

LAPORAN PENELITIAN
PROYEK DUE – Like BATCH III

Judul Penelitian

**Hambatan Produksi Superoxide (O_2^-)
Dan Ekspresi Protein Tumor Nekrosis Faktor Alfa
($TNF\alpha$) Oleh Antioksidan Vitamin E Pada Tikus Putih
Yang Menerima Stressor**

Oleh :

Lilik Maslachah, M.Kes., drh
Rahmi Sugihartuti, M.Kes., drh.
Rahma Kurniasanti, M.Si., drh.

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
NOPEMBER 2005

- Sugite ✓
- SUR-IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
 - TUMOR NECROSIS FACTOR.



LAPORAN PENELITIAN
PROYEK DUE – Like BATCH III



LP. 99/07

Judul Penelitian

**Hambatan Produksi Superoxide (O_2^-)
Dan Ekspresi Protein Tumor Nekrosis Faktor Alfa
($TNF\alpha$) Oleh Antioksidan Vitamin E Pada Tikus Putih
Yang Menerima Stressor**

Oleh :

Lilik Maslachah, M.Kes., drh
Rahmi Sugihartuti, M.Kes., drh.
Rahma Kurniasanti, M,Si., drh.

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

009907141

UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
NOPEMBER 2005



**HALAMAN PENGESAHAN HIBAH PENELITIAN
PROYEK DUE – Like BACTH III**

JUDUL : Hambatan Produksi Superoxide (O₂) Dan Ekspresi Protein Tumor Nekrosis Faktor alfa (TNF α) Oleh Antioksidan Vitamin E Pada tikus Putih Yang Menerima Stressor

Ketua Peneliti

Nama (lengkap dengan gelar akademik) : Lilik Maslachah, M.Kes., drh
Jenis Kelamin : Perempuan
Pangkat / Golongan : Lektor / IIIc
NIP : 132 061 818
Jabatan : Penata Muda Tk I
Fakultas / Jurusan / Puslit. : Fakultas Kedokteran Hewan
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
Jangka Waktu Penelitian : 6 Bulan
Biaya yang diusulkan : Rp. 30 .000.000


Mengetahui
Dekan / Pusat Penelitian,

Prof. Dr. Ismudiono, drh.
NIP. 130 687 297

Surabaya, 10 Nopember 2005
Ketua Peneliti,


Lilik Maslachah, M.Kes., drh.
NIP. 132 061 818

Menyetujui,
Direktur Eksekutif LPIU
Universitas Airlangga


Tjitjik Sae Tjahjandarie, Ph.D
NIP. 131 801 627

RINGKASAN

JUDUL	: Hambatan Produksi Superoxide (O_2^-) Dan Ekspresi Protein Tumor Nekrosis Faktor alfa ($TNF\alpha$) Oleh Antioksidan Vitamin E Pada tikus Putih Yang Menerima Stressor
KETUA PENELITI	: Lilik maslachah, M.Kes., drh
ANGGOTA PENELITI	: Rahmi Sugihartuti, M.Kes., drh. Rahma Kurniasanti, M.Si., drh.
TAHUN	: Nopember 2005

Penelitian ini menggunakan tikus wistar jantan untuk mempelajari mekanisme kerusakan pembuluh darah akibat stressor dan mekanisme perlindungan pembuluh darah oleh antioksidan vitamin E akibat stressor. Mengingat penelitian mengenai kerusakan pembuluh darah akibat stressor masih kurang terutama di Indonesia tetapi akibat stressor sudah bisa dilihat dan dirasakan terutama pada kasus dan keparahan hipertensi, jantung, stroke dan diabetes, yang insiden ini cenderung meningkat. Penelitian ini diharapkan mampu mengungkap mekanisme perlindungan kerusakan pembuluh darah akibat stressor, juga mampu mengungkap mekanisme perlindungan atau pencegahan kerusakan pembuluh darah oleh antioksidan akibat stressor.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mencari model mekanisme kerusakan sistim pembuluh darah akibat stressor serta mekanisme perlindungan atau pencegahan kerusakan pembuluh darah oleh antioksidan akibat stressor dengan pendekatan molekuler.

Manfaat dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi baru mengenai Mekanisme molekuler kerusakan sistem pembuluh darah akibat stressor. Mekanisme molekuler pencegahan kerusakan pembuluh darah akibat stressor oleh antioksidan vitamin E. Peranan superoxide (O_2^-) sebagai salah satu Reaktif Oksigen Spesies (ROS) yang penting pada kerusakan pembuluh darah. Peranan sitokin pro inflamasi $TNF\alpha$ pada perkembangan lesi pembuluh darah. Penelitian ini menggunakan tikus wistar jantan umur 3 bulan dengan berat badan kurang lebih 200 gram, sehat. Hewan coba dibagi 3 kelompok perlakuan : I. Kelompok kontrol (Disonde pelarut obat), II. Kelompok stressor (Diberi stressor dengan elektrik shock atau rejatan listrik) selama 14 hari, III. Kelompok

yang diberi antioksidan vitamin E 400 IU dan stressor dengan elektrik shock atau rejatan listrik selama 14 hari.

Persiapan sampel serum: Pada hari terakhir hewan coba dipuaskan terlebih dahulu selama 12 jam tetapi air minum tetap diberikan, selanjutnya darah diambil dengan cara intra cardial sebanyak 6 ml, kemudian darah didiamkan selama setengah jam. Dipindahkan dalam tabung sentrifuge dan disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum darah kemudian dimasukkan dalam vial. Simpan dingin sebelum dilakukan percobaan selanjutnya yaitu pemeriksaan superoxide (O_2^-), TNF α dan untuk whole protein (Pemeriksaan ekspresi protein TNF α).

Pengukuran produksi reaktif oksigen spesies yang dihasilkan dengan mengukur kadar superoxide (O_2^-). Kadar sitokin proinflamasi Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF α) dengan indirect ELISA. Untuk mengkonfirmasi apakah ada gangguan ekspresi protein TNF α dilakukan analisis protein dengan SDS-PAGE dan identifikasi protein dengan Western Blot.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa Pemberian stressor dapat meningkatkan produksi radikal superoxide serum tikus putih. Pemberian Vitamin E dapat menurunkan produksi radikal superoxide serum tikus putih yang menerima stressor. Pemberian stressor dan kombinasi stressor dengan vitamin E tidak berpengaruh terhadap kadar dan ekspresi protein TNF α serum tikus putih.

Saran dari penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh stressor yang dikombinasi dengan pemberian perlakuan yang lain (toxin, infeksi) terhadap kadar dan ekspresi protein TNF α serum tikus putih. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh stressor yang dikombinasi dengan vitamin E terhadap kadar Nitric Oxide (NO) yang merupakan faktor dilatasi pembuluh darah. (Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, SK. Rektor nomor :

No. Kontrak : 57/PL/DUE-Like/UA/2005 HIBAH PROYEK DUE – LIKE Universitas Airlangga, Tahun Anggaran 2003-2006

KATA PENGANTAR

Puji syukur yang tak terhingga penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan KaruniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan laporan penelitian hibah DUE-LIKE dengan judul “ **Hambatan Produksi Superoxide (O₂) Dan Ekspresi Protein Tumor Nekrosis Faktor Alfa (TNF α) Oleh Antioksidan Vitamin E Pada tikus Putih Yang Menerima Stressor** “ dengan tepat waktu.

Penelitian ini dapat terlaksana atas pembiayaan dari dana Hibah penelitian Proyek Due-Like Batch III tahun Anggaran 2005. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan penghargaan dan ucapan terimakasih yang setulus-tulusnya kepada :

1. Bapak Rektor Universitas Airlangga Surabaya
2. Ketua lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya
4. LPIU Proyek Due-Like Batch III Universitas Airlangga Surabaya
5. Tim Panitia Hibah Penelitian Proyek Due-Like Batch III Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya
6. Ketua Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah mengijinkan pemanfaatan fasilitas kandang hewan coba
7. Semua pelaksana di TDRC yang telah membantu pembancean hasil penelitian ini
8. Semua pihak yang telah membantu baik langsung maupun tidak langsung dalam kelancaran penelitian ini.

Akhirnya dengan tulus penulis sangat mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan laporan penelitian ini karena penulis menyadari laporan hasil penelitian ini masih jauh dari sempurna. Semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi semua, khususnya perkembangan ilmu pengetahuan

Surabaya, 10 Nopember 2005

Penulis



DAFTAR ISI

Halaman

JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
RINGKASAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Subyek Penelitian.....	3
1.3. Lokasi Penelitian.....	3
1.4. Hasil yang Diharapkan.....	3
BAB II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
2.1. Tujuan Penelitian	4
2.2. Manfaat Penelitian	4
BAB III. TINJAUAN PUSTAKA	
3.1. Hubungan Stress dan Penyakit.....	5
3.2. Oksidan-Antioksidan.....	6
3.3. Mekanisme Kerusakan Jaringan Akibat Radikal Bebas.....	8
3.4. Vitamin E.....	9
3.5. Sitokin.....	10
3.5.1. Sitokin Pro Inflamasi.....	11
3.5.2. Peran Sitokin TNF α Pada Pembuluh Darah.....	11
3.6. Indirect ELISA.....	13

vi

3.7. SDS-PAGE (Sodium Dedocyl Sulphate Polyacrilamid Gel	
Electrophoresis	13
3.8. Western Blot.....	14
BAB IV. METODE PENELITIAN	
4.1. Rancangan Penelitian	17
4.2. Sampel dan Besar Sampel.....	17
4.3. Variabel Penelitian.....	17
4.4. Bahan dan Instrumen Penelitian	17
4.5. Prosedur Penelitian.....	18
4.6. Analisis Statistik.....	23
BAB V. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
5.1. Superoxide	25
5.2. TNF α	29
5.3. Analisis Protein dengan SDS-PAGE	31
5.4. Identifikasi Protein TNF α dengan Western Blot.....	32
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	
DAFTAR PUSTAKA.....	
LAMPIRAN.....	
ABSTRAK MAHASISWA.....	

DAFTAR TABEL

Tabel No.	Halaman
1. Nilai <i>Optical Density</i> (OD) Superoxide.....	25
2. Nilai <i>Optical Density</i> (OD) TNF α	29

DAFTAR GAMBAR

Gambar No.	Halaman
1. TNF α	11
2. Indirect ELISA.....	13
3. Skema Alur Penelitian	24
4. Hasil Analisis Protein dengan SDS-PAGE.....	31
5. Hasil Identifikasi Protein TNF α dengan Western Blot	32

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran No.	Halaman
1. Perhitungan Dosis Vitamin E.....	38
2. Diagram Alir Western Blot.....	40
3. Elektrophoresis dengan SDS-PAGE 12 %	41
4. Analisis Statistik Superoxide.....	42
5. Analisis Statistik TNF α	43
6. Analisis Statistik Regresi Korelasi SDS – PAGE	44
7. Analisis Statistik Regresi Korelasi Western Blot.....	47

BAB I

PENDAHULUAN



1.1.Latar Belakang Masalah

Dalam keadaan yang semakin kompleks menjelang era globalisasi dan adanya tekanan kesulitan hidup yang semakin berat saat ini membuat banyak orang tidak bisa beradaptasi, yang akhirnya akan mempengaruhi keseimbangan (homoestasis) di dalam tubuhnya, pada keadaan kronik dapat menimbulkan gangguan terhadap sistem organ dengan tingkatan yang berbeda-beda (Covelli, 1992). Bila beban yang diberikan melebihi batas ambang, maka akan menimbulkan respon stress, yaitu respon yang terjadi pada saat individu tidak mampu mengatasi beban fisik atau psikologik (Riley, 1981).

Studi terbaru menunjukkan bahwa kejadian depresi, hipertensi dan penyakit jantung, adalah penyakit yang diperkirakan ada hubungannya dengan respon stress yang memegang peranan penting dalam masalah kesehatan (Atkinson *et al.*, 1993). Penyakit jantung koroner merupakan penyebab kematian utama di negara maju. Hasil survei kesehatan rumah tangga tahun 1992 melaporkan penyakit sistem sirkulasi sudah merupakan penyebab kematian yang semakin banyak di Indonesia. Dalam upaya menurunkan morbiditas dan mortalitas penyakit jantung koroner, pengendalian faktor risiko merupakan prioritas utama baik pada pencegahan primer maupun skunder, oleh karena itu diperlukan pemahaman yang baik mengenai faktor risiko serta mekanisme yang berperan pada penyakit jantung koroner (Alwi, 1996).

Endotel mempunyai peran yang sangat penting dalam menjaga integritas pembuluh darah. Pada keadaan normal mediator vasodilatasi pada pembuluh darah adalah *Endothelium Derived Relaxing Factor* (EDRF) dan prostasiklin. EDRF tidak hanya bekerja untuk dilatasi otot polos pembuluh darah, tetapi juga berperan menghambat proliferasi otot polos, agregasi platelet, merangsang disagregasi pletelet dan menghambat adhesi platelet pada permukaan endotel. Selain itu juga EDRF bekerja sebagai agen antiinflamasi dengan menghambat adhesi dari monosit dan neutrofil pada permukaan endotel dan bekerja sebagai antioksidan (Flavahan and Vanhoutte, 1995). Adanya platelet, monosit, neutrofil pada permukaan endothel ini merupakan suatu proses awal atherogenesis.

Penelitian terbaru menunjukkan bahwa TNF α mempunyai kontribusi pada disfungsi endotel pada pasien dengan gagal jantung (Baron *et al*, 1997 ; Faraci, 2003; Ungvari *et al*, 2003). Peningkatan Produksi TNF α berpengaruh terhadap peningkatan NAD(P)H oksidase sebagai sumber terbanyak pada pembentukan *Derived Superoxide*. TNF α dapat meningkatkan aktivitas NAD(P)H oksidase pada kultur endotel dan otot polos pembuluh darah. NAD(P)H oksidase memproduksi superoxide pada pembuluh darah arteri. Fungsi endotel juga berhubungan dengan bioaktivitas dari NO. Reaksi antara NO dengan superoxide akan menghasilkan peroksinitrit (ONOO⁻) dan *Reaktif Oksigen Spesies* (ROS) yang merupakan oksidan yang sangat poten (Faraci, 2003; Ungvari *et al.*, 2003)

Stress oksidatif dan aktivasi sitokin pro inflamasi pada pembuluh darah seperti TNF α menyebabkan peningkatan regulasi NAD(P)H oksidase dan stress nitrosative serta penurunan bioavailabilitas NO. Faktor ini dapat menginduksi perubahan profile ekspresi gen pada endotel dan otot polos pembuluh darah yang menyebabkan fenotipe proatherosklerotik pembuluh darah (disfungsi vasomotor, aktivasi endotel mengekspresikan molekul adhesi, proliferasi otot polos) sebagai proses atherogenesis (Ungvari *et al.*, 2003)

Perbaikan fungsi endothel dengan pemberian terapi antioksidan belum banyak diketahui. Vitamin E merupakan antioksidan pemutus rantai pada membran yang merupakan salah satu dari bermacam-macam antioksidan. Efektivitas vitamin E dalam pencegahan stress oksidatif atau peroksidasi lipid masih perlu banyak dikaji. Hasil penelitian terbaru menunjukkan kemampuan vitamin E dalam menurunkan kadar kreatine kinase yang merupakan salah satu indikator stress oksidaif pada kerusakan otot, juga dapat menurunkan kadar Malondialdehyde (MDA), menurunkan kerusakan DNA dari sel darah putih serta dapat menurunkan produksi pentane dan produk peroksidasi lipid dari mitokondria (Acker *et al*, 2003).

Dengan merujuk pada fakta di atas karena Vitamin E mempunyai potensi sebagai antioksidan maka perlu dilakukan penelitian mengenai mekanisme molekuler antioksidan Vitamin E terhadap perlindungan pembuluh darah dengan melihat hambatan produksi radikal Superoxide dan TNF α serta ekspresi protein TNF α yang disebabkan oleh adanya stressor.

1.2. Subjek penelitian

Bahan yang diamati berupa serum tikus yang diperoleh dari hewan coba tikus yang menerima stressor elektrik shock atau rejatan listrik selama 14 hari dan kombinasi stressor dengan pemberian antioksidan vitamin E. Penelitian ini meliputi pengukuran terhadap produksi superoxide (O_2^-) yang merupakan salah satu reaktif oksigen spesies yang berperan pada patogenesis kerusakan pembuluh darah. Pada tahap berikutnya dilakukan pengukuran kadar TNF α yang merupakan salah satu sitokin pro inflamasi yang berperan terhadap perkembangan lesi pada pembuluh darah dengan menggunakan antibodi terhadap TNF α dengan metode indirect ELISA. Kemudian melihat ekspresi protein dari TNF α dengan SDS PAGE –Western Blot.

1.3. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di kandang hewan coba laboratorium hewan coba Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga (Perlakuan pada hewan coba, pemberian stressor dan Vitamin E selama 14 hari dan pengambilan sampel serum). Pemeriksaan kadar superoxide dan TNF α dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan dan *Tropical Disease Research Center* (TDRC) Universitas Airlangga Surabaya. (Indirect ELISA , SDS- PAGE dan Western Blot)

1.4. Hasil yang Diharapkan

Beberapa keluaran utama dari penelitian ini adalah berupa temuan baru mengenai ;

1. Peranan superoxide (O_2^-) sebagai salah satu Reaktif Oksigen Spesies (ROS) dalam kerusakan pembuluh darah.
2. Peranan sitokin pro inflamasi TNF α pada perkembangan lesi pembuluh darah serta mengetahui perubahan ekspresi protein TNF α

BAB II

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1. Tujuan Penelitian

Tujuan yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah:

- a. Membuktikan efek vitamin E sebagai antioksidan dalam menghambat produksi superoxide (O_2^-) dari tikus putih yang menerima stressor.
- b. Membuktikan efek vitamin E sebagai antioksidan terhadap ekspresi protein Tumor Nekrosis Faktor ($TNF\ \alpha$) dari tikus putih yang menerima stressor.

2.2. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi

- a. Peneliti, sebagai bahan informasi ilmiah dalam rangka mengkaji masalah yang timbul akibat dampak stressor terhadap kerusakan pembuluh darah melalui pendekatan biomolekuler. Stressor dan antioksidan dapat menjadi model suatu mekanisme kerusakan sistem pembuluh darah dan mekanisme perlindungan kerusakan pembuluh darah melalui peran superoxide dan $TNF\alpha$
- b. Mahasiswa yang terlibat, memberikan pengetahuan teoritis dan praktis dalam melakukan uji-uji imunologis seperti ELISA dan biologi molekuler (SDS PAGE dan Western blot) serta membantu kelancaran studi mahasiswa melalui pemendekan masa studi, biaya skripsi dan pemanfaatan laboratorium.

BAB III

TINJAUAN PUSTAKA

3.1. Hubungan Stres dan Penyakit

Stres merupakan suatu respon dari organisme terhadap suatu rangsangan fisik, kimia, somatik, psikis, psikososial kultural dan lain-lain, heterogenitas rangsangan dapat berasal dari luar atau dalam organisme itu sendiri (Coveli, 1992). Bila beban rangsangan yang diberikan melebihi batas ambang, maka akan menimbulkan respon stres, yaitu respon yang terjadi pada saat individu tidak mampu mengatasi beban fisik atau psikologik (Riley, 1981). Studi terbaru menunjukkan bahwa kejadian depresi, hipertensi, dan penyakit jantung adalah penyakit yang diperkirakan ada hubungan dengan respon stres yang memegang peranan penting dalam masalah kesehatan (Atkinson, 1993)

Pada stress metabolik, di dalam sel dapat terjadi beberapa perubahan biokimia yaitu peningkatan kecepatan pembentukan radikal bebas dari semiquinon dan Xantin Oxidase. Pembentukan radikal bebas yang sangat cepat melebihi kemampuan kapasitas pertahanan seluler yang akan menyebabkan serangan radikal bebas pada membran sel sehingga menimbulkan hilangnya permeabilitas dan nekrosis sel serta dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan inflamasi yang terjadi dari reaksi kimia pada tingkat subseluler (Sjodin *et al*, 1990)

Penelitian sebelumnya menemukan bahwa antioksidan Probucol dapat menurunkan kadar Malondialdehyde (MDA) dan jumlah *circulating endothel* pada tikus yang menerima stressor (Maslachah, 2001). Penelitian yang lain menemukan bahwa antioksidan Probucol dapat melindungi disfungsi endothel pembuluh darah akibat stressor (Maslachah, 1999). Probucol terbukti juga dapat memperbaiki struktur pembuluh darah tikus yang menerima stressor (Ketebalan tunika media, diameter pembuluh darah dan diameter lumen pembuluh darah) (Maslachah, 2003).

3.2. Oksidan-Antioksidan

Oksidan merupakan senyawa reaktif yang dapat mengganggu integritas sel karena dapat bereaksi dengan berbagai komponen sel, baik komponen struktural seperti molekul-molekul penyusun membran sel, maupun komponen-komponen fungsional, seperti enzim atau DNA (Evan and Bruccdorfer, 1992; Wijaya, 1996; Suryohudoyo, 1997).

Oksidan dapat berasal dari luar tubuh (eksogen), misalnya berupa bahan pencemar (Pollutan) atau obat-obatan, maupun terbentuk dalam tubuh sendiri (endogen) seperti misalnya H_2O_2 (Suryohudoyo, 1997).

Aktivitas oksidan yang merugikan dapat diatasi oleh kelompok senyawa lain yang disebut anti oksidan. Oksidan diketahui ikut berperan dalam berbagai keadaan patologis seperti atherosclerosis, penyakit jantung koroner, kanker, diabetes melitus dll (Evan and Bruccdorfer, 1992).

Dampak Oksidan/Radikal Bebas terhadap Sel

Reactive Oksigen Spesies (ROS) merupakan senyawa oksigen reaktif dan semuanya merupakan oksidan yang sangat kuat, walaupun derajat kekuatannya berbeda-beda. Dampak aktivitas oksidan dapat sangat luas, dan sering mekanisme molekulernya masih belum diketahui secara jelas. Pada dasarnya semua oksidan dapat bereaksi dengan semua senyawa yang dapat melepaskan elektron, tetapi yang paling penting adalah reaksinya terhadap tiga jenis senyawa yang berfungsi untuk mempertahankan integritas sel yaitu:

1. Asam lemak khususnya asam lemak tak jenuh jamak (*Polyunsaturated Fatty Acid*, PUFA) yang merupakan komponen membran sel.
2. DNA yang merupakan perangkat genetik sel.
3. Protein yang melaksanakan berbagai peran penting seperti : enzim, reseptor, antibodi dan pembentuk matrik ekstra sel serta sitoskeleton.

Diantara senyawa oksigen reaktif, radikal hidroksil merupakan senyawa yang paling reaktif, karena itu paling berbahaya dan dapat merusak tiga jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel (Evan and Bruccdorfer, 1992; Wijaya, 1996; Suryohudoyo, 1997).

1. Dampak Terhadap Asam Lemak Tak Jenuh Jamak (PUFA)

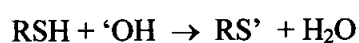
Komponen terpenting membran sel adalah fosfolipid, glikolipid dan kolesterol. Dua komponen pertama mengandung asam tak jenuh jamak (*Polyunsaturated Fatty Acid*, PUFA). Justru asam-asam tak jenuh ini (linoleat, linolenat, arakidonat) dan asam-asam tak jenuh turunannya : asam eikosaheksaenoat dan asam dokosaheksaenoat sangat rawan terhadap serangan radikal, terutama radikal hidroksil. Radikal hidroksil dapat menimbulkan reaksi rantai yang dikenal dengan nama peroksidasi lipid. Akibat akhir dari reaksi rantai ini adalah terputusnya rantai karbon asam lemak yang menghasilkan berbagai senyawa antara lain aldehid-aldehid seperti malondialdehid (MDA), 9 hidroksi nonenal serta senyawa hidrokarbon seperti etana (C₂H₆), pentana (C₅H₁₂) yang bersifat toksik terhadap sel. Dapat pula terjadi ikatan silang (cross linking) antara 2 rantai asam lemak yang timbul karena reaksi antara dua radikal, semua ini mengakibatkan kerusakan parah pada membran sel, sehingga membahayakan kehidupan sel (Evan and Bruccdorfer, 1992; Wijaya, 1996; Suryohudoyo, 1997).

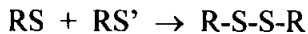
2. Dampak terhadap DNA

Radikal hidroksil dapat menimbulkan berbagai perubahan pada DNA yang antara lain berupa hidroksilasi basa timin dan sitosin, pembukaan cincin purin dan pirimidin serta terputusnya rantai fosfodiester DNA. Bila kerusakan tak terlalu parah, maka masih dapat diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA (*DNA repair system*). Akan tetapi jika kerusakannya terlalu parah, misalnya rantai DNA terputus di banyak tempat, maka kerusakan ini tak dapat diperbaiki, akhirnya sel mati. Pada perbaikan DNA, nukleotida yang biasanya rusak, dapat diganti namun sering tak sempurna, sehingga terjadi mutasi. Bila mutasi ini terjadi pada jenis gen khusus, yaitu proto – onkogen atau anti onkogen maka dapat menimbulkan kanker. Rantai DNA yang terputus dapat disambung kembali, tetapi penyambungannya sering kurang sempurna sehingga terjadi delesi atau translokasi (Evan and Bruccdorfer, 1992; Wijaya, 1996; Suryohudoyo, 1997).

3. Dampak Terhadap Protein

Oksidan dapat merusak protein karena dapat bereaksi dengan asam amino penyusun protein, khususnya asam amino sistein yang mengandung gugusan sulfidril (-SH) :





Pembentukan ikatan disulfida (S-S) menimbulkan ikatan intra maupun antar molekul protein sehingga protein kehilangan fungsi biologisnya (Misalnya enzim kehilangan aktivitasnya). Protein dapat juga bereaksi dengan aldehyd hasil peroksidasi lipid sehingga menimbulkan apa yang disebut *Advanced Glycosylated Endproducts* (AGE) yang dapat merusak fungsi biologis protein (Evan and Bruccdorfer, 1992; Wijaya, 1996; Suryohudoyo, 1997).

3.3. Mekanisme Kerusakan Jaringan Akibat Radikal Bebas

Oxidase NADPH menghasilkan oksigen yang terdapat dalam sel fagosit (neutrofil, monosit, eosinofil dan macrofag) yang memainkan peranan penting dalam kerusakan jaringan dengan memicu proses inflamasi. Neutrofil dan akumulasi platelet telah diketahui sebagai sumber penting kerusakan jaringan termasuk respon inflamasi yang disebabkan oleh adanya respon terhadap O_2^- . Kemudian O_2^- memerlukan besi dan bersama-sama dengan H_2O_2 menyebabkan kematian sel endotel melalui reaksi fenton menghasilkan pembentukan radikal hidroksil (HO^\cdot) yang dapat mengaktifkan neutrofil sehingga dapat meningkatkan kemampuan neutrofil untuk membunuh sel endotel. Protease yang dilepaskan dari neutrofil bersama-sama dengan hasil produk oksigen menyebabkan pelepasan epitel dan sel endotel dari membran dasar yang menimbulkan kerusakan atau gangguan permeabilitas (Harian *et al.*, 1981). Kemampuan makrofag untuk menghasilkan radikal oksigen dengan melepaskan sitokin interleukin (IL-1) dan Tumor Necrosis Faktor (TNF). IL-1 dan TNF dapat secara langsung mengawali produksi oksidan. Sitokin ini akan meningkatkan radikal oksigen sebagai perantara kerusakan. Kontak sel endotel dengan IL-1 dan TNF menyebabkan perubahan dalam sel endotel seperti peningkatan kepekaan terhadap radikal oksigen sebagai perantara kerusakan jaringan dengan aktivasi neutrofil. Kerusakan sel endotel terjadi dengan adanya H_2O_2 dan besi. Kemampuan sitokin untuk mempengaruhi kepekaan sel endotel terhadap kerusakan karena makrofag mempunyai efek positif terhadap neutrofil yang secara bersamaan menyebabkan kerusakan jaringan (Ward *et al.*, 1988).

3.4. Vitamin E

Vitamin E pertama kali ditemukan oleh Evans dan Bishop pada tahun 1922 dan dikenal dengan nama tocopherol. Tocopherol berasal dari istilah Yunani yaitu *tocos*, *pherein*, dan *-ol*. Tocos berarti keturunan, pherein berarti membawa dan tambahan kata *-ol* menunjukkan kelompok alkohol yang berikatan pada lingkungan benzena. (Goodman dan Gillman, 1991).

Vitamin E adalah satu dari empat vitamin yang larut lemak. Vitamin E disintesis oleh tumbuh-tumbuhan, dan mempunyai delapan isoform (vitamers) dan terbagi dalam dua kelas yang masing-masing kelas terdiri dari empat vitamin. Senyawa ini memiliki ikatan jenuh yang diklasifikasikan sebagai tokol. Senyawa yang dikenal sebagai tokotrienols(trienols) memiliki sembilan ikatan tak jenuh (Roberts and Knight, 2001).

Vitamin E adalah istilah umum dibagi 8 macam substansi alami yang bersifat larut lemak yaitu α , beta, gamma, delta tocopherol dan α , beta, gamma, delta tocotrienol. Diantara 8 macam substansi tersebut alpha tocopherol adalah jenis yang merupakan aktifitas biologi yang tertinggi dan terdapat dalam jumlah paling besar dalam jaringan tubuh (Goodman dan Gillman, 1991).

Vitamin E setelah diabsorpsi dari usus segera bergabung dengan kilomikron salah satu jenis lipoprotein, masuk dalam sirkulasi darah untuk menuju ke hati. Dalam sel inilah vitamin E banyak disimpan dan sisanya didistribusikan ke jaringan-jaringan lain melalui *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) dan *Low Density Lipoprotein* (LDL) (Smith and Reynard, 1992). Jaringan lain yang banyak menyimpan vitamin E adalah adiposa dan otot (Reynolds, 1993). Lebih kurang 70-80 % yang diberikan secara enteral diekskresikan oleh hati dalam waktu 1 minggu. (Goodman dan Gillman, 1991). Jalur ekskresi utamanya adalah melalui empedu dan feses, sedangkan jalur ekskresi alternatif adalah melalui urin (Bjorneboe, *et al.*, 1990).

Konsumsi vitamin E memiliki manfaat pada membran sel yang berfungsi dalam pertahanan sel terhadap oksidasi. Sumber vitamin E sintetis yaitu dl-alpha tocopherol merupakan salah satu bentuk vitamin E yang alami dapat disintesis hanya dari tumbuhan dan ditemukan terutama pada minyak-minyak tumbuhan. Vitamin E dalam jumlah besar terdapat dalam kloroplas daun.

Sumber vitamin E terdapat pada hampir semua jenis makanan tetapi ada beberapa jenis makanan tertentu yang kaya seperti kecambah dan biji-bijian, gandum, padi, kedelai, lemak, dan minyak nabati, daging, telur, sereal, sayuran yang berwarna kuning dan hijau (Reynolds, 1993).

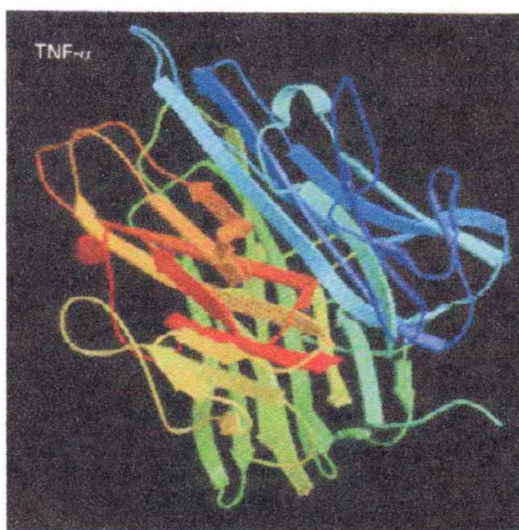
Vitamin E penting dalam menyokong tanggap kebal tubuh, karena vitamin E berperan dalam proses pembentukan pertahanan tubuh terhadap serangan penyakit. Hal ini ditunjukkan dengan semakin meningkatnya resistensi dan imunitas tubuh. (Parakkasi, 1983). Mc Donald dan Edward (1988) menyatakan bahwa adanya peran vitamin E yang lebih penting, yaitu pada perkembangan dan fungsi kekebalan. Vitamin E diperkirakan dapat meningkatkan daya tahan tubuh terhadap penyakit.

Vitamin E sebagai stabilisator membran sel terhadap metabolisme oksigen dan peroksidasi. Peran vitamin E dalam reaksi redoks adalah menggantikan lemak untuk berinteraksi dengan singlet oksigen asam lemak bebas dan sistem enzim (Evstigneeva *et al.*, 2001)

3.5. Sitokin

Sitokin merupakan bahan pemodifikasi respon biologi yang sangat poten, oleh karenanya dalam mengatur fungsi sitokin melibatkan sejumlah mekanisme seluler maupun molekuler. Mekanisme utama terhadap pengaturan produksi sitokin terjadi pada level transkripsi gen. Secara umum sitokin tidak tersimpan didalam sel tetapi diproduksi *denovo* setelah aktivasi sel. Regulasi fungsi beberapa sitokin seperti IL1 α , IL 1 β , TNF α , TGF α dan β terjadi melalui regulasi konversi dari prositokin inaktif mejadi bentuk aktifnya contoh TNF α diproduksi dalam bentuk protein membran aktif (*Biologically active membran protein*) sekresi baru terjadi bila telah dipecah oleh enzim proteolitik yang bernama TNF α *Converting enzim* (Sandy *et al.*, 1999)

Sitokin adalah molekul berberat molekul rendah yang bertindak sebagai autokrin, parakrin dan endokrin guna meregulasi dan integrasi fungsi dari sel-sel imun. Kosentrasi sistemik beberapa sitokin terutama TNF berkorelasi dengan meluasnya inflamasi dan memberatkan suatu penyakit. Oleh karenanya ekspresi dari suatu sitokin seringkali dimonitor atau dimanipulasi sebagai target dari suatu pengobatan dari sepsis dan kondisi inflamasi yang lain (Alkharfy *et al*, 2000)



Gambar 1. TNF α (Roitt *et al.*, 2001)

3.5.1. Sitokin Pro Inflamasi

Sejumlah sitokin yang berbeda, baik secara sendiri-sendiri maupun bekerja bersama-sama dapat mempengaruhi sintesis protein fase akut. Dalam suatu proses inflamasi sitokin yang terlibat diantaranya adalah IL-6, IL-1, TNF α dan IFN γ . Sebagian diantaranya dinamakan sitokin pro inflamasi. Sitokin seringkali menunjukkan aktivitas pleotropik artinya bekerja pada berbagai macam tipe sel guna menstimulasi berbagai fungsi sel. Sitokin yang mempunyai aktivitas pleotropik adalah TNF α , IL-1, IL-6, IL-4, IL-10, TGF β dan anggota dari famili interferon (Maat, 2003)

3.5.2. Peran Sitokin TNF α pada Pembuluh Darah

Peningkatan sitokin TNF α dan TNF pada level reseptor dapat terjadi pada berbagai macam infeksi seperti inflamasi, autoimun, neoplastik dan mekanisme inflamasi pada plak aterosklerotik. Makrofage dan T. Limfosit berperan penting pada proses atheroma yang merupakan stadium awal dari proses penyakit, dan diyakini bahwa sistem imun berperan terhadap awal dari perkembangan lesi, proses atherosklerosis berlanjut dengan adanya aktivasi dari leukosit. Atherosklerosis merupakan penyakit inflamasi. Peningkatan oksidasi LDL kolesterol berperan pada

kerusakan endotel yang menyebabkan aktivasi monosit dan limfosit pada pembuluh darah, proliferasi sel otot polos dan penebalan dinding pembuluh darah (Elkind *et al.*, 2002)

Aktivasi Nuklear faktor Kappa B (NF KB) meningkatkan produksi sitokin proinflamasi dan ekspresi dari adhesi molekul dan monosit kemoatraktan protein. TNF α mempunyai efek pada sel pembuluh darah termasuk merangsang ekspresi dari "Inflammatory related gen " vasokonstriksi dan gangguan fungsi endotel. TNF α mengaktivasi sel endotel pada terjadinya adhesi leukosit dan aktivitas prokoagulan (peningkatan faktor jaringan, Von Willebrand faktor dan aktivasi platelet) yang dapat meningkatkan kerusakan iskemik serta mengaktifkan neutrofil, peningkatan leukosit pada endotel, ekspresi sel adhesi molekul dan adhesi leukosit pada pembuluh darah. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa TNF α mempunyai kontribusi pada disfungsi endotel pada pasien dengan gagal jantung (Baron *et al*, 1997 ; Faraci, 2003; Ungvari *et al.*, 2003)

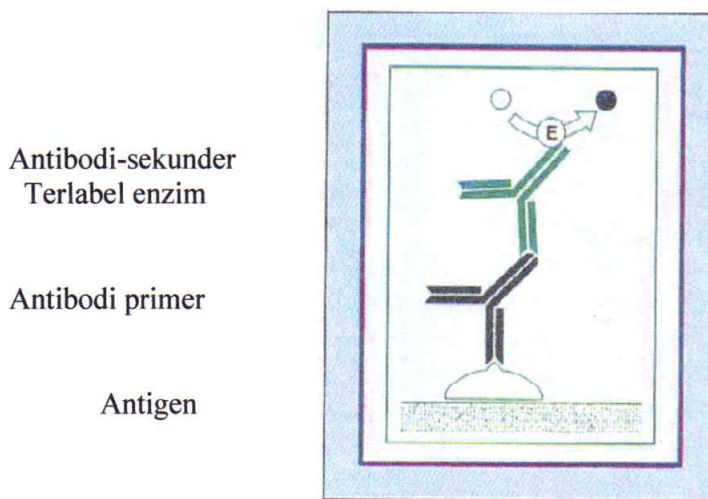
Peningkatan Produksi TNF α berpengaruh terhadap peningkatan NAD (P) H oksidase sebagai sumber terbanyak pada pembentukan Derived Superoxide. TNF α dapat meningkatkan aktivitas NAD(P) H oxidase pada kultur endotel dan otot polos pembuluh darah. NAD(P) H oxidase memproduksi superoxide pada pembuluh darah arteri. Fungsi endotel berhubungan dengan bioaktivitas dari NO. Reaksi antara NO dengan superoxide akan menghasilkan peroksinitrit (ONOO⁻) dan reaktif oksigen spesies yang merupakan oksidan yang sangat poten (Faraci, 2003; Ungvari *et al*, 2003)

Stess oksidatif dan aktivasi sitokin proinflamasi pada pembuluh darah seperti TNF α menyebabkan peningkatan regulasi NAD(P)H oxidase dan stress nitrosative serta penurunan bioavailabilitas NO. Faktor ini dapat menginduksi perubahan profil ekspresi gen pada endotel dan otot polos pembuluh darah yang menyebabkan fenotipe proatherosklerotik pembuluh darah (disfungsi vasomotor, aktivasi endotel mengekspresikan molekul adhesi, proliferasi otot polos) sebagai proses atherogenesis (Ungvari *et al*, 2003)



3.6. Indirect ELISA

Model ini banyak digunakan di berbagai tingkatan laboratorium, karena bahan yang digunakan untuk uji ini sudah banyak dipasarkan dan mudah dibeli di pasaran. Model ini tidak memerlukan keahlian khusus untuk konjugasi hanya saja dari segi biaya sedikit lebih besar. Hal ini disebabkan karena model ini memerlukan konjugat fragmen immunoglobulin antiimmunoglobulin yang akan dideteksi. Misalnya yang akan dideteksi adalah IgG maka diperlukan konjugat fragmen immunoglobulin anti IgG. Hasil dari uji ini lebih spesifik dibandingkan dengan *direct* ELISA. Model ini sering digunakan secara rutin untuk diagnosa antigen maupun antibodi.



Gambar 2. Indirect ELISA (Rantam, 2003)

3.7. SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate–PolyAcrilamid Gel Electrophoresis)

Sodium Dodecyl Sulphate – Poly Acrilamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) adalah salah satu cara yang dapat digunakan untuk karakterisasi protein antigen berdasarkan berat molekul, atau disebut proses elektroforesis. Poly Acrilamide Gel Electrophoresis (PAGE) adalah merupakan metode pengujian standar terhadap berat molekul, struktur sub unit dan kemurnian protein. Pada SDS PAGE dielektroforesis dalam deterjen ionik yaitu Sodium Dodecyl Sulphate (SDS). Deterjen ini akan mengikat residu hidropik dari bagian belakang peptide salah satu dari setiap asam amino. Sehingga dapat membuka rantai peptide secara komplit dengan demikian

protein SDS kompleks migrasi melalui Poly Acrilamide tergantung dari berat molekulnya (Rantam, 2003)

Prinsip dasar dari metode ini adalah denaturasi protein oleh Sodium Dodecyl Sulphate dilanjutkan dengan separasi protein berdasarkan berat molekulnya dengan metode electrophoresis menggunakan gel, dalam hal ini gel yang digunakan adalah gel Poly Acrilamide. Poly Acrilamide merupakan matrik pilihan untuk memisahkan protein yang mempunyai berat molekul antara 500 – 250.000 Da. Gel Poly Acrilamide dibentuk melalui terbentuknya ikatan silang antara Poly Acrylamide. Rantai ini terbentuk dari polimerasi monomer Acrilamid $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ menjadi rantai Poly Acrilamid yang panjang. Polimerasi yang terjadi dikatalis oleh Ammonium persulphate (APS) yang didalam larutan terbentuk radikal bebas. Sesudah diaktifkan oleh radikal bebas, Acrilamid bereaksi dengan Acrilamid yang lainnya untuk membentuk suatu rantai polimer yang panjang (Sutiman, dkk, 1996)

Ada dua system dalam SDS yaitu kontinyu (Weber dan Osborn) dan diskontinyu (Laemmli). Pada system kontinyu menggunakan densitas satu gel, satu buffer dan satu pH dimana campuran protein dilapiskan pada lapisan atas (bands pada bagian atas dari separating gel) sehingga kelemahan dalam system ini akan terjadi resolusi dengan sampel. Pada system diskontinu menggunakan densitas gel berbeda, buffer dan pH berbeda dalam gel yang sama dimana PAGE diskontinu dilakukan dengan dua jenis gel yaitu stacking dan separating. Stacking gel mengandung poli Akrilamid yang lebih rendah dan pH yang berbeda dengan separating gel. Pada stacking gel, molekul bermuatan dapat bergerak bebas dibawah pengaruh muatan listrik sedangkan molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang berdekatan membentuk suatu garis berupa pita atau band yang tipis (Sutiman, dkk, 1996)

3.8. Western Blot

Antibodi yang digunakan untuk Western Blot harus mempunyai spesifitas tinggi dan daya ikat yang stabil. Antibodi poliklonal sering digunakan untuk blotting karena mempunyai afinitas yang tinggi terhadap antigen. Antibodi poliklonal tersebut dapat diperoleh melalui penyuntikan protein antigen pada kelinci yang selanjutnya akan digunakan untuk immunoblotting. Immunoblotting adalah suatu cara untuk

mengembangkan deteksi protein dalam gel diawali dengan penelitian antibodi sebagai sampel dalam gel. Teknik dikuasai dengan cara inkubasi yang intensif dan pencucian. Langkah selanjutnya adalah transfer protein dari gel ke membrane nitroselulose setelah direaksikan dengan substrat, pencucian dan pereaksian dengan antibodi dapat disimpan selama beberapa bulan. Selain itu juga dengan metode ini mudah dilakukan pengecatan protein, *autoradiography*, *calorimetric* pada uji enzim dan *ligand binding assay* (Rantam, 2003).

Imunoblotting yang digunakan pada penelitian ini adalah Western Blot, karena yang ditransfer pada metode ini adalah protein. Protein blotting merupakan suatu metode yang umum digunakan untuk mentransfer protein dari Poly Acrilamid Gel Elektroforesis (SDS- PAGE) ke membrane nitroselulose (Kresna, 2001).

Menurut Artama (1991), pada imunoblotting biasanya matriks nitroselulosa yang masih reaktif, terlebih dahulu diblok untuk menghindari reaksi yang tidak spesifik. Sehingga didapatkan hasil transfer yang kontras dan band yang jelas. Membrane nitroselulosa merupakan membrane yang paling sering digunakan, karena mudah dan relative murah.

Singkatnya pada *Western Blot* tahap pertama dilakukan pemisahan protein dengan SDS-PAGE dan selanjutnya ditransfer ke membrane selulose yang sesuai dan akhirnya dilabel dengan antibodi dan divisualisasikan dengan pewarnaan yang diinginkan seperti *Fast Red* atau *Commasie Blue*. Pada proses transfer protein, protein dapat secara langsung ditransfer ke membrane nitroselulose menggunakan alat model Bio-Rad yang konvensional yang memakan waktu 24 jam dan ada yang baru dengan menggunakan *semidry blotting* (Biometra) dengan memakan waktu satu jam tiga puluh menit. Tetapi kebanyakan transfer protein dari gel ke membrane nitrosellulose dilakukan dengan teknik elektroforesis. Transfer *buffer* harus mengandung *ionic* yang rendah tanpa menggunakan elektroforesis yang tinggi arusnya. Metanol pada proses ini sering ditambahkan ke buffer untuk meningkatkan ikatan protein nitrosellulose dan mengurangi pembengkakan gel selama transfer, sehingga mengurangi elusi. Pada protein yang mempunyai berat molekul tinggi biasanya efektif jika dilakukan dengan waktu yang cukup lama sekitar 12 jam. Membran yang digunakan untuk transfer protein mungkin yang paling banyak digunakan adalah nitrosellulose karena mudah digunakan dan mempunyai kapasitas ikatan yang tinggi. Membran nitrosellulose yang baru tahan terhadap aliran yang tinggi dan tidak mudah rapuh. Metode Western Blot

sangat efektif digunakan untuk mendeteksi antigen yang mempunyai ukuran kecil dalam larutan yang banyak mengandung protein. Antibodi yang digunakan harus mempunyai spesififikasi tinggi dan mempunyai daya ikat yang stabil (10^8 - $10^{10} M^{-1}$). Dengan demikian antibodi yang mempunyai daya ikat rendah lebih baik dikerjakan dengan immunopresipitasi pada gel agar. Namun demikian pada protein yang spesifikasinya rendah jika dilakukan transfer dengan SDS akan menolong protein terhadap antibodi. Hal ini disebabkan kemungkinan terjadi fragmentasi protein, sehingga antibodi mengenali epitop. Antibodi poliklonal sering digunakan karena mempunyai afinitas tinggi terhadap antigen, tetapi mengandung antibodi yang non spesifik berikatan dengan antigen yang tidak spesifik yang merupakan bagian dari mikrobial. Oleh karena itu antibodi poliklonal sering dilakukan purifikasi terlebih dahulu (Rantam, 2003).

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan memakai rancangan acak lengkap

4.2. Sampel dan Besar Sampel

Dalam penelitian ini digunakan binatang percobaan tikus jantan umur 3 bulan, sehat dengan berat tubuh sekitar 200 gram. Besar sampel untuk setiap perlakuan ditentukan dengan rumus $(n-1)(r-1) > 15$

4.3. Variabel Penelitian

A. Variabel bebas

Dalam penelitian ini digunakan dua variabel bebas

- Pemberian Stressor elektrik shock (rejatan listrik) selama 14 hari
- Pemberian emulsi Vitamin E

B. Variabel kendali

Dalam penelitian ini digunakan beberapa variabel kendali yaitu :

- Tikus yang digunakan berjenis kelamin jantan
- Digunakan tikus dengan berat badan yang seragam
- Kandang dibuat dengan kondisi sama

C. Variabel tergantung

- Pengukuran kadar Superoxide.
- Pengukuran kadar TNF alfa
- Ekspresi protein TNF alfa dengan SDS-PAGE dan Western Blot

4.4. Bahan dan Instrumen Penelitian

4.4.1. Hewan Percobaan

Dalam penelitian ini digunakan tikus jantan umur 3 bulan sehat berat badan sekitar 200 gram.

4.4.2. Bahan Pakan dan Minum

Pakan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pakan standar berupa pakan ayam jadi berbentuk pellet diberikan secara ad libitum. Air minum yang digunakan adalah air bersih dari PDAM Surabaya yang diberikan secara ad libitum.

4.4.3. Bahan Kimia

Vitamin E, CMC Na, Aquadest, Aquabidest, NBT, HBSS, Simoxan, SOD, NaCl 0,9 %, Tween 20, Carbonate buffer, Creamer 4 %, PBS, Antibodi poliklonal TNF alfa, Konjugat anti rat, Substrat, NaOH 3 N, Acrylamide, Tris HCl pH 8,8 SDS 5 %, temed, APS, Butanol, Blue juice methanol 50 % dan Acetic Acid 7,5 %, Glutaraldehyde 10 %, Kromasi blue, Formaldehyde 3,7 %, Zitrochsaune, Asam asetat 10%, Gliserol 10%.

4.4.4. Instrumen

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Kandang tikus, alat stresor, sonde lambung, spuit 5 ml, neraca analitik, plate mikrotiter, microplate, rider, sentrifuge, ELISA reader, alat elektroforesis, fasblot, kertas whatmann.

4.5. Prosedur Penelitian

A. Tahap Persiapan

Pada tahap persiapan, hewan coba diadaptasikan dengan kondisi lingkungan , pakan dan minum ad libitum selama 1 minggu.

B. Tahap Perlakuan

Seluruh hewan percobaan dibagi secara acak dalam 3 kelompok . Masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor tikus. Emulsi vitamin E diberikan secara oral dengan menggunakan sonde lambung sehari sekali pada pagi hari sebelum pemberian pakan dan 15 menit sebelum diberi stresor selama 14 hari . Stresor diberikan dengan elektrik shock (rejatan listrik) selama 14 hari. Perincian mengenai perlakuan terhadap masing-masing kelompok adalah sebagai berikut :

Po1 : Kontrol negatif yaitu kelompok tikus yang hanya diberi perlakuan pelarut obat
3 ml

Po2 : Kontrol positif yaitu kelompok tikus yang diberi stressor elektrik shock (rejan listrik) selama 14 hari dan pelarut obat 3 ml

P1 : Kelompok tikus yang diberi stressor elektrik shock (rejan listrik) selama 14 hari dan emulsi vitamin E dosis 400 IU 3ml

C. Model Pemberian Stresor

1. Listrik 5-30mA (rerata 18 mA)
2. Arus listrik 5,0-30,0mA
3. Tegangan 220Volt
4. Frekuensi 60Hz

Pemberian rejan : Sekali rejan dengan interval 4 menit untuk setiap sesi.

Hari ke-1	4 rejan :	2 sesi
Hari ke-2	8 rejan :	2 sesi
Hari ke-3	10 rejan:	3 sesi
Hari ke-4	12 rejan :	3 sesi
Hari ke-5	14 rejan :	4 sesi
Hari ke-6	16 rejan :	4 sesi
Hari ke-7	18 rejan :	5 sesi
Hari ke-8	20 rejan :	5 sesi
Hari ke-9	22 rejan :	6 sesi
Hari ke-10	24 rejan :	6 sesi
Hari ke-11	26 rejan :	7 sesi
Hari ke-12	28 rejan :	7 sesi
Hari ke-13	30 rejan :	8 sesi
Hari ke-14	32 rejan :	8 sesi

D. Pembuatan Bentuk Sediaan Emulsi Vitamin E

Kalibrasi botol sesuai volume yang diinginkan kemudian timbang CMC Na dan Vitamin E sesuai dosis yang dibutuhkan. Mucilago CMC Na dibuat dengan cara CMC Na di tempatkan pada cawan uap di tambah air panas secukupnya, kemudian diaduk sampai homogen (sampai tidak ada warna putih). Mucilago CMC Na ditambah Vitamin E dimasukkan pada mortir gerus sampai homogen dan tambahkan air sedikit demi sedikit sambil di gerus satu arah setelah homogen dimasukkan ke dalam botol.

Aquadest ditambahkan sampai batas tanda botol yang telah dikalibrasi dan di kocok sampai homogen lalu diberi etiket.

E. Persiapan Sampel Serum

Sebelum pengambilan darah, hewan coba dipuaskan terlebih dahulu selama 12 jam tetapi air minum tetap diberikan, kemudian dianestesi dengan eter dan selanjutnya darah diambil dengan cara intra cardial sebanyak 6 ml, darah didiamkan selama setengah jam. Dipindahkan dalam tabung sentrifuge dan disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum darah diambil kemudian dimasukkan dalam vial. Simpan dingin sebelum dilakukan percobaan selanjutnya yaitu pemeriksaan superoxide (O_2^-) dan TNF α serta untuk whole protein (analisis protein dan identifikasi protein TNF α)

F. Ekstraksi Protein dari Serum

Satu bagian serum dengan empat bagian etanol absolute dicampur, kemudian digoyang secara perlahan. Kemudian dimasukkan ke dalam revigerator selama 1 jam. Setelah itu sentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit dengan suhu $10^\circ C$ dan diambil endapannya kemudian diencerkan dengan PBS sebanyak 0,5 ml. Dihomogenkan dengan resuspensi. Dimasukkan ke dalam kantung selophen. Siap didialysis (PBS 500 ml, NaCl 40 g, KCl 1 g, Na_2HPO_4 5,75 g, KH_2PO_4 1 g, Aquades) kantong selophen dimasukkan kedalam PBS 0,5 X diputar semalam pada ruang dingin.

G. Pemeriksaan Superoxide

Mikroplate U disiapkan dan tempat sampel yang akan dimasukkan ditandai. Pengenceran p-Nitro Blue Tetrazolium Chlorida (NBT) sebanyak 2 mg/ml dalam HBSS bebas fenol red 0,9 %. Ditambahkan pengenceran Superoxide Dismutase (SOD) sebanyak 200 $\mu g/ml$ ke dalam larutan HBSS bebas fenol red 0,9 % lalu sampel 100 μl dimasukkan ke dalam sumur mikroplate kemudian 100 μl Simoxan 150 $\mu g/ml$ dimasukkan pada tiap sumuran yang terisi sampel, selanjutnya SOD 100 μl dimasukkan pada tiap sumuran yang sudah terisi sampel diinkubasikan selama 10 menit. Terakhir 100 μl NBT dimasukkan pada setiap sumuran yang sudah terisi sampel. Mikroplate ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar.

Langkah terakhir dilakukan pembacaan hasil menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 450 nm dan akan diperoleh data nilai *Optical Density* (OD) dari kadar Superoxide.

H. Pengukuran Kadar TNF α dengan *Indirect ELISA*

Coating Antigen : Pertama – tama sampel serum diencerkan dalam *carbonate buffer* 1:100, lalu dimasukkan dalam tiap sumuran sebanyak 100 ul ditutup dengan alumunium foil, inkubasi dalam lemari es pada suhu 4°C selama semalam (kurang lebih 18 jam), selanjutnya dicuci dengan NaCl 0,9 % – Tween 20 0,05 % sebanyak 3 kali. Blocking : Dimasukkan buffer blocking (Creamer 4 % dalam PBS) sebanyak 100 ul pada setiap sumuran dan ditutup dengan plastik, inkubasi pada suhu 37°C pada inkubator selama satu jam dan dicuci dengan dengan NaCl–tween 20 sebanyak tiga kali. Inkubasi Antibodi. Antibodi TNF α yang sudah diencerkan dengan blocking buffer 1 : 100 dimasukkan pada tiap sumuran sebanyak 100 ul ditutup dengan plastik dan diinkubasi selama satu jam pada suhu 37°C pada inkubator lalu dicuci dengan Na Cl-Tween 20 sebanyak 3 kali. Inkubasi konjugat : Dimasukkan konjugat anti rabet yang telah diencerkan dengan blocking buffer 1 : 2500 kedalam tiap sumuran sebanyak 100 ul, tutup dengan alumunium foil dan inkubasi selama satu jam pada suhu 37 °C pada inkubator kemudian dicuci dengan NaCl-Tween 20 sebanyak tiga kali. Inkubasi subtract: Ditambahkan subtrat OPD (1 ml OPD + 9 ml Citrat Phosphat + 10 ul H₂O₂ sebanyak 100 ul pada tiap sumuran, tutup dengan alumunium foil kemudian diamkan selama 30 menit pada suhu kamar diruang gelap, ditambahkan NaOH 3 N sebanyak 50 ul pada tiap lubang untuk menghentikan reaksi. Langkah terakhir dilakukan pembacaan hasil dengan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 405 nm dan akan diperoleh data nilai *Optical Density* (OD) dari kadar TNF α .

I. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphonat Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)

Menyiapkan gel casset (*running gel*) 12 % . Acrylamide 2,5 ml , Tris H Cl pH 8,8 1,2 ml SDS 5 % 1,2 ml . Aquadest 1,1 ml, temed 5,0 ul, APS 30 ul dimasukkan dalam beaker glass diaduk cepat dan dimasukkan dalam gel cassette lewat dinding sampai kira-kira 1 cm dari atas, kemudian permukaan (gelembung) diratakan dengan Butanol. Butanol dibuang dengan menyemprotkan aquades atau dengan tissue. Membuat stacking gel 3%, Acrylamide 0,66 ml , Tris H Cl pH 8,8 0,8 ml SDS 5 % 0,8

ml, Aquadest 0,8 ml, temed 0,4 ul, APS 20 ul dimasukkan dalam beaker glass diaduk cepat dan dituang ke dalam gel cassette kemudian dipasang comb ditunggu 25 menit kemudian comb dilepas. Gel cassette dipasang pada alat elektroforesis, dituangkan elektroda buffer dalam bak (chamber) hingga terendam. Sampel dimasukkan pada sumur-sumur (100 ul sampel + Blue juice) rebus 2 menit. Ranning dengan 125 V, 40 mA selama 1,5 jam sampai turun kebawah lalu alat dimatikan, gel diambil dan diletakkan pada petridish dan dilakukan pencucian. Pencucian I dengan menggunakan methanol 50 % dan Acetic Acid 7,5 %, digoyang selama 30 menit dan kemudian larutan dibuang. Pencucian II menggunakan methanol 50 % dan Acetic acid 7,5 % digoyang selama 30 Menit. Pencucian III menggunakan Glutaraldehyde 10 % digoyang 30 menit. Pencucian IV menggunakan aquadest 100 cc selama 30 menit dan dibuang, diulangi sampai 3 kali. Gel dimasukkan dalam pewarnaan kromasi blue 0,1 gram dalam 100 cc larutan, digoyang-goyang selama 1 jam, dicuci dengan aquadest 10 ml hingga 2 kali setelah itu diberi pengembang warna Formaldehyde 3,7 % 50 ul, aquadest 100 ul dan Zitrochsaune 100 ml ditunggu 5 menit. Reaksi pengembang warna pada gel dihentikan dengan asam asetat 10% sehingga terendam dan digoyang. Hasil gel yang tampak pita-pitanya disimpan dalam larutan gliserol 10% siap untuk dibaca/didokumentasikan.

J. Western Blot

Gel yang mengandung fragmen protein yang terpisah berdasarkan berat protein dilepas dari glass plate kemudian dibuat buffer transblot 3 L (tris Hidroxymethyl aminometan 15g, glysin 72 g, methanol 1000 ml aquadest ad 5000 ml pada pH 8,3). Setelah itu disusun lima kertas whatmann yang dipotong dengan ukuran 10 x 12 cm dibasahi dengan buffer transblot. Gel diletakkan diatas kertas whatmann dan diratakan sehingga tidak ada udara dibawah gel. Lima potong kertas whatmann diletakkan diatas membrane nitrooselulose yang dibasahi dengan buffer transblot. Fasblot ditutup dan dinyalakan dengan 250 mA, 125 Volt selama 1 jam.

K. Semi Dry Blotting.

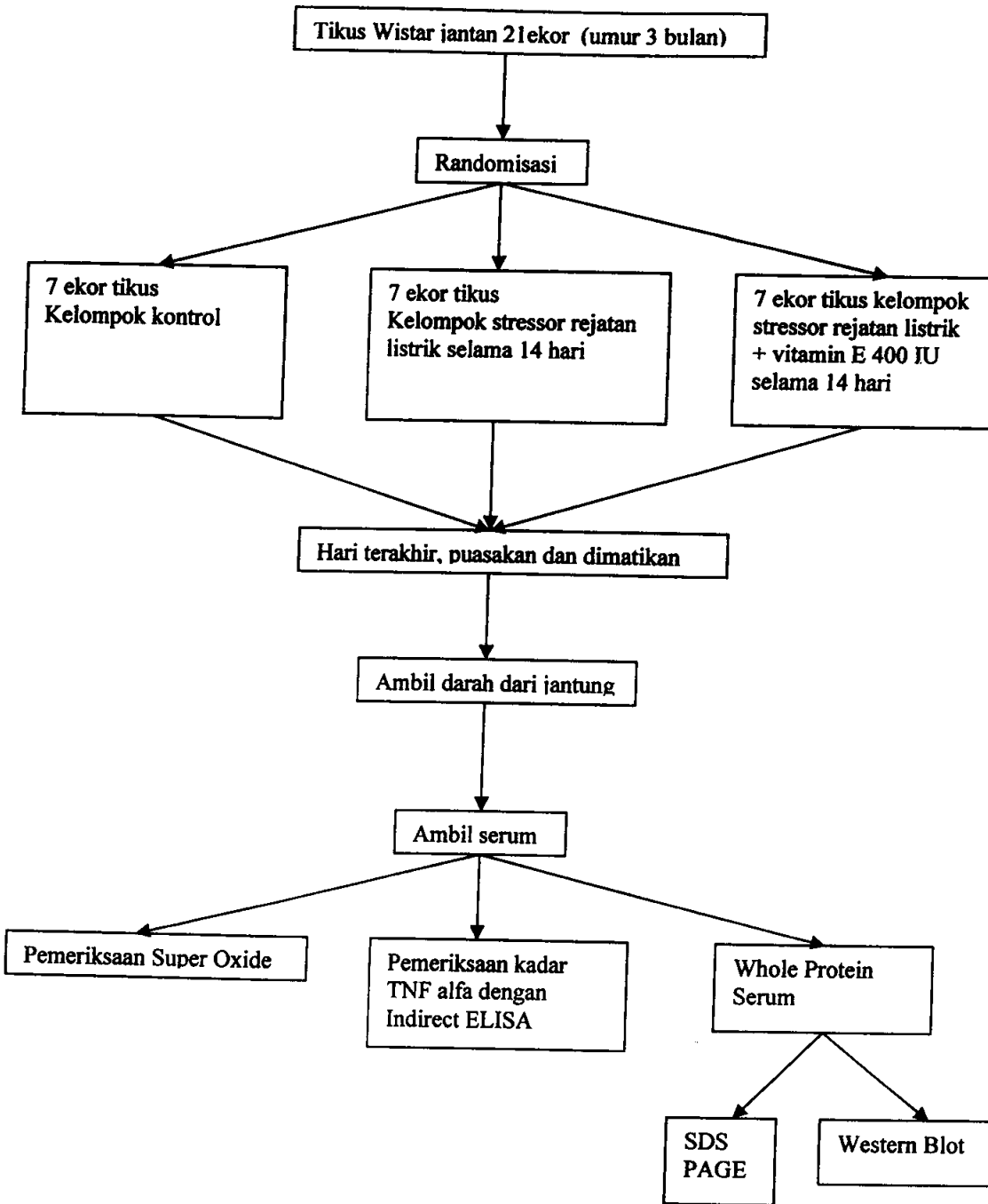
Kertas whatmann dikeluarkan dari fasblot, lalu dicuci dengan washing buffer (PBS-tween 20 atau NaCl-tween 20 sebanyak 10 ml, dicuci 3 kali selama 10 menit goyang dengan shaker. Membran nitrooselulose diblokir dengan BSA 2 % (BSA 2 mg

+ 100 ml PBS pH 7,2) dan digoyang dengan shaker lalu diinkubasikan selama 1 jam. Setelah itu dicuci dengan washing buffer (PBS-tween 20) sebanyak 10 ml dicuci 3 kali selama 10 menit dan digoyang dengan shaker kemudian direaksikan dengan antibodi pertama dengan pengenceran 1:200,1:100 atau 1:10. Washing buffer : Tween 20 1 % (1 ml) + PBS 99 ml , Ph 7,2 digoyang dengan shaker 10 menit dan diinkubasikan selama 3-18 jam. Selanjutnya dicuci dengan washing buffer (NaCl-tween 20) tiga kali selama 10 menit lalu direaksikan dengan antibodi kedua (konjugat) dengan pengenceran 1;1000 atau 1:1500 dalam buffer konjugate (0,05 tris HCl pH 8 90 ml, Tween 20 1 %) 10 ml selama 1 jam, kemudian dicuci dengan washing buffer (tween 20 1 % + NaCl 90 ml) tiga kali selama 10 menit. Divisualisasi dengan pewarnaan Subtrat fast red 6 mg/l + buffer subtrat, buffer subtrat : 0,2 M tris HCl pH 8 + 2 M MgCl₂ 90 ml + aquadest 10 ml dan digoyang dengan shaker secara horizontal sampai timbul warna, jika warna sudah kuat maka dihentikan dengan mengangkat membran, lalu dikeringkan dengan udara. Membran nitroselulose yang terlihat band sebagai dokumen dan siap didokumentasikan.

4.6. Analisis Statistik

Hasil penelitian yaitu *optical density* (OD) dari superoxide dan TNF α dianalisis menggunakan uji ANOVA dan bila terdapat perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji LSD. Analisis protein dan ekspresi protein TNF α dengan penentuan massa molekul relative protein (Mr) yang dilanjutkan dengan menghitung mobilitas relative (Rf), selanjutnya dibuat kurva standar melalui model regresi korelasi untuk menganalisis berat molekul dan identifikasi molekul TNF α .





Gambar 3. Skema Alur Penelitian

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1. Superoxide

Hasil penelitian yang dilakukan dengan menggunakan 21 ekor tikus jantan yang terbagi dalam tiga kelompok perlakuan, didapatkan hasil nilai *optical density* (OD) dari pemeriksaan kadar superoxide sebagai berikut :

Tabel 1 Nilai *Optical Density* (OD) Superoxide

No	P0	P1	P2
1.	0,1070	0,1640	0,1175
2.	0,1145	0,1575	0,1310
3.	0,1105	0,1455	0,1175
4.	0,1110	0,1525	0,0745
5.	0,1225	0,1415	0,1200
6.	0,1170	0,1225	0,1580
7.	0,1150	0,1325	0,1235
Jumlah	0,7975	1,0160	0,8420
Rata-rata \pm SD	0,1139 ^a \pm 0,0504	0,1451 ^b \pm 0,0144	0,1203 ^a \pm 0,0246

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata pada ($p < 0,05$)

P0 : Kontrol

P1 : Kontrol Stressor

P2 : Stressor + emulsi Vitamin E dosis 400 IU

Berdasarkan data hasil penelitian nilai *optical density* kadar superoxide dengan pembacaan pada ELISA reader yang diperoleh, kemudian dianalisis dengan menggunakan ANOVA didapatkan F hitung lebih besar dari F tabel. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Kemudian dilanjutkan dengan uji LSD dengan taraf signifikansi 5% didapatkan bahwa perlakuan P0 (kontrol) memiliki kadar superoxide yang terendah yang berbeda nyata dengan kelompok P1 (stressor) $p < 0,05$ sedangkan dengan perlakuan P2 (stressor + Vitamin E) tidak berbeda nyata $p > 0,05$. Hasil penelitian ini bisa dijelaskan bahwa adanya perbedaan pada kelompok P0 (kontrol) dengan kelompok P1 (kontrol stressor) yang

ditunjukkan dengan hasil nilai *optical density*nya disebabkan karena pada keadaan stress baik yang disebabkan oleh latihan fisik yang berlebihan atau stress emosional dapat menyebabkan *sympatoadrenal discharge*, yang ditunjukkan dengan peningkatan kadar noradrenalin dan adrenalin yang sangat tinggi (Kestin *et al.*, 1993). Hasil penelitian Sozmen *et al* 1998 juga menjelaskan bahwa katekolamine (noradrenalin dan adrenalin) sebagai sumber yang sangat penting dalam pembentukan radikal bebas oksigen yaitu dengan cara autooksidasi dalam reaksi yang sangat kompleks. Adanya perbedaan pada kelompok kontrol dan kelompok stressor pada kadar superoxide sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan Maslachah, 2000 bahwa pada tikus yang diberi stressor dengan *swimming stress* dapat meningkatkan kadar Malondialdehyde (MDA) serta dapat meningkatkan "*Circulaing endothel* " Hal ini menunjukkan bahwa pada pemberian stressor dengan elektrik shock (rejatan listrik) meningkatkan produksi radikal superoxide mempunyai efek sitotoksik yang akan menyebabkan peroksidasi membrane phospholipid sehingga akan meningkatkan malondialdehyde sebagai hasil peroksidasi lipid dan kerusakan jaringan serta menyebabkan disfungsi sel endotel yang ditunjukkan dengan peningkatan pelepasan endotel pada sirkulasi. Stress juga diketahui akan dapat mengurangi efektifitas pemanfaatan antioksidan didalam tubuh sehingga menyebabkan ketidakseimbangan antara pembentukan radikal bebas dengan system scavenger akan timbul suatu keadaan yang disebut stres oksidatif dan hal ini dapat menyebabkan kerusakan sel.

Adanya disfungsi sel endotel dapat mengganggu keseimbangan antara faktor relaksasi dan kontraksi dari otot polos pembuluh darah. Gangguan pada endotel untuk melepaskan mediator vasodilatasi (NO) dapat disebabkan karena penurunan pembentukan, peningkatan degradasi, dan penurunan sensitivitasnya untuk membentuk NO. Adanya gangguan keseimbangan produksi NO dan peningkatan produksi radikal bebas seperti superoksid akan menyebabkan gangguan pada spasme pembuluh darah. Superoksid dapat menginaktivasi NO dan menghambat sintesis prostasiklin sehingga dapat mengganggu keseimbangan antara faktor relaksasi dan kontraksi yang dilepaskan dari endotel sehingga dapat menyebabkan spasme arterial (Sozmen *et al.*, 1998). Hal ini menunjukkan bahwa endotel mempunyai peran yang sangat penting sebagai pengatur vaskuler, sebagai target dari peningkatan tekanan darah. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Baumann, *et al* (1973) menunjukkan bahwa pemberian

stress fisik pada orang normal dan hipertensi dapat meningkatkan tekanan darah baik systole maupun diastole.

Adanya peningkatan radikal superoxide pada tikus yang menerima stressor akan dapat mengganggu relaksasi yang tergantung endotel melalui inaktivasi *endothelium derived nitric oxide* yang akan mengakibatkan penurunan sintesis NO karena penurunan aktivitas ekspresi dari *endothelium Nitric Oxide Synthase* (eNOS). Mekanisme penurunan sintesis NO disebabkan karena penurunan aktivitas dan ekspresi eNOS, penurunan sensitivitas otot polos pembuluh darah pada NO dan peningkatan degradasi NO oleh reaktif oksigen spesies superoxide yang mekanisme semuanya ini memainkan peran penting pada penurunan sintesis NO pada atherosklerosis dan hiperkolesteolemia (Kawashima, 2004).

Peningkatan produksi superoxide dapat meningkatkan degradasi NO untuk menurunkan sintesis NO. Degradasi NO oleh superoksid merupakan mekanisme penting gangguan pada relaksasi yang tergantung endotel. Hasil penelitian yang lain juga menjelaskan bahwa fungsi endothel berhubungan dengan bioaktivitas dari NO yang tergantung interaksinya dengan Reaktif Oksigen Spesies (ROS) khususnya superoxide. Reaksi NO dengan superoxide akan dihasilkan peroxynitrit (ONOO^-) yang merupakan reaktif nitrogen spesies. Peroksinitrit ini akan mengganggu fungsi endothel yang menyebabkan penurunan aktivitas eNOS. Reaksi dengan superoxide dapat menurunkan bioavailabilitas NO, gangguan fungsi vasomotor, peningkatan agregasi platelet dan peningkatan adhesi monosit dan leukosit pada endotel, proliferasi otot polos (Faraci 2003, Muzaffar 2003, Ungvari 2003, Kawashima, 2004). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Nicholas (2004) menunjukkan interaksi antara NO dan superoxide pada penelitian *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan menghasilkan peroksinitrit yang dapat mengoksidasi BH4 yang merupakan kovaktor esensial untuk semua NO sintase dalam waktu singkat (menit) yang menimbulkan efek langsung pada aktivitas eNOS dan disfungsi endotel.

Pada hasil penelitian adanya perbedaan pada kelompok P1 (kontrol stressor) dengan kelompok P2 (stressor + emulsi vitamin E) dapat dijelaskan bahwa pemberian vitamin E pada tikus yang diberi stressor dengan elektrik shock (rejatan listrik) dapat menurunkan produksi radikal superoxide hal ini disebabkan karena vitamin E mempunyai potensi sebagai antioksidan pemutus rantai pada membran yang dapat mencegah kerusakan sel oleh peroksidasi lipid dan menghambat pembentukan radikal

bebas. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Barbara *et al*, 1999 bahwa pemberian antioksidan vitamin E dapat menurunkan akumulasi LDL secara nyata dari 3.25 ± 0.53 ng/menit / cm^2 menjadi $2.73 \pm 0,71$ ng/menit / cm^2 . Disamping itu efektifitas vitamin E dalam mengikat atau bereaksi dengan radikal oksigen lebih cepat 5×10^4 kali dari pada dengan PUFA (*Poly Unsaturated Fatty Acid*) sehingga vitamin E efektif sebagai antioksidan membran dalam menghambat outooksidasi PUFA yang mengandung lipid seperti fosfolipid. Efektivitas Vitamin E dalam mencegah oksidatif stress juga ditunjukkan oleh hasil penelitian yang dilakukan Acker, 2003 terhadap indikator stress oksidatif seperti pengukuran kerusakan DNA, Creatine Kinase (CK) *Thiobarbituric Acid Reacting Substance* (TBARS/ MDA) dan Conjugate Dienes (CD) bahwa pemberian vitamin E dosis 400 IU Selma 48 hari dapat menurunkan CK dan membantu menurunkan kerusakan otot oleh radikal bebas, produksi MDA menurun pada subyek yang mengkonsumsi 1200 mg vitamin E selama 14 hari akibat kelelahan (Stress fisik), juga adanya penurunan kerusakan DNA pada sel darah putih akibat kelelahan. Vitamin E juga dapat menurunkan produksi pentane dan produk peroksidasi dari mitokondria.

Tidak adanya perbedaan pada kelompok P0 (kontrol) dengan Kelompok P2 (stressor + emulsi Vitamin E) menunjukkan bahwa vitamin E mampu menghambat produksi radikal superoxide pada tikus yang menerima stressor seperti pada kelompok kontrol karena kemampuannya dalam memutus reaksi berantai pada tikus yang menerima stressor sehingga pembentukan radikal superoxide dihambat.

5.2. TNF α

Hasil penelitian yang dilakukan dengan menggunakan 21 ekor tikus jantan yang terbagi dalam tiga kelompok perlakuan, didapatkan hasil nilai *optical density* (OD) dari pemeriksaan kadar TNF α sebagai berikut:

Tabel 2. Nilai OD *Optical Density* (OD) TNF α

No.	P0	P1	P2
1.	1,281	1,187	1,332
2.	1,184	1,225	1,224
3.	1,160	1,302	1,209
4.	1,173	1,189	1,066
5.	1,0590	1,241	1,164
6.	1,2010	1,266	1,163
7.	1,1270	1,253	1,215
Jumlah	8,1851	8,663	8,373
Rata-rata \pm SD	1,1693 ^a \pm 0,0681	1,2376 ^a \pm 0,0414	1,1961 ^a \pm 0,0804

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata pada ($p < 0,05$)

P0 : Kontrol

P1 : Kontrol Stressor

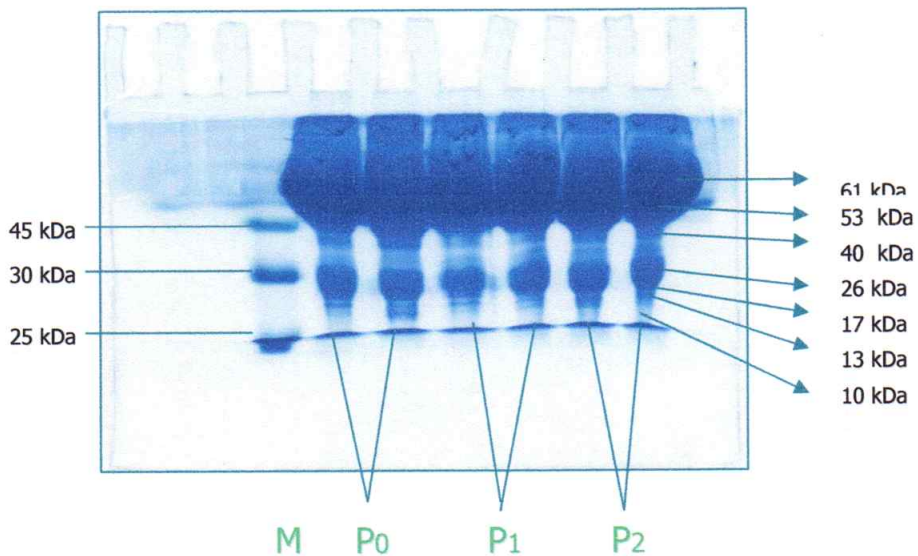
P2 : Stressor + emulsi Vitamin E dosis 400 IU

Berdasarkan data hasil penelitian nilai *optical density* kadar TNF α dengan pembacaan pada ELISA reader yang diperoleh, kemudian dianalisis dengan menggunakan ANOVA didapatkan F hitung lebih kecil dari F tabel. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan P0, P1 dan P2 ($p > 0,05$).

Meskipun tidak adanya pengaruh secara statistik pada nilai *optical density* kadar TNF α , tetapi jika dilihat dari hasil rata – rata *optical density* pada kelompok P0 (kontrol) dan kelompok P2 (stressor + emulsi Vitamin E) menunjukkan hasil rata-rata kadar TNF α yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok P1 (kontrol stressor). Hal ini bisa diduga bahwa perbedaan kadar TNF α sedikit diduga sudah dapat menyebabkan perubahan pada tingkat sel tetapi hasil ini masih membutuhkan penelitian lebih lanjut konsentrasi TNF α sampai berapa yang dapat menyebabkan pengaruh pada kerusakan tingkat sel. Hasil penelitian ini dapat dijelaskan oleh hasil penelitian yang dilakukan Maslachah, 2004 yang menunjukkan bahwa pada tikus yang menerima stressor memiliki ketebalan tunika media terbesar yang berbeda nyata

dengan semua kelompok perlakuan, perubahan pada gambaran histopatologis pada tunika media karena terjadi hipertropi dan proliferasi sel-sel otot polos yang membentuk penonjolan kearah lumen sehingga batas tunika intima dengan media tidak jelas. Adanya penebalan pada dinding pembuluh darah sangat berkaitan erat dengan kejadian atherosclerosis. TNF α merupakan sitokin proinflammatory yang dihasilkan dari makrofage dan berperan pada proses reaksi inflamasi yang berhubungan dengan proses terjadinya atherosclerosis termasuk peningkatan permeabilitas endotel, induksi molekul adhesi, kemotaksis dan diferensiasi monosit, mobilisasi phagositosis, peningkatan oksidasi LDL dan migrasi sel kedalam intima yang lebih lanjut sitokin proinflammatory akan meningkatkan proliferasi bermacam-macam type sel termasuk sel otot polos dan peningkatan produksi matrik ekstraseluler (Huber *et al* , 1999). Ditunjukkan pula pada hasil dari kadar superoxide yang menunjukkan perbedaan yang bermakna pada kelompok kontrol stressor, hal ini terkait dengan peran TNF α bahwa pada penelitian dengan kultur sel TNF α dapat cepat meningkatkan produksi reaktif oksigen spesies (ROS) dan menginaktivasi nitric oxide dan selanjutnya menghambat endothelium dependent relaksasi selain itu juga peningkatan produksi TNF α akan meningkatkan NAD(P)H Oxidase derived Superoxide pada kultur endotel dan otot polos pembuluh darah (Faraci, 2003; Ungvari, 2003). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Walsh (1999) pada kultur sel bahwa TNF α dapat sebagai mediator penting oksidasi LDL untuk memproduksi anion superoxide pada sel endotel dan sel otot polos yang direspon oleh TNF α . Pada penderita dengan gagal jantung TNF α dapat menghambat aktivasi nitric oxide sintase (eNOS) dengan cara mendegradasi eNOS mRNA melalui sintesi protein baru (Fichtlscherer *et al* , 2001, Jaimes *et al* , 2001) Selain itu adanya peningkatan kadar TNF α dalam serum menunjukkan korelasi terhadap apoptosis sel endotel dengan cara mengaktifasi signal cascade apoptosis pada sel endotel sehingga akan mempengaruhi fungsi ventricular dan remodeling (Fichtlscherer *et al* , 2001). Dijelaskan pula oleh Abas dan Lichtman (2003) Bahwa kadar TNF α dalam konsentrasi rendah dalam serum ($< 10^9$ M) dapat memberikan efek biologis berupa inflamasi lokal dengan adanya aktivasi leukosit sedang pada endotel akan terjadi adhesi molekul khemokin. Pada konsentrasi sedang akan memberikan efek sistemik berupa fever, peningkatan produksi leukosit pada sumsum tulang sedang pada konsentrasi tinggi akan menyebabkan septic shock.

5.3. Analisis Protein dengan SDS PAGE



Gambar 5. Hasil Analisis Protein dengan SDS PAGE

Pada gambar 5, menunjukkan bahwa dari hasil preparasi protein dari serum tikus pada semua kelompok perlakuan didapatkan pita-pita spesifik yang muncul yang menggambarkan protein dengan berat molekul (BM) berturut-turut dari atas kebawah adalah protein 61, 53, 40, 26, 17, 13, 10 kDa pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan kontrol stressor dan kelompok perlakuan stressor + emulsi vitamin E. Perhitungan berat molekul dari pita-pita protein yang terdapat pada membrane nitroselulose dilakukan dengan cara membandingkan dengan berat molekul dari marker (M) dan relative faktor (Rf) dengan rumus :

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan pita protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal}}$$

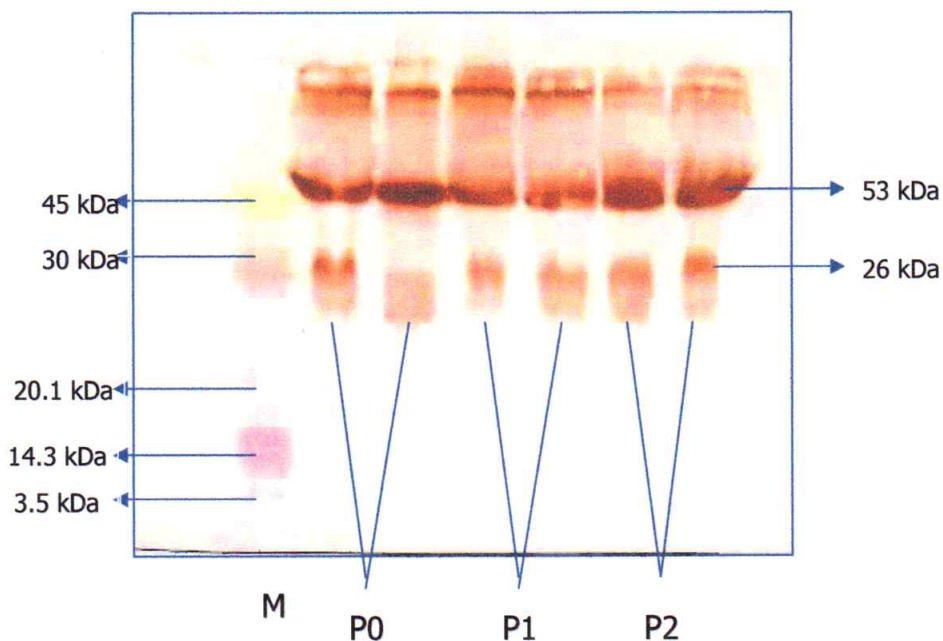
Marker protein yang digunakan berkisar antara 45 – 2,5 kDa. Berdasarkan perhitungan antara BM dan Rf dengan menggunakan regresi linier diperoleh persamaan $Y=2,9568-2,4563 X$ (Y = BM pita protein yang dicari, X = Rf pita protein yang dicari)

Pada gambar hasil terlihat bahwa profil protein dari *marker* lebih banyak dan lebih jelas hal ini dapat dijelaskan karena pada *marker* protein sudah spesifik pada

berat molekul yang sudah ditetapkan dan tidak ada protein lain. Sedangkan pada serum masih mengandung protein yang bermacam-macam sehingga pita-pita proteinnya kurang begitu jelas.

Menurut Abas dan Lichtman (2003) menyatakan bahwa berat molekul untuk TNF α adalah 51 dan 17 kDa. Anonimus (2002), menyatakan bahwa TNF α adalah sitokin dengan berat molekul sebesar 26 kDa. Pada hasil tampak bahwa terdapat bermacam –macam protein yang muncul. Berat protein 51 kDa pada hasil tidak didapatkan tetapi berat molekul protein 53 kDa yang dihasilkan dari perhitungan, hal ini sudah biasa terjadi selama range tidak begitu besar kesalahan ini dianggap wajar karena diduga disebabkan karena ketelitian dalam pengukuran sehingga perbedaan pengukuran yang kecil sudah dapat menyebabkan perbedaan hasil. Tetapi hasil 53 kDa sebenarnya merupakan berat molekul protein 51 kDa.

5.4. Identifikasi Protein TNF α dengan Western Blot



Gambar 6. Hasil Identifikasi Protein TNF α dengan Western Blot

Identifikasi protein TNF α menggunakan imunoblotting. Imunoblotting yang digunakan pada penelitian ini adalah Western Blot, karena yang ditransfer adalah

protein. Western Blot biasanya digunakan untuk menentukan kadar relative dari suatu protein dalam suatu campuran berbagai jenis atau molekul lain (Kresna, 2001). Pada Western Blot pita-pita protein pada SDS PAGE kemudian ditransfer pada membrane nitro selulose dan direaksikan dengan antibodi spesifik TNF α . Hasil penelitian Western Blot menunjukkan bahwa ada dua protein bereaksi secara spesifik dengan antibodi TNF α pada semua kelompok perlakuan yaitu berat molekul protein 26 kDa, 53 kDa. Hal ini dapat diartikan bahwa terjadi ikatan antara antigen dan antibodi sehingga dapat disimpulkan bahwa antibodi TNF α dapat berikatan dengan protein antigen dari serum pada semua kelompok perlakuan. Munculnya dua pita protein disebabkan karena TNF α merupakan bentuk protein polimorfisme yang mempunyai banyak sub unit tetapi pada hasil Western Blot molekul protein dengan berat 17 kDa tidak muncul, ini diduga pada waktu running, karena protein ini sangat tipis tidak bisa terlepas, atau antibodi yang digunakan hanya spesifik untuk sub unit 53 dan 26 kDa sehingga yang muncul pada hasil penelitian ini hanya molekul protein dengan berat 53 dan 26 kDa.

Pada gambar 6 menunjukkan ketebalan dari pita-pita protein pada semua kelompok (P0,P1,P2) menunjukkan tidak adanya perbedaan, hasil ini diperjelas dan didukung oleh hasil pengukuran kadar TNF α dengan indirect ELISA yang menunjukkan tidak ada perbedaan secara statistik sehingga dengan Western Blotpun akan menunjukkan hasil yang sama.

Antibodi yang digunakan pada penelitian ini adalah antibodi poliklonal, antibodi ini akan lebih banyak mengenal epitop yang merupakan bagian dari antigen, keuntungan antibodi poliklonal dibandingkan dengan antibodi monoklonal adalah lebih sensitive dalam mengenal antigen walaupun spesifitasnya lebih rendah (Tizard, 1982).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian stressor dapat meningkatkan produksi radikal superoxide (O_2^-) serum tikus putih
2. Pemberian Vitamin E dapat menurunkan produksi radikal superoxide (O_2^-) serum tikus putih yang menerima stressor.
3. Pemberian stressor dan kombinasi stressor dengan pemberian emulsi vitamin E tidak berpengaruh terhadap kadar TNF α serum tikus putih.
4. Pemberian stressor dan kombinasi stressor dengan pemberian emulsi vitamin E tidak berpengaruh terhadap ekspresi protein TNF α serum tikus putih.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh stressor yang dikombinasi dengan pemberian perlakuan yang lain (toksin, infeksi) terhadap kadar TNF α serum tikus putih dan ekspresi protein TNF α serum tikus putih.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh stressor yang dikombinasi dengan vitamin E terhadap kadar Nitric Oxide (NO)



DAFTAR PUSTAKA

Abas A.K and Lichtman A.H, 2003, Cellular and Molecular Immunology. 5th Edition, Saunders. Philadelphia

Acker S, Koymans L.M and Bast A. 2003. Molecular Pharmacology of Vitamin E:Structural Aspects of Antioxidant Activity. Ncbi.nlm.com

Alkharfy K.M, Kellin J.A and Matzke G.K, 2000. Unintended Immunomodulation. Part I. Effect of Common clinical Conditions on Cytokine Biosynthesis . shock. May. 13: 333-45

Alwi I,1996. Peran Triad lipid Pada Penyakit Jantung Koroner. Medika. Desember No.12 Thn.XXII. 932-973

Anonimus, 2002. Biochemicals and Reagents for Life Science Research. Sigma. Singapore. 2055 – 2056

Artama, W.T, 1991. Rekayasa Genetik. PAU Bioteknologi Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. 1-35

Atkinson R.L , 1993. Introduction To Psychology 8th Ed. Harcourt BraceJavanovich. Inc. 222-237

Bjorneboe A, G.E Bjorneboe and C.A Drevon. 1990. Absorbtion, Transport and Distribution of Vitamin E. In Critical Review. Prentice. Hall International Inc. Sydney

Barone F.C, 1992. Tumor Necrosis Factor & A Mediator of Focal Ischemic Brain Anjry. Stroke. 128: 1233-1244.

Coveli V. 1992. What Is Stress. How Does It Correlated With The Immune System. In Stress And The Immune System. Annals New York. Academy of Sciences. 212-215.

Eustigneeva R.P, Volkov I.M and Chudinova V.V. 2001. Vitamin E as a Universal Antioxidant And Stabilizer of Biological Membranes. Lomonosov Moscow Academy of Fine Chemical Technology. Moscow

Evan C.R and Bruckdorfer K.R, 1992. Free Radical, Lipoprotein And Cardiovascular Dysfunction. A.J.H. February. 8. Part 2.(5) : 28s-41s.

Elkind M.S, *et al* 2002 Tumor Necrosis Factor Receptor Levels are Associated with Corolid Atherosclerosis J : Stroke 33: 31-38.

Faraci F.M, *et al* (2003). Hyperhomocysteinemia A Million Ways to Lose Control & in Arteriosclerosis. Trombosis and Vascular, Biologi 23 : 371-373.

Fichtlscherer S, Rossig L, Breuer S and Vasa M, 2001. Tumor Necrosis Factor Antagonism with Etanercept Improves systemic Endothelial Vasoactivity in Patients With Edvanced Heart . Circulation104 : 3023-3025

Flavahan N.A and Vanhoutte P.M, 1995. Endothel Cell Signaling And Endothelial Dysfunction. *AJH*. February 8 2(5). 28s-41s

Godman and Gilman. 1991. *The Pharmacological Basic of Therapeutics*. 8th Ed Vol II. Pergomon Press. Inc. Singapura.

Huber S.A, Sakinen P, Conze D and hardin R, 1999. Interleukin Exacerbates Early Arteriosclerosis in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 19 : 2364-236

Jaimes E.A, Castillo D.D and Rutherford, 2001. Countervailing Influence of Tumor Necrosis Factor α and Nitric Oxide in Endotoxemia. *J. Am .Soc. Nephrol*. 12: 1204-1210

Kawashima S, 2004. Malfunction of Vascular Control in Lifestyle Related Diseases. Endothelial Nitric Oxide (NO) Synthase/NO system in atherosclerosis. *J. Pharmacol Sci* 96: 411-419

Kestin A.S, Ellis P.A and Barnard M.R, 1993. Effect of Strenuous Exercise On Platelet Activation State And Reactivity. *Circulation* 88(1): 1502-1511

Krisna S.B, 2001 *Imunologi. Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Fakultas kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta 657-73-76.

Maat S, 2003. Imonodefisiensi pada SIRS Sepsis . Pertemuan Tahunan Perhimpunan Patobiologi Indonesia. Surabaya. Januari. 25-26

Maslachah L. 2001 Pengaruh Antioksidan Probucol Terhadap Kadar Malondialdehyde (MDA) dalam Darah dan Jumlah Circulating Endothel pada Tikus yang Menerima Stressor. Thesis Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.

Maslachah L, 1999 Efek Perlindungan Disfungsi Sel Endothel Pembuluh Darah oleh Antioksidan Probucol Pada Tikus Yang Menerima Stressor. *Jurnal Kedokteran YARSI*

Maslachah L, 2003 Potensi Probucol Sebagai Antiaterogenik Pada Tikus Putih Yang Menerima Stressor. Penelitian Dosen Muda Universits Airlangga.

Muzaffar S, Jeremy, Angelin, Smith and Shukla, 2004. Role of Endothelium and Nitric Oxide synthases in Modulating Superoxide Formation Induced by Endotoxin and Cytokines in Porcine pulmonary arteries. *Thorax* 58: 598-604

Nicholas and Keith, 2004. Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Tetrahydrobiopterin in Vascular Disease. *Arterioscler thromb Vasc Biol*. 24 ; 413-420

Ratam.A.F., 2003. *Metode Imunologi*. Airlangga University Press Surabaya.

Reynolds J.E.F. 1993. *Martindale. The Extra Pharmacopeia*. 30th Ed. London. The Pharmaceutical Press 993

Riley, 1981. *Psychoneuriendrocrinology on Immono Compethence and Neoplasia Science*. 212,1100-1109.

- Roitt I, Brostoff J and Male D, 2001. Immunology. Sixth Edition. Mosby. Toronto
- Roberts RJ and Knight ME. 2001. Pharmacology of Vitamin E in The Newborn. University of Virginia Medical School. Charlottesville
- Sundy J.S. Patel D.D and Agnes B.H, 1999. Cytokine in Normal and Pathogenic Inflammatory Responses. In: Gallin JI, Synderman R. Inflammation. Basic Principle and Clinical Correlate. 3th Edition Lippincot William & Wilkins 433-441
- Syodin B, West Y.H, and Apple F.S, 1990. Biochemical Mechanisms During for Oxygen Free Radical Formation During Exercise. Sport Medicine. 10 (4) : 236-254.
- Vanhotte PM, 1993. Other Endothelium Derived Vasoactive Factors. Circulation. May 87 (5) : V9 – V17.
- Smith C.M. and A.M Reynard. 1992. Textbook of Pharmacology. WB Company Philadelphia
- Suryohudoyo P, 1997. Oksidan dan Antioksidan pada Diabetes Melitus. Diabetes UpDate III. Surabaya 14-15 Nov . 27-39
- Sozmen B, Kozaz L, Taskiran D and Tuzens, 1998. Effect of N Dicycloprorylmethyl Amino 2 oxazoline (S 3341) on Antioxidant Status and Nitric Oxide in Hypertensive Patients. Current medical Research and Opinion. 14(2): 89-96
- Tizard I.R, 1987. An Introduction of Veterinary Immonology. WB Saunders Company. 256-257.
- Ungvari Z, Csiszar A and Endwards JG, 2003. Increased Superoxide Production in Coronary Arteries in Hyperhomocystemia. Role of Tumor Necrosis Factor α , NAD(P)H, Oxidase and inducible Nitric Oxide synthase. J . arterioscler Thromb. Vasc. Biol. 23: 418-424
- Walsh B.A, Mullick A.E and Walzen R.L., 1999. 17 β Estradiol Reduces Tumor Necrosis Factor α Mediated LDL Accumulation in the artery Wall. J. of Lipid Research. March. 40 : 387-396
- Ward P.A and Warren J.S, 1988. Oxigen Radical, Inflammation and Tissue Injury. Free Radical Biology & Medicine 5: 403-408
- Wijaya A, 1996. Radikal Bebas dan Parameter Status Antioksidan. Forum Diagnostikum Prodia . Diagnostics Educational Cervices. 1-12

LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan dosis Vitamin E

$$\text{Dosis} = \frac{X}{B} \times K \times D$$

Keterangan:

X = Berat rata-rata tikus

B = Berat tikus sesungguhnya

K = Nilai konversi manusia

D = Dosis pada manusia 70kg

Diketahui dosis vitamin E yang dipakai adalah dosis terapi 400IU. 1mg = 1,49 IU

Kelompok I

Berat rata-rata: 156g

$$\begin{aligned} \text{Dosis I} &= \frac{X}{B} \times K \times D \\ &= \frac{156}{200} \times 0,018 \times 400 \\ &= 5,616 \text{ IU} \\ &= \frac{5,616}{1,49} \text{ mg} \\ &= 3,769 \text{ mg} \end{aligned}$$

Kelompok II

Berat rata-rata: 199,83g

$$\begin{aligned} \text{Dosis II} &= \frac{X}{B} \times K \times D \\ &= \frac{199,83}{200} \times 0,018 \times 400 \\ &= 7,1939 \text{ IU} \\ &= \frac{7,1939}{1,49} \text{ mg} \\ &= 4,828 \text{ mg} \end{aligned}$$

Kelompok III

Berat rata-rata: 205g

$$\begin{aligned} \text{Dosis III} &= \frac{X}{B} \times K \times D \\ &= \frac{205}{200} \times 0,018 \times 400 \\ &= 7,138 \text{ IU} \\ &= \frac{7,138}{1,49} \text{ mg} \\ &= 4,953 \text{ mg} \end{aligned}$$

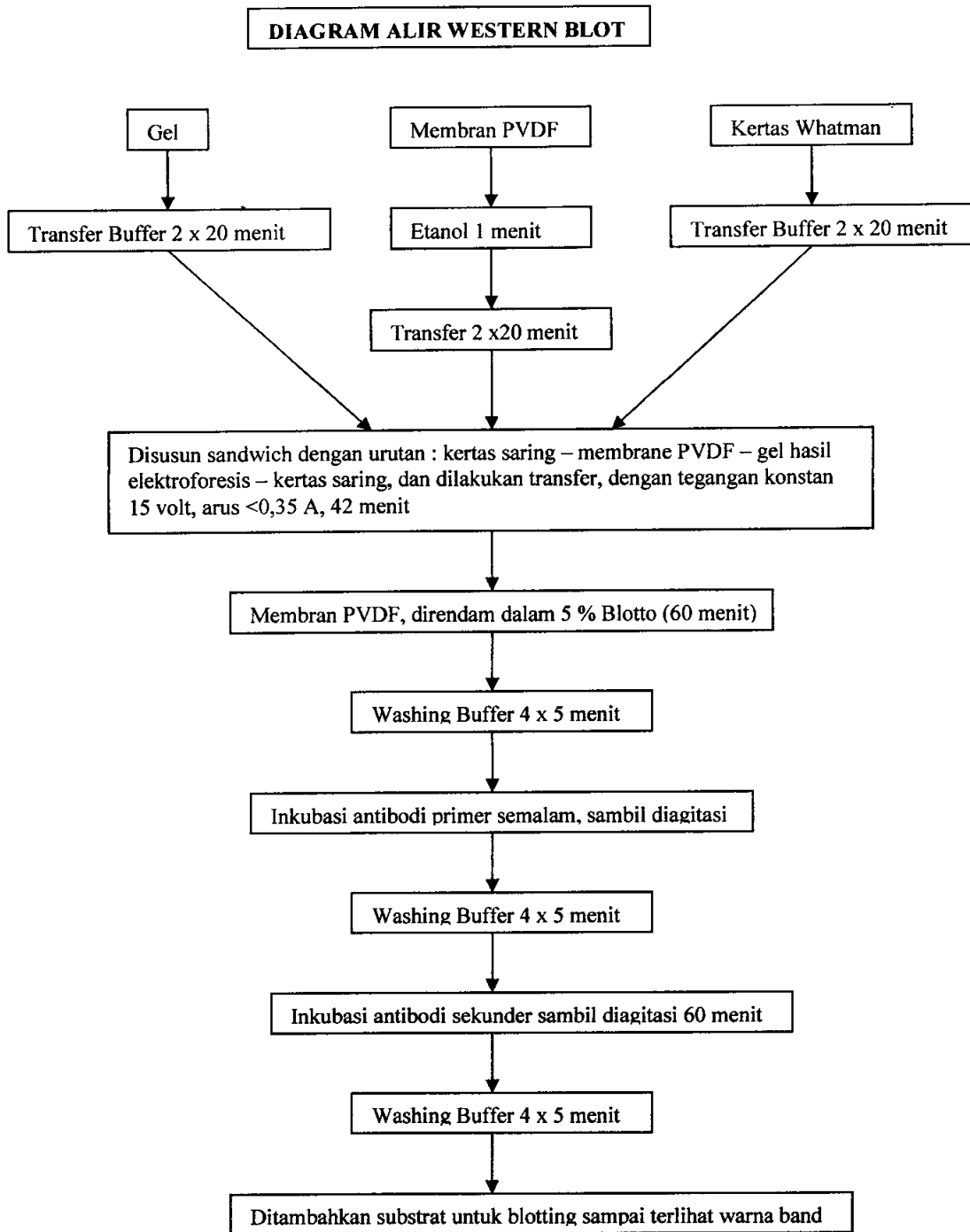
Kelompok IV**Berat rata-rata:** 205,833g

$$\begin{aligned}
 \text{Dosis IV} &= \frac{X}{B} \times K \times D \\
 &= \frac{205,833}{200} \times 0,018 \times 400 \\
 &= 7,409 \text{ IU} \\
 &= \underline{7,409} \text{ mg} \\
 &= 1,49 \\
 &= 4,972 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

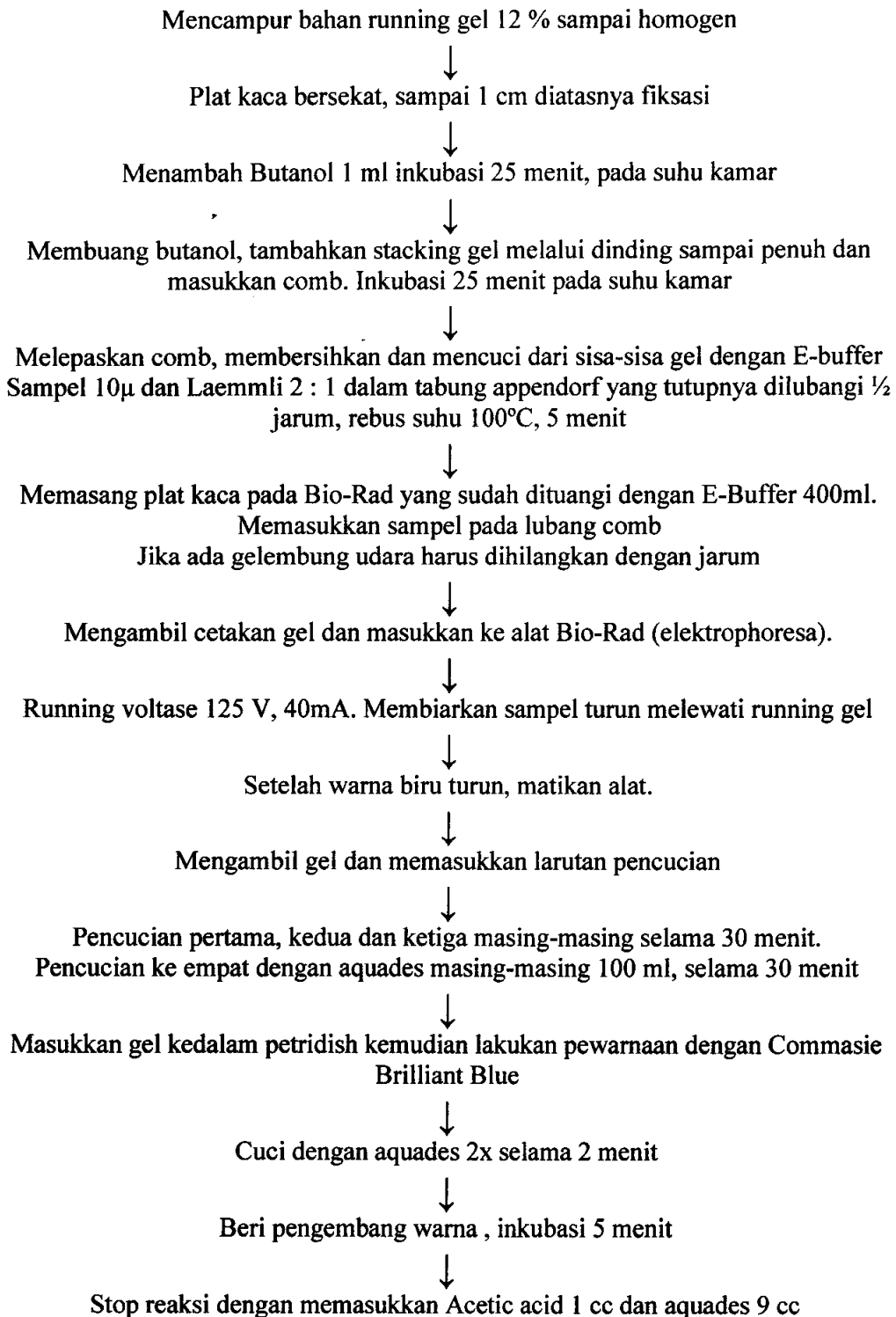
Contoh Resep untuk 15 ekor tikus memakai dosis I

R/ Vitamin E 56,535mg
CMC Na 2%
Aqua ad 45 ml
m.f.l.a suspensi
S 3ml/tikus

Lampiran 2. Diagram Alir Western Blot



Lampiran 3. ELEKTROPHORESIS DENGAN SDS PAGE 12 %



Lampiran 4. Analisis Statistik Superoxide**Data Superoxide :**

	P0	P1	P2
1.	.1070	.1640	.1175
2.	.1145	.1575	.1310
3.	.1105	.1455	.1175
4.	.1110	.1525	.0745
5.	.1225	.1415	.1200
6.	.1170	.1225	.1580
7.	.1150	.1325	.1235

Descriptives :**Descriptive Statistics**

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
P0	7	.1070	.1225	.113929	.0050450
P1	7	.1225	.1640	.145143	.0144243
P2	7	.0745	.1580	.120286	.0246962
Valid N (listwise)	7				

Oneway**ANOVA**

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.004	2	.002	6.775	.006
Within Groups	.005	18	.000		
Total	.009	20			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**Dependent Variable
LSD

VAR-I	VAR-J	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
P0	P1	-.031214(*)	.0089624	.003	-.050044	-.012385
	P2	-.006357	.0089624	.487	-.025187	.012472
P1	P0	.031214(*)	.0089624	.003	.012385	.050044
	P2	.024857(*)	.0089624	.013	.006028	.043687
P2	P0	.006357	.0089624	.487	-.012472	.025187
	P1	-.024857(*)	.0089624	.013	-.043687	-.006028

- The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 5. Analisis Statistik TNF α **Data TNF α**

	P0	P1	P2
1.	1.2810	1.1870	1.3320
2.	1.1840	1.2250	1.2240
3.	1.1600	1.3020	1.2090
4.	1.1730	1.1890	1.0660
5.	1.0590	1.2410	1.1640
6.	1.2010	1.2660	1.1630
7.	1.1270	1.2530	1.2150

**Descriptives**

Descriptive Statistics					
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
P0	7	1.0590	1.2810	1.169286	.0680116
P1	7	1.1870	1.3020	1.237571	.0413999
P2	7	1.0660	1.3320	1.196143	.0804393
Valid N (listwise)	7				

Oneway

ANOVA					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.017	2	.008	1.940	.173
Within Groups	.077	18	.004		
Total	.093	20			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**Dependent Variable
LSD

VAR-I	VAR-J	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
P0	P1	-.068286	.0349285	.066	-.141668	.005096
	P2	-.026857	.0349285	.452	-.100239	.046525
P1	P0	.068286	.0349285	.066	-.005096	.141668
	P2	.041429	.0349285	.251	-.031953	.114811
P2	P0	.026857	.0349285	.452	-.046525	.100239
	P1	-.041429	.0349285	.251	-.114811	.031953

Lampiran 6. Analisis Statistik Regresi Korelasi SDS -PAGE

,4750 1,6532
 ,7000 1,4771
 1,0000 ,3979

Correlations

		X	Y
X	Pearson Correlation	1	-,952
	Sig. (2-tailed)	,	,198
	N	3	3
Y	Pearson Correlation	-,952	1
	Sig. (2-tailed)	,198	,
	N	3	3

Regression

Variables Entered/Removed

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	X	,	Enter

a All requested variables entered.
 b Dependent Variable: Y

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,952	,906	,812	,2944785

a Predictors: (Constant), VAR00001

ANOVA

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	,837	1	,837	9,653	,198
	Residual	,087	1	,087		
	Total	,924	2			

a Predictors: (Constant), VAR00001
 b Dependent Variable: VAR00002

Coefficients

		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	T	Sig.
Model		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	2,957	,598		4,946	,127
	X	-2,456	,791	-,952	-3,107	,198

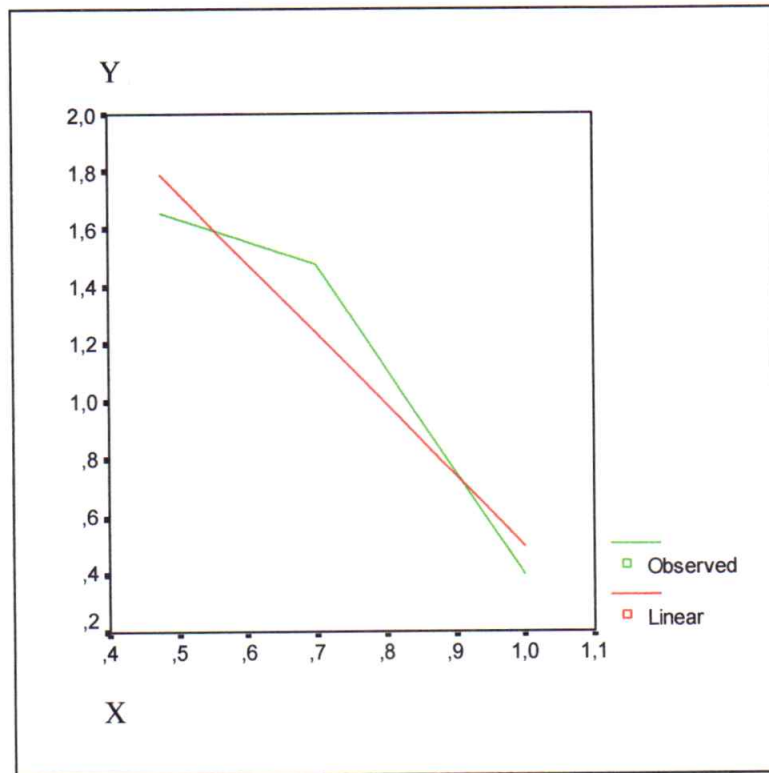
a Dependent Variable: VAR00002

Curve Fit

MODEL: MOD_1.

Independent: VAR00001

Dependent	Mth	Rsq	df	F	Sigf	b0	b1
Y	LIN	,906	1	9,65	,198	2,9568	-2,4563



Perhitungan Berat Molekul

$$Y = 2,9568 - 2,456 X$$

Band	Y	Anti Log
Band 1	1,7901	61,6737
Band 2	1,7286	53,5303
Band 3	1,6059	40,3552
Band 4	1,4155	26,0315
Band 5	1,2374	17,2743
Band 6	1,1146	13,0196
Band 7	1,0225	10,5317

Lampiran 7. Analisis Statistik Regresi Korelasi Western Blot**Data Western Blott :**

X	Y
0.3478	1.6532
0.5435	1.4771
0.7609	1.3032
0.9348	1.1553
0.9738	0.8129
1.0000	0.5441

Regression**Variables Entered/Removed(b)**

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	X(a)	.	Enter

a All requested variables entered.

b Dependent Variable: Y

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.899(a)	.808	.759	.2038800

a Predictors: (Constant), X

ANOVA(b)

Model		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.698	1	.698	16.788	.015(a)
	Residual	.166	4	.042		
	Total	.864	5			

a Predictors: (Constant), X

b Dependent Variable: Y

Coefficients(a)

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	T	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	2.230	.275		8.120	.001
	X	-1.411	.344	-.899	-4.097	.015

a Dependent Variable: Y

Correlations

Correlations

		Y	X
Y	Pearson Correlation	1	-.899(*)
	Sig. (2-tailed)	.	.015
	N	6	6
X	Pearson Correlation	-.899(*)	1
	Sig. (2-tailed)	.015	.
	N	6	6

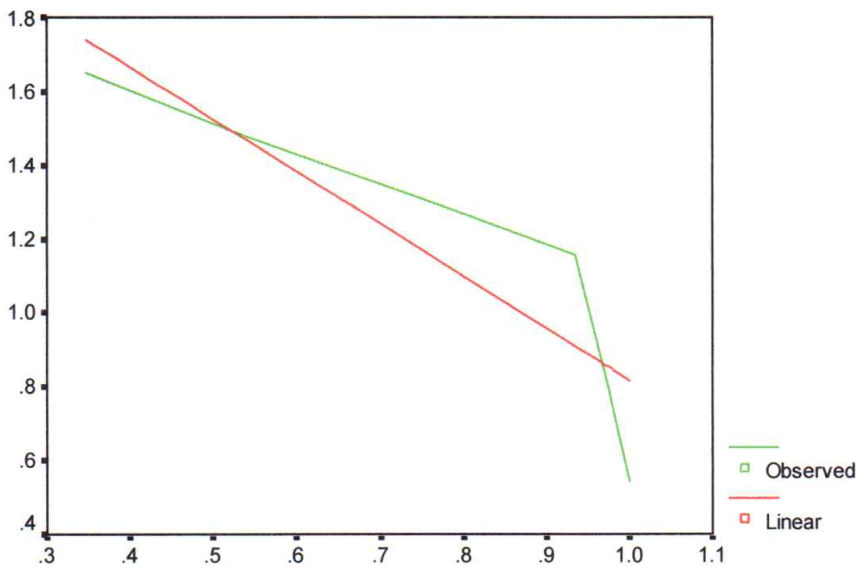
* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

MODEL: MOD_1.

Independent: X

Dependent	Mth	Rsq	d.f.	F	Sigf	b0	b1
Y	LIN	.808	4	16.79	.015	2.2300	-1.4107

Y



X

Perhitungan Berat Molekul

$$Y = 2,23 - 1,411X$$

Band	Y	Anti log
Band 1	1,7286	53,5303
Band 2	1,4171	26,1276

**HAMBATAN PRODUKSI REAKTIF OKSIGEN SPESIES ANION
SUPEROXIDE (O_2^-) OLEH ANTIOKSIDAN VITAMIN E PADA TIKUS PUTIH
YANG MENERIMA STRESSOR**

Fitri Wulandari

ABSTRAK

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengungkap mekanisme perlindungan kelainan pembuluh darah akibat stressor, juga mengungkap mekanisme perlindungan atau pencegahan kerusakan pembuluh darah oleh antioksidan Vitamin E akibat stressor. Tujuan khusus adalah untuk mengetahui peranan superoxide (O_2^-) sebagai salah satu reaktif oksigen spesies dalam kerusakan pembuluh darah akibat stressor.

Penelitian ini menggunakan tikus wistar jantan umur 3 bulan dengan berta badan kurang lebih 200 gram dan dalam keadaan sehat. Hewan coba dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu kontrol (P0) yang diberi pelarut obat 3 ml, perlakuan 1 (P1) yang diberi stressor + pelarut obat 3 ml, dan perlakuan 2 (P2) yang diberi stressor + emulsi vitamin E dosis 400 IU 3 ml. Perlakuan tersebut diberikan setiap hari selama 14 hari. Pada hari terakhir perlakuan, kelompok kontrol dan perlakuan diambil darahnya untuk diambil serumnya guna pemeriksaan anion superoxide (O_2^-)

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian stressor dapat meningkatkan produksi radikal anion superoxide (O_2^-) serum tikus putih serta pemberian vitamin E dapat menurunkan produksi radikal anion superoxide (O_2^-) serum tikus putih yang menerima stressor. Saran dari penelitian ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh stressor yang dikombinasi dengan vitamin E terhadap kadar Nitric Oxide (NO)

**ANALISIS KADAR TUMOR NEKROSIS FAKTOR ALFA (TNF- α)
AKIBAT PEMBERIAN ANTIOKSIDAN VITAMIN E (α -Tocopherol)
PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)
YANG MENERIMA STRESSOR**

Dian Vidiastuti

ABSTRAK

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengetahui mekanisme molekuler kerusakan sistem pembuluh darah akibat stressor dan mekanisme molekuler pencegahan kerusakan pembuluh darah akibat stressor oleh antioksidan vitamin E serta secara khusus bertujuan untuk mengetahui peran sitokin pro inflamasi TNF α pada perkembangan lesi pembuluh darah.

Hewan coba yang digunakan terdiri dari 21 ekor tikus putih *Wistar* jantan umur 3 bulan dengan berat tubuh sekitar 200 gram yang dibagi menjadi 3 kelompok , yaitu kontrol (P0) yang diberi pelarut obat 3 ml, perlakuan 1 (P1) yang diberi stressor +pelarut obat 3 ml, dan perlakuan 2 (P2) yang diberi stressor + emulsi vitamin E dosis 400 IU 3 ml.

Perlakuan tersebut diberikan setiap hari selama 14 hari dengan sonde dari spuit 5 ml. Pada hari terakhir perlakuan, kelompok kontrol dan perlakuan diambil darahnya untuk diambil serumnya dan kemudian dilakukan pemeriksaan secara kuantitatif kadar TNF- α dengan Indirect ELISA. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan uji Anova.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan (P0, P1, P2) $p > 0,05$. Sebagai saran perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh stressor yang dikombinasi dengan pemberian perlakuan yang lain (toksin, infeksi) terhadap kadar TNF α serum tikus putih (*Rattus norvegicus*).

**EKSPRESI PROTEIN TUMOR NEKROSIS FAKTOR ALFA (TNF α) AKIBAT
PEMBERIAN ANTIOKSIDAN VITAMIN E (*α Tocopherol*) PADA TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG MENERIMA STRESSOR**

Anggi Septianti Hendarman

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari mekanisme perlindungan pembuluh darah oleh anti oksidan vitamin E dan untuk mengkonfirmasi gambaran perubahan ekspresi protein TNF alfa pada tikus jantan yang menerima stressor. Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan dengan pendekatan molekuler.

Penelitian ini menggunakan tikus wistar jantan umur 3 bulan dengan berta badan kurang lebih 200 gram dan dalam keadaan sehat. Hewan coba dibagi menjadi 3 kelompok , yaitu kontrol (P0) yang diberi pelarut obat 3 ml, perlakuan 1 (P1) yang diberi stressor + pelarut obat 3 ml, dan perlakuan 2 (P2) yang diberi stressor + emulsi vitamin E dosis 400 IU 3 ml. Perlakuan tersebut diberikan setiap hari selama 14 hari. Pada hari terakhir perlakuan, kelompok kontrol dan perlakuan diambil darahnya untuk diambil serumnya. Untuk analisis protein dan identifikasi protein TNF alfa diamati secara kualitatif dengan metode SDS PAGE dan Western Blot.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa analisis protein dengan SDS PAGE didapatkan protein yang mempunyai berat molekul 61 kDa, 51 kDa, 40 kDa, 26 kDa, 17 kDa, dan 13 kDa. dan setelah ditransfer dengan teknik Immunoblotting untuk identifikasi protein TNF alfa didapatkan protein dengan i berat molekul 51 kDa, 26 kDa kDa sebagai saran perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh stressor yang dikombinasi dengan pemberian perlakuan yang lain (toksin, infeksi) terhadap ekspresi protein TNF α serum tikus putih.