

PENILAIAN TNF-ALFA PADA HATI MENCIT JANTAN SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL MANGGIS *Garcinia mangostana L* DENGAN METODE IMUNOHISTOKIMIA

Nora Maulina^{1*}

¹*Dosen Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran
Universitas Malikussaleh, Lhokseumawe, Aceh*

**Korespondensi: noramaulina@yahoo.co.id*

Abstract

Mangosteen peel extract is now widely used as an alternative treatment by society as an anti-oxidant without knowing the side effects. Consumption Monosodium glutamate (MSG) is used as a flavor enhancer in the food can cause various side effects due to formation of free radicals in the body such as liver dysfunction. The research method using true experimental designs aimed at comparing the effect of ethanol extract of mangosteen peel (EEKM) on liver damage caused by MSG administration to vitamin E. Of 15 fish samples DDW strain male mice, which were divided into three treatment groups, namely control group / distilled water (P0), MSG administration group (P2), group administration MSG and EEKM(P3). Then assessed liver function as well as evaluating the level of immunohistochemical staining of liver damage with TNF- α (NBP1-67 821, pAb, 1:50 dilution). Ethanol extract of mangosteen peel and are able to improve the look of immunohistochemical expression of TNF- α inflammatory process caused by MSG administration($p>0,05$).

Keywords: *monosodium glutamate, ekstrak etanol kulit manggis, TNF- α .*

PENDAHULUAN

Monosodium glutamate (MSG) sudah lama digunakan di seluruh dunia sebagai penambah rasa makanan dengan *L-glutamic acid* sebagai komponen asam amino (Geha *et al.*, 2000) disebabkan penambahan MSG akan membuat rasa makanan menjadi lebih lezat. Konsumsi MSG terbanyak dijumpai pada masyarakat Korea yang mencapai 1,6 g/hari, sedangkan di Indonesia sekitar 0,6 g/hari. Taiwan adalah negara yang paling tinggi konsumsi MSG per kapita, mencapai 3 g/hari, sedangkan Amerika adalah negara yang paling rendah konsumsi MSG per kapita, hanya 0,5 g/hari (Prawirohardjo, 2000). Konsumsi tersebut bisa tergantung pada isi kandungan MSG dalam makanan dan pilihan rasa seseorang (Geha *et al.*, 2000), berkisar antara 0,1 % dan 0,8 % dari makanan yang disajikan.

Glutamate yang dikonsumsi secara oral direabsorpsi di rongga usus dan masuk secara langsung melalui vena portal ke dalam hati, di dalam hati plasma amino yang direabsorpsi itu, konsentrasinya diubah sesuai kebutuhan. Dalam keadaan normal konsentrasi glutamate relatif rendah 5–10 $\mu\text{m}/100$ ml dalam darah. Sehingga pada konsentrasi 50-70 $\mu\text{m}/100$ ml dalam darah, glutamate dianggap tinggi (Levi, 2000).

Fungsi hati yang merupakan tempat utama untuk memetabolisme obat dan zat toksik, dikenal sebagai proses biotransformasi. Hasil akhir dari reaksi ini berupa bahan yang tidak aktif dan lebih larut dalam air, sehingga secara cepat dapat diekskresi melalui empedu atau urin. (Malarkey, 2005). Gejala awal hepatotoksik ditandai dengan peningkatan enzim-enzim transaminase dalam serum. Ada dua jenis aminotransferase yang sering diukur

yaitu *SGPT* (*glutamate pyruvate transaminase*)/ *ALT* (*alanin transaminase*) dan *SGOT* (*glutamate oksaloasetat transaminase*)/*AST* (*aspartate transaminase*) (Morgan, 1996; Huriawati, 2002; Siti, 1995). Adanya enzim di dalam sel, menyebabkan peningkatan jumlah enzim yang merupakan konsekuensi dari jejas sel sehingga molekul-molekul intrasel dapat lolos keluar (Huriawati, 2002).

Tumor Necrosis Factor merupakan faktor pertama dalam peningkatan inflamasi dan berguna dalam mengaktifkan makrofag pada pertahanan *host* terhadap mikroba yang menginvasi selama terjadinya infeksi. Sehingga *TNF* dapat memediasi efek menguntungkan dan efek merugikan tergantung pada keadaan proses penyakitnya. *Tumor Necrosis Factor* kini diketahui terlibat dalam merangsang produksi sitokin, meningkatkan ekspresi molekul adhesi dan aktivasi netrofil, juga merupakan stimulator tambahan untuk aktivasi sel T dan produksi antibodi oleh sel B. Meskipun tingkat sirkulasi level *TNF* sangat bervariasi, upregulasi dari ekspresi gen telah dilibatkan dalam patogenesis berbagai jenis penyakit dengan komponen inflamasi, autoimun, proses infeksi akut dan kronis (Jimena Cuenca *et al.*, 2001).

METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan: Kandang mencit dan perlengkapannya, jarum *gavage* untuk cekok tikus, timbangan, sekam padi. Seperangkat alat pemeriksaan dengan teknik imunohistokimia. Timbangan tikus, gelas arloji, spuit 1 ml, bak bedah dan *dissecting set*, cawan petri, batang pengaduk, handscoen, masker, kertas milli. Mikroskop binokuler dengan merek *Olympus CX21*

Bahan yang digunakan: (a) *Pericarp* (bagian dalam kulit manggis) telah dideterminasi di *Herbarium Medanense (MEDA)* jurusan biologi Fakultas Matematika

dan Ilmu pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Sumatera Utara, dan diekstrakkan di Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara. Hewan coba mencit jantan strain *DDW* umur 8-12 minggu dan berat badan 25-30gr, berasal dari Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Sumatera Utara; (b) Pakan standar mencit berupa *pellet* produksi PT. Chaevron Pokphan Medan dicampur jagung halus dengan perbandingan 2:1.

Prosedur kerja

Persiapan dan pemeliharaan hewan mencit: Mencit dipelihara dalam kandang plastik (ukuran 30 x 20 x 10cm) dengan anyaman kawat sebagai penutup, dasar kandang dilapisi sekam padi setebal 0,5-1cm dan diganti setiap tiga hari, ditempatkan dalam ruangan yang memiliki ventilasi dan mendapat cahaya matahari secara tidak langsung. Kandang tempat makan dan minum mencit dibersihkan setidaknya tiga kali dalam seminggu. Sebelum perlakuan, mencit diaklimatisasi selama seminggu. Pemberian makan dan minum dilakukan setiap hari secara *ad libitum*. Pakan yang diberikan berupa *pellet c-0,5* produksi PT. Chaevron Pokphan Medan dan aquades. Cahaya ruangan, kelembaban ruangan dan suhu berada pada kisaran alamiah. Sampel yang terdiri dari 15 ekor mencit dibagi secara acak dalam 3 kelompok, masing-masing kelompok 5 ekor. Tiap kelompok diberi kode kelompok I, II, dan III.

Perlakuan diberikan sesuai dengan kelompok. Pakan diberikan setelah perlakuan dilakukan berupa *pellet* yang dicampur jagung halus dengan perbandingan 2 : 1 diberikan secara *ad libitum* setiap pagi hari jam \pm 10.00-11.00 WIB sebanyak 0,5-0,7 gr/hari/mencit serta air minum dari ledeng (*PAM, Perusahaan Air Minum*).

Prosedur pembedahan hewan mencit. Prosedur pembedahan dilakukan melalui tahap persiapan, pembedahan dan sanitasi. Pada

tahap persiapan, disiapkan pot yang sudah diberi label sesuai dengan nomor perlakuan mencit yang akan dilakukan pembedahan. Pot organ diisi dengan formalin *buffer* 10% untuk menyimpan organ. Disiapkan spuit insulin 1 ml yang sudah diberi label. Disiapkan peralatan bedah seperti gunting bedah, pinset, gelas arloji, cawan petri, papan bedah, pins, beker glas. Tahap pembedahan, mencit dibunuh secara *neck dislocation*.

Mencit diposisikan pada papan bedah menggunakan pins. Dibedah mulai dari bagian perut menggunakan gunting bengkok. Darah langsung diambil dari jantung, masukkan kedalam tempat penyimpanan berisikan es sebelum dibawa ke laboratorium dan organ hati diambil, dibersihkan dari kotoran yang menempel, dicuci dengan menggunakan NaCl 0,9% sampai bersih. Secara makroskopik, ditimbang berat dan ukuran hati mencit dan selanjutnya diamati perubahan warna, konsistensi dan permukaan pada hati, dimasukkan kedalam pot berisi formalin *buffer* 10%. Tahap sanitasi dilakukan dengan cara memasukkan sisa organ mencit yang tidak terpakai dalam kantong plastik yang akan dibuang. Tempat kerja sisa melakukan pembedahan dibersihkan dan semua peralatan bedah yang terpakai dibersihkan.

Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit buah manggis, yang diperoleh dari desa pantai Gemi, Stabat, dari kebun penduduk desa. Kulit buah dibersihkan dari pengotor lalu dicuci hingga bersih, dikupas kulit buah terluar dan ditimbang. Diperoleh berat basah sebesar 10 kg. Selanjutnya kulit buah tersebut dikeringkan selama 7 hari dalam lemari pengering dengan temperatur ± 40 °C sampai kulit buah kering, didapat berat kering 2454,7 gr. Simplisia yang telah kering di blender menjadi serbuk lalu dimasukkan ke dalam wadah plastik tertutup dan di simpan pada suhu kamar. Kemudian

serbuk ditimbang, maka diperoleh berat kering sebesar 2262,8 gr.

Serbuk simplisia yang telah kering tadi kemudian dimasukkan ke dalam bejana tertutup sebanyak 2262,8 gr dan kemudian dibasahi dengan etanol 96%, sampai semua serbuk terendam, biarkan selama lima hari sambil diaduk 3-4 kali sehari. Setelah itu massa dipindahkan ke dalam corong dan disaring dengan menggunakan kertas penyaring. Hasil penyaringan yang diperoleh dipampatkan dengan alat *rotary evaporator*. Kemudian dikeringkan selama lebih kurang 24 jam dan diperoleh ekstrak kental sebanyak 700 gr yang telah siap digunakan.

Prosedur pewarnaan Imunohistokimia. Dilakukan deparafinisasi slide memakai 3 larutan Xylol 1,2 dan 3 masing-masing selama 5 menit, kemudian dilakukan proses rehidrasi untuk menghilangkan sisa xylol dengan menggunakan larutan alkohol absolut, alkohol 96%, alkohol 80%, dan alkohol 70% masing-masing selama 4 menit, kemudian dicuci dibawah air mengalir selama 5 menit. Masukkan slide ke dalam mesin pengering merk PT. Link Dako Epitope Retrieval, kemudian diatur set up *Preheat* 65°C, running time 98°C selama 15 menit, tunggu sampai ± 1 jam, setelah slide kering, dengan menggunakan spidol pap pen, preparat yang ada di slide dilingkari agar pada saat penetesan antibody atau cairan lainnya tidak keluar melewati batas lingkaran pap pen tadi.

Slide dimasukkan kedalam larutan *Tris Buffered Saline (TBS) pH 7,4* selama 5 menit, kemudian dilakukan blocking dengan *peroxidase*, selama 5-10 menit, kemudian kembali dicuci dalam larutan *Tris Buffered Saline (TBS) pH 7,4* selama 5 menit blocking kembali dengan *Normal horse serum (NSH) 3%*, selama 15 menit, cuci dalam larutan *Tris Buffered Saline (TBS) pH 7,4* selama 5 menit. Setelah itu barulah diinkubasi dengan antibody *TNF- α NBPI-67821) pAb*, dengan besar unit 0.05 mg, masing-masing selama 1

jam. Cuci kembali kedalam larutan *Tris Buffered Saline (TBS)* pH 7,4 atau *Tween 20* selama 5 menit, kemudian simpan kedalam rak slide dengan merk *Dako Real Envision Rabbit/Mouse* selama 30 menit. Setelah itu slide kembali dicuci dalam larutan *Tris Buffered Saline (TBS)* pH 7,4 atau *Tween 20* selama 5-10 menit. Kemudian slide ditetesi dengan kromogen *Diamino Benzidin (DAB)* + Substrat Chromogen solution dengan pengenceran 20 μ L *DAB*:1000 μ L substrat (dapat bertahan 5 hari di suhu 2-8°C setelah di-mix) selama 5 menit, di cuci kembali dengan air mengalir dan dilakukan pewarnaan dengan Hematoxylin masing-masing selama 10 menit.

Sediaan tersenut dicuci dibawah air mengalir selama 5 menit, celupkan slide preparat kedalam lithium carbonat (5% dalam aqua) selama 2 menit, cuci dengan air mengalir dan kembali dilakukan proses pengeringan cairan sebelumnya dengan proses dehidrasi menggunakan alkohol 80%, alkohol 96%, alkohol Absolut masing-masing selama 5 menit, kemudian clearing dengan larutan Xylol 1, Xylol 2, Xylol 3 masing-masing selama 5 menit, kemudian mounting dan tutup slide preparat dengan cover glass, dan preparat siap dilihat atau dinilai.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Prosedur pengamatan Imunohistokimia antioksidan *TNF- α* pada hati mencit

Pengamatan dilakukan oleh peneliti dan dua ahli patologi anatomi tanpa mengetahui kelompok perlakuan. Jaringan hati yang telah dibuat menjadi preparat blok parafin, dan diwarnai dengan pewarnaan imunohistokimia akan diamati di bawah mikroskop cahaya,

dengan pembesaran 40x, 100x dan 400x dan dinilai tampilan pewarnaan berupa:

a. Positif : tertampil warna kecoklatan pada inti sel dari jaringan hati

b. Negatif: tidak tertampilnya warna kecoklatan pada inti sel jaringan hati. Kontrol yang digunakan adalah:

- Kontrol positif, digunakan jaringan yang berasal dari ca colon.

Dinilai kekuatan tampilan warna kecoklatan yang dibandingkan dengan warna coklat yang tertampil pada kontrol positif dan diberi kategori sebagai berikut:

- 0 = Tidak tertampil / negatif
- 1 = Tertampil lemah
- 2 = Tertampil sedang
- 3 = Tertampil kuat

Selain itu juga dinilai luas tampilan hasil pewarnaan dan diberi skor sebagai berikut:

- 0 = Tidak tertampil
- 1 = < 25% yang terwarnai positif pada membran sitoplasma
- 2 = 25 – 50% yang terwarnai positif pada membran sitoplasma
- 3 = > 50% yang terwarnai positif pada membran sitoplasma

Hasil penilaian imunohistokimia merupakan hasil perkalian antara intensitas tampilan coklat dengan luas tampilan, didapatkan penilaian skor sebagai berikut.:

- 0 = negatif
- 1 - 3 = tampilan lemah
- 4 - 6 = tampilan sedang
- 7 - 9 = tampilan kuat

Hasil pengamatan terhadap tampilan pewarnaan imunohistokimia *TNF- α* pada sel hati setelah diberikan perlakuan dengan pemberian *MSG* dan ekstrak etanol kulit manggis dapat dilihat pada Table berikut.

Kelompok	Intensitas warna	Luas Tampilan	Jumlah (I.Warna x L.Tampilan)	Kategori
P0 = Kontrol negatif	2	1	2	2
P1 = MSG	3	2	6	4
P2 = MSG+EEKM	2	2	4	3

Keterangan: MSG = Monosodium glutamate, EEKM = Ekstrak etanol kulit manggis

Uji *Kruskal Wallis* menunjukkan bahwa derajat kerusakan hati yang dinilai berdasarkan tampilan pewarnaan imunohistokimia *TNF- α* menunjukkan perbedaan yang bermakna di antara kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Tampilan imunohistokimia *TNF- α* yang tertampil paling kuat adalah pada kelompok perlakuan P1 yang mendapat MSG selama 21 hari. Pada kelompok perlakuan P2 yang mendapat ekstrak etanol kulit manggis selama 14 hari. Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan P1 dengan kelompok perlakuan P2 dan kelompok perlakuan P3 ($p < 0,05$), namun tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan P2 dengan kelompok perlakuan P3 ($p > 0,05$).

Gambaran histopatologi hati yang dinilai dengan tampilan pewarnaan imunohistokimia *TNF- α* yang terberat adalah terdapat pada kelompok mencit yang hanya mendapatkan MSG selama 21 hari (kelompok perlakuan P1). Dimana kelompok P1 ini menunjukkan tampilan imunohistokimia *TNF- α* pada hati yang paling kuat dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya (kelompok perlakuan P2, dan kelompok perlakuan P3). Perbaikan gambaran histopatologi hati yang dinilai berdasarkan tampilan pewarnaan imunohistokimia *TNF- α* terdapat pada kelompok yang mendapat ekstrak etanol kulit manggis selama 14 hari setelah pemberian MSG 21 hari (kelompok perlakuan P2).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan yang telah dikemukakan, maka dapat dinyatakan bahwa ekspresi proses inflamasi *TNF- α* akibat pemberian MSG, dapat diperbaiki masing-masing dengan pemberian ekstrak etanol kulit manggis dan vitamin E ($p < 0,05$).

UCAPAN TERIMA KASIH

Artikel ini merupakan hasil mini riset ketika Penulis masih mengikuti Program Magister Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara, Medan. Oleh sebab itu, melalui kesempatan ini Penulis menghaturkan terima kasih kepada Dekan FK USU beserta Staf, Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik FK USU, khususnya kepada Prof. dr. Gusbakti Rusip, M. Sc, PKK, A.I.F.M. dan dr. Betty, M.Ked (PA), Sp.PA atas bimbingan dan arahnya.

DAFTAR PUSTAKA

Geha, R., Beiser, A. Ren, C. Patterson, R., Greenberger, P., Grammer, L., Ditto, A., Harris K., Saughnessy, M., Yarnold, P., Corrent, J., & Saxon, A. (2000). Review of allerged reaction to monosodium glutamate and outcome of a multicenter double-blind placebo-controlled study. *The journal of nutrition*, 130, 1058-1062.

- Huriawati Hartanto. (2002). Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium (Terjemahan). ed 11. Jakarta : EGC, ; 341-71.
- Jimena Cuenca, C. A. P., Adam J, Aguirre, Irene Schiattino, Carlos Aguillon (2001). Genetic polymorphism at position -308 in the promoter region of the tumor necrosis factor (TNF) Implications of its allelic distribution on susceptibility or resistance to disease in the Chilean population. *Biological research*.
- Ji LL. (1999). Antioxidant and oxidative stress in exercise. *Proceeding of the society for Exsperimental Biology and Medicine* 222: 283-292
- Johnston, D. E. (1999). Special considerations in interpreting liver function test. *Am Fam Physician* (59): 2223-2230
- Jose Pedraza-Chaverri : Noemi Cardenas-Rodriquez, Marisol Orozco-Ibbrra, Jazmin M Perez. Facultad de quimica, Departamento de Biologia Universad (2008). Nacional Automa de mexico (UNAM), in *Food and Chemical Toxicology*.
- Jung HA, Su BN, Keller WJ, Mehta RG, Kinghorn AD. (2006). Antioxidant xanthones from the pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen), *J Agric Food Chem*, 54(6):2077-2082.
- Kaneda, K., Teramoto, K., Yamamoto, H., Wake, K. and Kamada, N. (1991). Localization and ultrastructure of the kupffer cells in orthopically transpalated liver grafts in the rats. *Transplant Int* (4):205-209.
- Klejdus, B., J. Vacek, L. Benesová, J. Kopecký, O. Lapčík and V. Kubán. (2007). Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts. *Anal. Bioanal. Chem.* 389: 2277-2285.
- Kinoshita S, Udaka S, Shimamoto M. (1957). "Studies on amino acid fermentation. Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms". *J Gen Appl Microbiol* 3: 193.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. (2005). Cellular Adaptations, Cell injury, and Cell death. Dalam *pathologi basic of disease*, Edisi ke 7. Philadelphia: WB Saunders Company, hlm 1-46.
- Kumar, V, Abbas, A.K., Fausto, N. (2010). Cellular Adaptations, Cell injury, and Cell death. Dalam *pathologi basic of disease*, Edisi ke 8. Philadelphia: WB Saunders Company, hlm 1-46
- Lauralee Sherwood. (2007). *Fisiologi Manusia Dari Sel ke Sistem*, Edisi 2. Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Levi, P. E. (2000). Toxic action. In Hodgson, E and Levi, P. E. (Eds). *Modern toxicology* Elsevier, New Yak. P. 133-184.
- Malarkey, D. E., Johnson, K., Ryan, L., Boorman, G. and Maronpot, R.R. (2005). New Insights into Funtional Aspects of Liver Morphology. *Toxicologic Pathology* (33): 27-34.
- Muhammad, M. & Kelly, M. (2000). The administration to indonesians of monosodium L-glutamate in Indonesian foods, crossover, placebo-controlled study, *Journal of Nutrition*,
- Netter, F., (2010). *Interactive Atlas Of Human Anatomy*, Ciba Geigy Corporation ,
- Setiawati A, Suyatna FD, Gan S. (2007). Pengantar farmakologi. In: Gunawan SG, Setiabudy R, Nafrialdi, Elysabeth. *Farmakologi dan terapi*. 5th ed. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 1-11.
- Thannical VJ, BL Fanburg. (2000) Reactive Oxygen Species in cell signaling, *Am J*

physiol Lung Cell Mol Physiol,
279:1005-1028

Weecharangsan, W., Opanasopit, P., Sukma,
M., Ngawhirunpat, T., Sotanaphun, U.,
Siripong, P. (2006). Antioxidative and
Neuroprotective Activities of Extracts
from The Fruit Hull of Mangosteen
(*Garcinia mangostana* Linn.). *Med Princ
Pract*, 15, 281-287.