengandung senyawa kimia tumbuhan seperti tanin, saponin, flavonoid, dan terpenoid.<sup>7</sup> Senyawa tersebut merupakan metabolit skunder pada tanaman yang memiliki aktivitas biologis seperti antioksidan dan antiinflamasi. Pada penelitian Rathe dkk, tanaman yang mengandung flavonoid memiliki efek anti peradangan dan antioksidan melalui berbagai mekanismenya, yaitu secara signifikan menghambat *cyclooxygenase 2* (COX-2) melalui penghambatan *Nuclear Factor Kappa b* (NF-kB) sehingga sitokin proinflamasi seperti TNF  $\alpha$ , *interleukin 1* (IL-1) pengeluarannya dapat ditekan. Mekanisme lainnya yaitu dengan menghambat ekspresi iNOS sehingga NO tidak terbentuk dan cedera jaringan dapat dihindari.<sup>8</sup> Isoeugeunin yang terdapat dalam akar alang-alang juga dapat menghambat iNOS sehingga pembentukan radikal bebas NO dapat ditekan.<sup>9</sup> Selain itu, pada penelitian Diah dan Ruslin, ekstrak etanol akar alang-alang mengandung flavonoid 1,7% yang mampu menghambat nikotinamida adenin dinukleotida fosfat (NADPH) serta ekspresi siklooksigenase 2 (COX-2) untuk mencegah dari disfungsi organ.<sup>10</sup> sepsis melibatkan interaksi kompleks antara patogen dan sistem imun penjamu. Diawali dengan induksi lipopolisakarida (LPS) yang akan dikenali oleh sistem imun penjamu melalui rekognisi *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP), yang kemudian akan berikatan dengan *pattern recognition receptor* (PRRs) seperti *toll like receptors* (TLRs) yang diekspresikan oleh permukaan sel penjamu.<sup>12</sup> Sepuluh TLRs telah teridentifikasi pada genom manusia. Seluruh TLRs, kecuali TLR3 akan mengirim sinyal melalui myeloid

differentiation factor 88 (MyDD88)-dependent pathway dan nantinya akan menginduksi produksi beberapa sitokin proinflamasi seperti *interleukin-1 (IL-1)*, *interleukin-6 (IL-6)*, dan *tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )*.<sup>13</sup> Sitokin proinflamatori TNF  $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  keduanya mengaktifkan sel endothelial, menarik leukosit polimorfonuklear yang berada disirkulasi ke tempat terjadinya injuri atau infeksi. Kedua sitokin tersebut juga memasuki sirkulasi dan menyebabkan demam serta gejala sistemik lainnya.<sup>14</sup>

Patogen yang masuk selain menyebabkan meningkatnya TNF  $\alpha$  akibat endotoksin juga akan mengaktifasi sistem imun yang nantinya akan memunculkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Di dalam sel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> meningkatkan *nuclear factor kappa b (NF-KB)*. NF-kB akan mengikat DNA agar dapat memulai proses transkripsi sejumlah gen yang merupakan enzim pengaktivasi redoks, seperti iNOS dan COX-2 dan akan menghasilkan superoksida sebagai produk sisa. Aktivasi iNOS menyebabkan produksi NO. Nitricoxide meningkatkan inhibisi electron transfer chain kemudian akan meningkatkan produksi superoksida. Penggabungan superoksida dan NO akan menghasilkan peroksinitrit atau ONOO-Spesies ini meningkatkan disfungsi mitokondria yang nantinya menyebabkan penurunan adenosine triphospahte (ATP) sehingga dapat menyebabkan cedera jaringan dan mekanisme selular.<sup>15</sup>

### 4.3 Keterbatasan Penelitian

Hasil penelitian ini memiliki keterbatasan yaitu hanya menilai satu ekspresi sitokin proinflamasi saja yang berperan dalam proses inflamasi.