

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Adesi intra-abdominal adalah perlengketan tidak normal organ intra-abdomen, dihubungkan oleh jaringan berbentuk pita yang bervaskularisasi dan berinervasi (Vase *et al*, 2010). Adesi intra abdominal merupakan komplikasi pembedahan abdominal yang paling sering, kurang lebih 95% pasien pasca pembedahan abdomen, mengalami adesi (Wei *et al*, 2015). Adesi intra-abdominal menyebabkan komplikasi serius antara lain: obstruksi intestinal, infertilitas pada wanita, nyeri pelvis kronis dan operasi berikutnya menjadi lebih sulit (Molinas *et al*, 2010). Lima belas persen pasien mengalami obstruksi intestinal, perlu operasi ulang dengan mortalitas tinggi 5%-20% dan cenderung rekurensi (Wei *et al*, 2015). Pengalaman peneliti sebagai ahli bedah anak di Banjarmasin, sering menjumpai kasus adesi intra-abdominal dengan penyulit dan komplikasi yang serius. Banyak upaya yang dilakukan untuk mengurangi adesi-intra abdominal, yaitu: pemberian obat anti adesi intra-abdominal, pemberian modulator stres oksidatif (Yilmaz *et al*, 2005) dan modulator inflamasi (Askari *et al*, 2018) dan pembedahan minimal invasif (Aldana *et al*, 2003., Baysal *et al*, 2009). Belum ada metode yang efektif untuk mencegah adesi intra-abdominal, karena mekanisme biologi molekuler adesi intra abdominal yang pasti belum ditemukan (Wei *et al*, 2015).

Laparoskopi merupakan prosedur pembedahan invasif minimal menggunakan kamera dan instrumen bedah yang dimasukkan melalui insisi kecil.

(Aldana *et al*, 2003., Baysal *et al*, 2009). Menurut data Lapdome™ By Narvitas tahun 2016, total pembedahan laparoskopi yang dilakukan di seluruh dunia mencapai 15 juta pertahun, dengan peningkatan 8,3%. Didunia, laparoskopi mulai berkembang sejak tahun 1970-an, sedang di Indonesia sejak tahun 1990-an dan cenderung meningkat (Hadibroto, 2007). Di Banjarmasin, pembedahan laparoskopi mulai berkembang sejak tahun 2012. Data bagian bedah Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat menyebutkan, operasi laparoskopi yang dilakukan di Banjarmasin sebagai berikut: tahun 2012: 57 kasus dan kecenderungan meningkat menjadi 518 kasus ditahun 2016. Kedepan, laparoskopi dilakukan pada kasus dengan penyulit dan memerlukan waktu lama (Baysal *et al*, 2009. Lee *et al*, 2013). Laparoskopi mampu menurunkan kejadian adesi dari 95% menjadi 12% (Altinel *et al*, 2014), tetapi adesi intra abdominal belum sepenuhnya dapat diturunkan (Kavic *and* Kavic, 2002).

Stres oksidatif adalah gangguan keseimbangan antara produksi spesies oksigen reaktif (SOR/radikal bebas) dan pertahanan modulator stres oksidatif yang memicu kerusakan jaringan (Betteridge, 2000). Sistem pencernaan menghasilkan modulator stres oksidatif, tetapi jumlahnya tidak mampu mengatasi saat terjadi cedera (Halliwell *and* Whiteman, 2004). Spesies oksigen reaktif mengaktifkan respon inflamasi. Hidrogen peroxidase (H_2O_2) yang dihasilkan terbukti mengaktifkan faktor transkripsi NF κ B melalui degradasi I κ B (Chelombitko *et al*, 2016). Produksi sitokin yang berlebihan saat respon inflamasi akan memicu adesi intra abdominal (Awonuga *et al*, 2014).

Respon inflamasi merupakan mekanisme pertahanan tubuh (*innate immune*) untuk mengeliminasi benda asing (*non-self*) (Playfair and Chain, 2013., Mittal *et al*, 2014). Pada respon inflamasi terjadi vasodilatasi, peningkatan permeabilitas vaskuler dan fagositosis. Kerusakan sel akibat trauma jaringan segera dieliminasi oleh respon inflamasi, agar tidak berpotensi membahayakan tubuh (Playfair and Chain, 2013). Respon inflamasi mengaktifkan residen sel intra abdominal, yaitu: makrofag, limfosit, neutrophil, sel mast dan mesotel (Leung *et al*, 2000., Maciver *et al*, 2011., Murray and Wynn, 2011., Sammour, 2011). Sekresi TGF- β yang berlebihan oleh residen sel inflamasi mencetuskan adesi intra-abdominal (Leung *et al*, 2000., Sammour, 2011).

Sel mast dikenal sejak tahun 1863 oleh von Recklinghausen, tetapi banyak peranan sel mast yang belum terungkap dengan jelas. Umur sel mast yang mencapai bulan-tahun, diduga memberikan respon pada trauma berkepanjangan, dan perannya pada kejadian fibrosis (Widjajanto, 2012., de Souza Junior *et al*, 2015). Sel mast mempunyai peran penting pada *innate-immune* dan *adaptive-immune* respon inflamasi. Spesies oksigen reaktif (SOR) mempunyai peranan penting dan berinteraksi dengan reseptor sel mast pada proses degranulasi (Melendez *et al*, 2010., Chelombitko *et al*, 2016). Sel mast memproduksi SOR intraseluler yang memicu degranulasi (Swindle *et al.*, 2004). Penelitian terdahulu membuktikan terjadi peningkatan sel mast rongga peritoneal pasca operasi (Hermanowicz *et al*, 2010).

Bawang Dayak (*Eleutherine* sp.) merupakan tanaman herbal, banyak dijumpai di Kalimantan dan bulbus (umbi) nya digunakan untuk pengobatan luka/*bahimang* (Setyowati, 2010). Bahan aktif bawang Dayak: naphthoquinon dan anthraquinon, flavonoid, tannin dan phenol, yang memiliki kemampuan modulator

inflamasi dan modulator stres oksidatif (Han *et al*, 2008., Song *et al*, 2009). Derivat flavonoid yang berpotensi sebagai stabilisator sel mast manusia (Weng *et al*, 2014). Diharapkan ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak mempunyai potensi stabilisator sel mast karena kandungan flavonoid, dan mampu menurunkan skoring adesi intra abdominal pasca laparoskopi.

Adesi intra abdominal masih merupakan masalah serius dalam pembedahan. Walaupun laparoskopi mampu menurunkan kejadian adesi intra-abdominal dari 95% menjadi 12%, namun belum mampu mengatasi masalah klinis adesi intra-abdominal. Faktor stres oksidatif, inflamasi, degranulasi sel mast dan penebalan matrik ekstra seluler (MES), diduga menyebabkan kerusakan sel mesotel yang memicu adesi intra-abdominal. Potensi bawang Dayak sebagai modulator inflamasi dan modulator stres oksidatif diharapkan mampu mencegah adesi intra-abdominal. Berdasarkan latar belakang diatas, hingga saat ini belum ada penelian tentang potensi bawang Dayak yang memodulasi inflamasi, modulasi stres oksidatif, stabilisator sel mast, untuk menghambat adesi intra abdominal pasca laparoskopi.

1.2. Rumusan Permasalahan

Berdasarkan latar belakang diatas, dirumuskan masalah sebagai berikut:
Apakah ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak mampu menurunkan modulasi inflamasi, modulasi stres oksidatif, jumlah dan degranulasi sel mast, ketebalan MES serta skoring adesi intra-abdominal pasca laparoskopi, pada hewan coba *Rattus norvegicus*.

1.2.1. Sub masalah

Berdasarkan permasalahan diatas, dirumuskan submasalah sebagai berikut:

1. Apakah terdapat perbedaan kadar TGF- β , IL-10 dan rasio TGF- β /IL-10 cairan peritoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi?
2. Apakah terdapat perbedaan kadar *Total Oxidant Status* (TOS), *Total Antioxidant Capacity* (TAC), *Oksidatif Stres Index* (OSI) cairan peritoneal dan kadar MDA jaringan peritoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi?
3. Apakah terdapat perbedaan jumlah sel mast dan persentase degranulasi sel mast, kadar *histamine*, *tryptase* dan *chymase* cairan peritoneal, pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi?
4. Apakah terdapat perbedaan ekspresi *zone-occludin 1* (ZO-1) jaringan peritoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi?
5. Apakah terdapat perbedaan ketebalan matrik ekstra seluler (MES) jaringan peritoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi?

6. Apakah terdapat perbedaan skoring adesi intra-abdominal dan perubahan mikroskopis pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peranan ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak terhadap modulasi inflamasi, modulasi stres oksidatif, jumlah dan degranulasi sel mast, ketebalan MES serta skoring adesi intra-abdominal pasca laparoskopi, pada hewan coba *Rattus norvegicus*.

1.3.1. Tujuan Umum

Mempelajari pengaruh ekstrak umbi bawang Dayak dalam menurunkan modulasi inflamasi, modulasi stres oksidatif, jumlah dan degranulasi sel mast, ketebalan MES serta skoring adesi intra-abdominal pasca laparoskopi melalui penurunan jumlah dan degranulasi sel mast.

1.3.2. Tujuan khusus

1. Memperoleh bukti adanya perbedaan kadar TGF- β , IL-10 dan rasio TGF- β /IL-10 cairan peritoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi.
2. Memperoleh bukti adanya perbedaan *Total Oxidant Status* (TOS), *Total Antioxidant Capacity* (TAC), *Oksidative Stress Index* (OSI) cairan peritoneal dan kadar MDA jaringan peritoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi.

3. Memperoleh bukti adanya perbedaan jumlah sel mast dan persentase degranulasi sel mast, kadar *histamine*, *tryptase* dan *chymase* cairan peritoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi.
4. Memperoleh bukti adanya perbedaan ekspresi *zone-occludin 1* (ZO-1) jaringan peritoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi.
5. Memperoleh bukti adanya perbedaan ketebalan matrik ekstra seluler (MES) jaringan peritoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi.
6. Memperoleh bukti adanya perbedaan skoring adesi intra-abdominal dan perubahan mikroskopis pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat teoritis

Menambahkan informasi keilmuan tentang patomekanisme terjadinya adesi intra-abdominal melalui modulasi stres oksidatif, modulasi inflamasi dan stabilisasi sel mast pasca laparoskopi oleh ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak.

1.4.2. Manfaat praktis

- a. Memberikan rekomendasi kepada peneliti selanjutnya tentang ekstrak bawang Dayak pada mekanisme/jalur modulator inflamasi.

- b. Memberikan rekomendasi kepada peneliti selanjutnya tentang ekstrak bawang Dayak pada mekanisme/jalur modulator stres oksidatif.
- c. Memberikan rekomendasi besar tekanan yang aman kepada operator laparoskopi.
- d. Memberikan rekomendasi kepada peneliti laparoskopi untuk melakukan penelitian tahap lanjut hingga pada manusia untuk mencegah komplikasi laparoskopi.
- e. Memberikan rekomendasi kepada departemen pertanian, untuk mengkaji dan memanfaatkan bawang Dayak dari tanaman liar menjadi tanaman budidaya obat sebagai pencegah adesi intra-abdominal pasca laparoskopi.

BAB 2

TINJAUAN KEPUSTAKAAN

2.1. ADESI INTRA ABDOMINAL

Adesi intra-abdominal adalah perlengketan tidak normal organ intra-abdomen, dihubungkan oleh jaringan berbentuk pita yang bervaskularisasi dan berinervasi akibat pembedahan. Perlengketan pasca pembedahan, mengakibatkan nyeri pelvis berkepanjangan, sumbatan usus dan infertilitas (Vase *et al*, 2010).

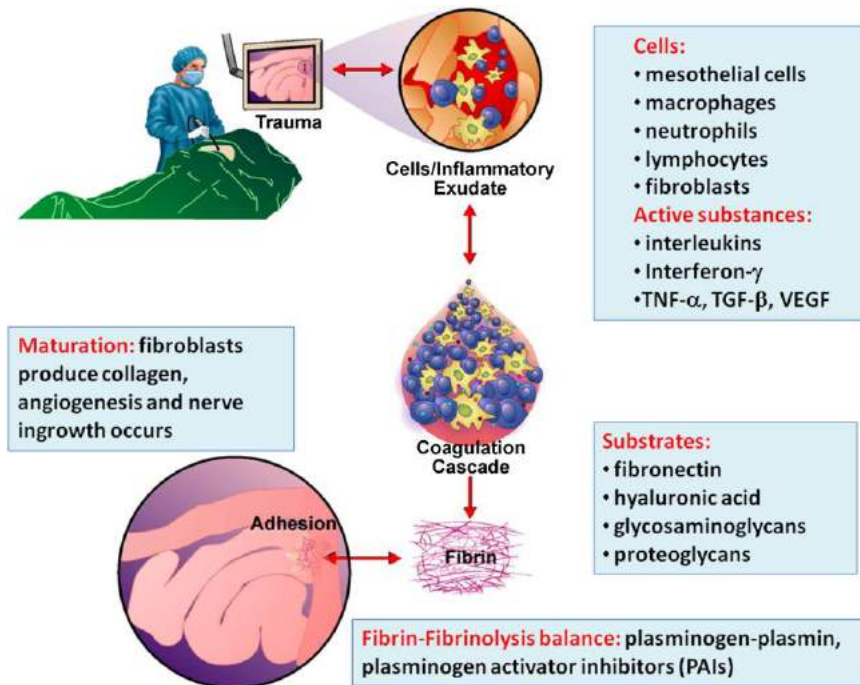
Beberapa tipe trauma pembedahan meningkatkan terjadinya adesi yaitu: cedera serosa, endotoksemia, manipulasi usus, distensi usus, desikasi serosa, iskemia jaringan dan traksi jaringan (Vase *et al*, 2010., Mutsaers *et al*, 2015).

2.1.1. Patogenesis adesi intra abdominal.

Cairan peritoneum normal mengandung plasma protein, terdiri dari mediator kimia (interleukin, interferon- γ , TNF- α , TGF- β , VEGF) dan residen sel (Maciver *et al*, 2011). Penyembuhan peritoneum pasca pembedahan ditentukan 2 proses:

- a. Proliferasi dan regenerasi sel mesotelial.
- b. Proses fibrinolisis.

Gangguan pada kedua mekanisme di atas, dapat menyebabkan adesi intra abdominal. (gambar 2.1)



Gambar 2.1 Mekanisme adesi intra-abdominal pasca laparoskopi. Cedera peritoneum dan organ intra abdominal lainnya, akan membentuk eksudat yang kaya sitokin pro-inflamatori dan beberapa tipe sel. Sitokin pro-inflamasi dan sel akan mengaktifkan kaskade koagulasi dan fibrin mesh. Fibrin mesh diabsorpsi atau maturasi menjadi jaringan adesi (Dikutip dari Maciver *et al*, 2011)

2.1.1.1 Faktor peritoneum dan seluler

Laparoskopi menyebabkan luruhnya sel mesotel dan terpaparnya membrana basalis dengan sel sekitar. Keadaan ini mencetuskan respon inflamasi lokal dan mengakibatkan sekresi cairan seroanguinus atau eksudat kaya fibrin. Eksudat fibrin merupakan komponen esensial pembentukan deposit fibrin pada penyembuhan peritoneum. Pada keadaan normal deposit fibrin akan mengalami resolusi. Bila deposit fibrin yang menetap, menyebabkan invasi fibroblas dan pembentukan vaskularisasi baru. Fibrin menjadi jaringan fibrous, adesi permanen, dan ditandai

dengan perubahan ketebalan matrik ekstra seluler dan pembentukan vaskularisasi baru (Hellebrekers *and* Kooistra, 2011., Maciver *et al*, 2011).

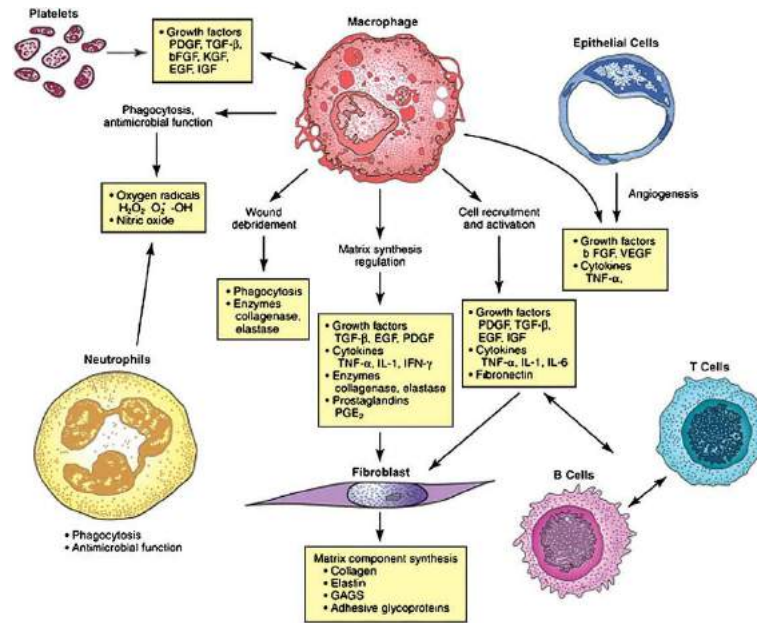
Hipoksia menyebabkan konversi normo-fibroblas menjadi adhesif-fibroblas. Adhesif-fibroblas mempunyai aktivitas fibrinolisis lebih rendah dibanding normal-fibroblas. Adhesif-fibroblas meningkatkan beberapa sitokin, faktor koagulasi dan enzim proteolitik yang berperan pada remodeling matrik ekstra seluler (MES). Fibrin terjadi karena aktivasi kaskade koagulasi, saat hemostasis, inflamasi dan penyembuhan jaringan. Aktivasi kaskade koagulasi melalui beberapa jalur. Mekanisme fibrinolisis terjadi agar struktur jaringan kembali normal (Hellebrekers *and* Kooistra, 2011., Lin *and* Hu, 2014).

Fibroblas berperan pada terjadinya adesi, jumlahnya meningkat pada minggu ke 2 pasca trauma. Pada minggu ke 3, pembentukan adesi intra-abdominal mencapai puncaknya (Maciver *et al.*, 2011). Fibroblas terdapat di peritoneum normal dan jaringan adesi. Ditemukan perbedaan fenotipe antara normo fibroblas dan adhesif fibroblas, terbukti bahwa efek hipoksia dan TGF- β pada produksi adhesif fibroblas (Rout *et al*, 2005).

Faktor seluler yaitu: neutrofil, makrofag, limfosit dan mesotel berperan pada cedera peritoneum (Maciver *et al*, 2011).

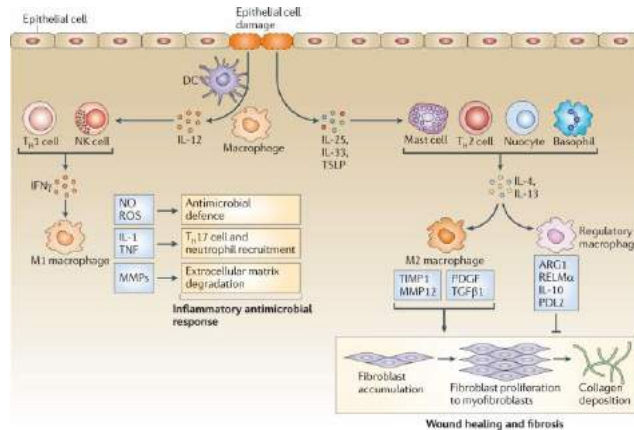
Mesotel merupakan residen sel terbanyak dalam rongga intra abdomen. Sekresi mediator yang dilepaskan mesotel, menentukan respon peritoneum terhadap cedera dan berperan pada terjadinya adesi. TGF- β merupakan salah satu mediator yang dilepaskan mesotel (Leung *et al*, 2000., Sammour, 2011).

Makrofag. Dalam tubuh makrofag menempati rongga tubuh yang strategis. Sebagai residen sel peritoneal, makrofag berperan pada proses ingestif jaringan mati, debris dan memberikan sinyal inflamasi (Gambar 2.2) (Murray *and* Wynn, 2011)



Gambar 2.2 Interaksi makrofag. Interaksi makrofag dengan sel sekitar dan mediator yang diproduksi. Makrofag berinteraksi dengan sel sekitar, menyekresi beberapa mediator penting pada penyembuhan luka, termasuk TGF- β yang memicu aktifitas fibroblas. (dikutip dari Teller *and* White, 2011)

Migrasi makrofag pada rongga intra abdomen terjadi pasca laparoskopi (Papparella *et al*, 2013). Residen makrofag akan melakukan fagosit jaringan yang cidera pada respon inflamasi (Sammour *et al*, 2010). Makrofag menyekresi *growth factor* termasuk TGF- β (Murray *and* Wynn, 2011). Aktivitas makrofag menyebabkan pembentukan kembali jaringan mesotelial (mesotelisasi) pada area trauma (Maciver *et al*, 2011). Aktivitas Makrofag berlebihan menyekresi TGF- β dan memicu terjadinya fibrosis (Teller *and* White, 2011)



Gambar 2.3 Makrofag mengatur inflamasi dan penyembuhan luka. Ketika jaringan mengalami kerusakan, mediator inflamasi akan dikeluarkan. Kaskade antifibrinolitik-koagulasi akan mengaktifkan pembekuan dan terbentuk MES. Makrofag juga menyekresi growth factor termasuk TGF- β . Pada tahap akhir komunikasi antar sel akan menghasilkan penyembuhan luka yang baik. Gangguan keseimbangan akan menyebabkan fibrosis. (dikutip dari Murray and Wynn, 2011)

Limfosit berperan pada aktivasi fagositosis makrofag, aktivasi dan proliferasi sel B dalam produksi antibodi. Sel Treg/Tr/Ts atau Th3 mengekspresikan IL-10 sebagai petanda supresif. IL-10 menghambat APC dan aktifasi makrofag, TGF- β menekan proliferasi sel T dan aktivasi makrofag (Baratawidjaja *and* Rengganis, 2014., Abbas *et al*, 2015).

Sel Mast berperan pada proses fisiologis dan patologis dalam tubuh, dijumpai diseluruh tubuh terutama pada *port de entry* di peri-vaskuler, peri-limfatik dan peri-neural (Kalesnikoff *and* Galli, 2008., Widjajanto, 2012). Perbedaan sifat dengan sel hemopoitik lainnya, yaitu: umur sel mast yang mencapai bulan-tahun, diduga memberikan respon berkepanjangan pada trauma, dan berperan pada kejadian fibrosis (Widjajanto, 2012., de Souza Junior *et al*, 2015). Laparosopi menyebabkan peningkatan sel mast pada hari ke 3 pasca operasi dan mencapai puncak hari ke 7. Diduga sel mast berperan pada pembentukan adesi dan proses

remodeling (Hermanowicz *et al*, 2010). Pneumoperitoneum menghasilkan radikal hidroksil (OH•) menyebabkan kerusakan membran sel mast akibat hidrolisis membran fosfolipid. Produksi TGF- β oleh degranulasi sel mast akan menstimulasi proliferasi fibroblas (Wu, 2011., Widjajanto, 2012). Peran sel mast pada proses patologi penyembuhan luka dan terjadinya jaringan parut, dibuktikan dengan ditemukan distribusi sel mast yang berlebihan (Beer *et al*, 1998), *tryptase* dan *histamine* pada jaringan parut (Beer *et al*, 1998., Maciver *et al.*, 2011). Penelitian membuktikan bahwa, protease sel mast (*tryptase/chymase*) dapat mencetuskan kejadian jaringan parut. *Tryptase/chymase* sel mast terbukti meningkatkan aktifitas TGF- β dan menurunkan afinitas *tight junction* sel, sehingga berpotensi sebagai protein pro-fibrotik (Bankova *et al*, 2014., Dong *et al*, 2014., de Souza Junior *et al*, 2015). Sel mast berperan pada proses patologi penyembuhan luka dan terjadinya jaringan parut. Peningkatan degranulasi sel mast dijumpai pada daerah adesi intra abdominal (Maciver *et al*, 2011).

Sel mast protease mempunyai peranan ganda pada proses inflamasi, sel mast *protease* mampu meningkatkan dan menurunkan inflamasi tergantung pada lingkungan mikro. Peranan sel mast *protease* pada mekanisme pro-inflamasi mengakibatkan ketebalan MES berlebihan (Pejler *et al*, 2010). Sel mast protease (*tryptase dan chymase*) merupakan mediator angiogenik yang kuat pada MES (de Souza Junior *et al*, 2015). Sel mast protease ketebalan MES dan lepasnya epitel (Lin *et al*, 2011)

Sel mast tryptase mengaktifkan *protease-activated receptor* (PAR)-2 dan mengganggu fusi endosome/lysosome sehingga merusak fungsi barier epitel (Li *et al*,

2014). *Tryptase* merupakan poten *growth factor* fibroblas dan memicu terjadinya fibrosis (Payne and Kam, 2004).

Sel mast *chymase* adalah suatu *chymotrypsin-like serine protease* yang berperan pada aktivasi angiotensin I dan mengaktifkan laten TGF- β . TGF- β aktif akan berikatan dengan fibroblas (Takai *et al*, 2003., Virupakshaiah and Rozindar, 2016). Secara langsung *chymase* memicu aktivasi PAR-2 (Groschwitz *et al*, 2013), meningkatkan permeabilitas sel epithelial dan struktur protein *tight-junction zone-occludine-1* (ZO-1) (Pejler *et al*, 2010) dan menyebabkan lepasnya ikatan antar sel (Groschwitz *et al*, 2013., Bankova *et al*, 2014). *Chymase* yang berlebihan menyebabkan influk sel inflamasi pada MES dan meningkatkan kejadian fibrosis (Takai *et al* , 2012., Virupakshaiah and Rozindar, 2016). *Chymase* meningkatkan pelepasan TGF- β 1 dan meningkatkan proliferasi fibroblas pada MES (Dong *et al*, 2015).

Degranulasi sel mast

Degranulasi sel mast terjadi karena trauma kimia, tekanan dan dingin (Pearce, 1985., Baratawidjaja and Rengganis, 2014). Trauma fisik, menyebabkan terbukanya kanal Ca²⁺ pada plasma membran (Pearce, 1985., Abbas *et al*, 2015). Influk Ca²⁺ mengakibatkan aktivasi sel mast (Cuong *et al*, 2016). Kehilangan kemampuan homeostasis Ca²⁺ pada sel, mengakibatkan cedera dan kematian sel (Dong *et al*, 2006., Ma and Beaven, 2011).

2.1.1.2 Faktor mediator humoral

Mediator humoral mempunyai peranan penting pada terjadinya adesi intra abdominal. TGF- β merupakan sitokin yang dominan sebagai mediator pro-fibrotik

(Maciver *et al*, 2011., Li *et al*, 2015). TGF- β and sitokin pro-inflammasi lainnya bekerjasama dalam sintesis kolagen (Yoshida *et al*, 2016). TGF- β berperan pada terjadinya adesi intra abdominal (Maciver *et al*, 2011). TGF- β -1 menghambat degradasi MES (Bujak *and* Frangogiannis, 2007). TGF- β berpengaruh pada kekuatan fibrosis (Pohlers *et al*, 2009).

2.2 Laparoscopi

Laparoscopi merupakan prosedur pembedahan minimal invasi, menggunakan kamera dan instrumen bedah yang dimasukkan melalui insisi kecil pada dinding abdomen. Laparoscopi dipakai untuk keperluan diagnostik dan terapeutik (Aldana *et al*, 2003., Baysal *et al*, 2009). Laparoscopi menggantikan laparotomi karena memiliki keuntungan, antara lain : trauma jaringan lebih minimal, masa penyembuhan lebih pendek, luka operasi kecil, nyeri pasca operasi lebih ringan, penyembuhan lebih baik, perdarahan minimal, mobilisasi dini, risiko *wound dehiscence* lebih kecil dan lebih baik secara kosmetik (Unsal *et al*, 2009., Cekic *et al*, 2014).

Untuk mendapatkan visualisasi yang adekuat, diperlukan insuflasi gas karbon dioksida (CO₂) pada rongga abdomen. Peningkatan insuflasi melebihi tekanan fisiologis rongga abdomen, suhu gas CO₂, sifat keasaman CO₂ dan durasi, mengakibatkan perubahan struktur mesotelial peritoneum dan gangguan hemodinamika (Cevrioglu *et al*, 2004., Papparella *et al*, 2013). Pneumoperitoneum menggunakan gas karbon dioksida (CO₂) murni menimbulkan konsekuensi negatif. Peningkatan tekanan intra-abdomen (TIA) menyebabkan iskemia splanknik dan

diikuti oleh cedera reperfusi setelah desuflasi (Baysal *et al*, 2009., Hendrickson, 2012). Cedera peritoneum akan meninggalkan area denudasi/gundul jaringan peritoneal (Volz *et al*, 1999., Neuhaus *and* Watson, 2004., Davey *et al*, 2013). Kondisi fisiologis homeostatik tekanan intra-abdominal rongga peritoneum berada pada 0-3 mmHg dan tekanan vena porta 7-10 mmHg (Cevrioglu *et al*, 2004., Sammour, 2011).

Peningkatan tekanan intra-abdomen akibat insuflasi gas CO₂, terbukti menyebabkan perubahan struktur permukaan sel mesotelial (Volz *et al*, 1999., Suematsu *et al*, 2001., Papparella *et al*, 2013). Perubahan karakteristik peritoneum dipengaruhi oleh komponen kimia, temperatur dan kelembaban, besar tekanan, tipe dan durasi gas yang digunakan (Binda *and* Koninckx, 2009., Supe *et al*, 2010).

Parameter	CO2	Helium	Udara biasa	Argon	N2O	Peneliti
Asidosis Respiratori	Tinggi	Kurang	-	Kurang	-	Bongarts <i>et al</i> , 1993 Junghans <i>et al</i> , 1997 Zou <i>et al</i> , 2015
Fungsi Respiratori	Tinggi	Kurang	-	tinggi	-	
Fungsi Hemodinamik	Tinggi	Kurang	-	Tinggi	-	
TNF- α	Rendah	Tinggi	-	-	-	Jacobi <i>et al</i> , 1998
IL-10	Tinggi	Tinggi	-	-	-	
Emboli	Mudah	More lethal	-	-	-	Wolf <i>et al</i> , 1994
Eliminasi	eliminasi < 24 jam	> 48 jam	< 24 jam	-	-	Suematsu <i>et al</i> , 2001
Inflamasi	Sedang	kurang	tinggi	-	-	
Perubahan struktur mesotel	Berat	ringan, tetapi lama pulih	sedang	-	-	Neuhaus <i>et al</i> , 2004

Tabel 2.1 Percobaan laparoskopi dengan beberapa macam gas

Beberapa macam gas telah diteliti sebagai gas insuflator pada laparoskopi, sebagai upaya mengurangi komplikasi akibat gas. Gas CO₂ tetap unggul dibanding dengan gas lain, karena : mudah dieliminasi oleh tubuh, mudah didapat dan bukan merupakan kelompok logam (Bongarts *et al*, 1993., Wolf *et al*, 1994., Junghans *et al*, 1997., Jacobi *et al*, 1998., Suematsu *et al*, 2001., Neuhaus *and* Watson, 2004., Zou *et al*, 2015).

2.2.1. Perubahan morfologi peritoneum pada laparoskopi

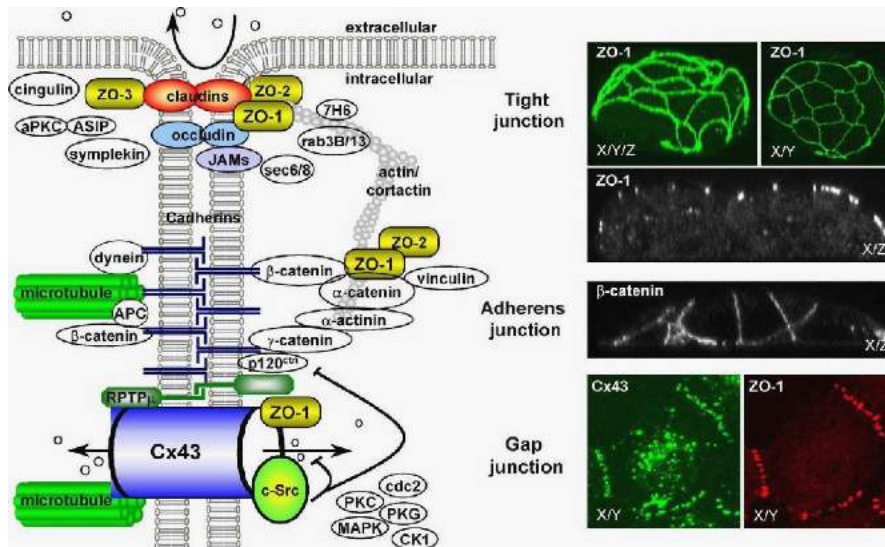
Perubahan struktur peritoneum berupa: penonjolan sel, pelebaran *intercellular junction*, terpaparnya membrana basalis, hingga lepasnya sel mesotel dari membran basalis (Erikoglu *et al*, 2005., Neuhaus *and* Watson, 2004., Davey *et al*, 2013)

2.2.2. Mekanisme pelepasan sel mesotel (mesothel detachment) pasca laparoskopi.

Mesotelial merupakan kesatuan sel mesotel terikat pada membrana-basalis, sisi apex bebas dan terpapar dengan matrik ekstra seluler. Sisi lateral sel membentuk ikatan satu dengan yang lain. Dua tipe *anchoring junction* dihubungkan dengan sitoskeleton. Pertama *adheren junction* yang diikat oleh *actin filament*, kedua *desmosomes* yang diikat oleh *intermediate filament*. Pada sisi membrana basalis terdapat *actin-linked-cell-matrix junction* yang terikat oleh *intermediate filament* (Khursheed *and* Bashyam, 2014., Albert *et al*, 2015).

2.2.2.1 Susunan protein *Intercellular Mesothel Junction*

Cell cell junction disusun oleh protein, perubahan struktur protein akan mengganggu susunan *cell cell junction* dan mengakibatkan lepasnya ikatan antar sel. (gambar 2.4) (Giepmans, 2004).



Gambar 2.4 Organisasi Molekuler dan *cell-cell junction* (interaksi antar sel). Komponen dan protein yang menyusun *cell-cell junction*. Protein ZO-1 merupakan protein yang menyusun *cell-cell junction*. Gambaran *cell cell junction* dengan mikroskop konfokal (dikutip dari Giepmans, 2004).

Tight junction, *desmosome*, *gap junction* dan *adherent junction* semuanya diikatan oleh protein Zone-Occludin-1 (ZO-1). Perubahan struktur ZO-1 akan mengakibatkan lepasnya ikatan antar sel (Giepmans, 2004).

2.2.3. Stres Oksidatif pada laparoskopi

Kondisi fisiologis rongga peritoneum berada pada tekanan intra abdominal sebesar 0-3 mmHg. Peningkatan tekanan intra abdominal akibat insuflasi, akan memicu perubahan struktur peritoneum (Sammour, 2011). Pada tubuh manusia, tekanan intra abdominal sebesar 15 mmHg atau lebih menyebabkan turunnya aliran darah pada peritoneum parietal. Pneumoperitoneum diyakini menyebabkan trauma iskemia peritoneum parietal dan organ splanknik (Cevrioglu *et al*, 2004., Gutt *et al*, 2004).

Tekanan 10 – 12 mmHg berpotensi terjadi stres oksidatif. Radikal bebas yang terjadi, berpotensi menimbulkan proses patologis termasuk adesi intra abdominal (Yiannakoupoulou *et al*, 2013). Spesies Oksigen Reaktif (SOR) adalah senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif (Halliwell dan Whiteman, 2004., Suhartono *et al*, 2007). Peritoneum adalah jaringan kapiler yang luas dan jaringan limfe pada sub-mesotelial jaringan penghubung. Struktur ini menyebabkan peritoneum mensekresikan SOR antara lain: anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$), hidrogen peroksida (H_2O_2), serta radikal hidroksil (OH^{\cdot}) sebagai responnya terhadap cedera (Cevrioglu *et al*, 2004., Veekash *et al*, 2010).

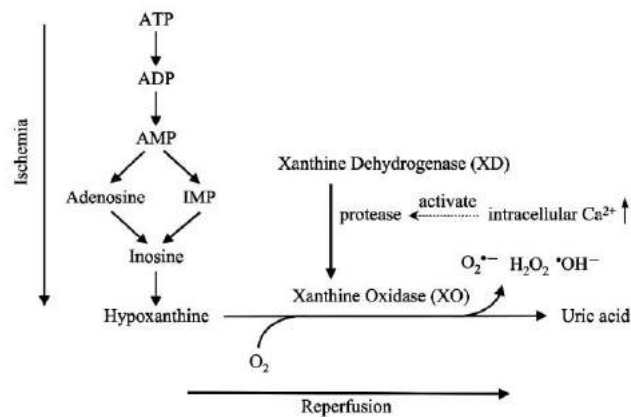
Peningkatan tekanan intrabdomen pada laparoskopi menyebabkan pembentukan radikal bebas. Pembentukan radikal bebas menginduksi peroksidase lipid dan menurunkan kapasitas modulator stres oksidatif. Mekanisme pembentukan radikal bebas sesuai dengan fenomena iskemia-reperfusi akibat insuflasi dan desuflasi pneumoperitoneum (Glantzounis *et al*, 2001). Peritoneum tersusun atas jaringan kapiler luas dan jaringan limfe pada sub-mesotelial mampu menyekresikan senyawa oksigen reaktif (SOR). Pembentukan oksidan terjadi dalam rentang waktu 2-5 menit segera setelah reperfusi organ intestinal yang mengalami iskemia. (Sasaki *and* John, 2007). Pembentukan oksidan diyakini berasal dari rantai transpor elektron mitokondria, metabolisme *xantin oksidase* (XO), sel endotel, prostaglandin, dan neutrofil teraktivasi (Liu *et al*, 2004., Sasaki *and* John, 2007).

Superoksida memiliki sifat lebih efisien sebagai agen pereduksi dibandingkan oksidasi. Enzim SOD akan mengkatalisis superoksida ($O_2^{\cdot-}$) dan membentuk hidrogen peroksida (H_2O_2). Superoksida juga berperan dalam

pembentukan radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) melalui reaksi Haber-Weiss sebagai berikut. (Sasaki *and* John, 2007):



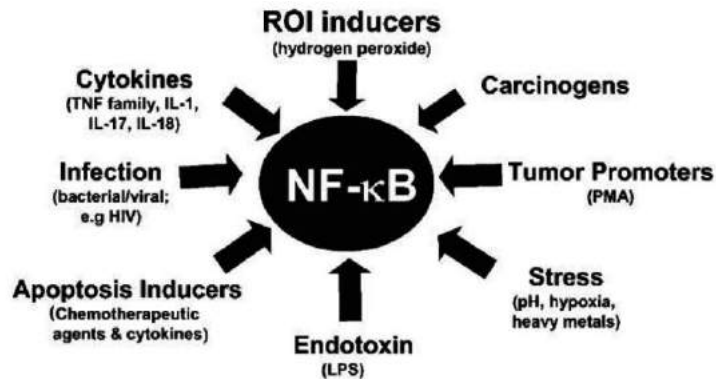
Senyawa Oksigen Reaktif juga dibentuk melalui reaksi yang dikatalisis oleh enzim xantin oksidase. Mukosa intestinal memiliki kapasitas sangat besar untuk mengoksidasi hipoxantin melalui xantin oksidase yang terdapat pada semua jaringan sehat sebagai xantin dehidrogenase (XD). Pada kondisi iskemia, XD akan dikonversi secara cepat menjadi XO oleh enzim protease yang diaktifkan oleh iskemia (*ischemia-mediated protease*), dan XO dapat mereduksi molekul oksigen menjadi radikal superoksida ($\text{O}_2^{\cdot-}$) serta hidrogen peroksida (H_2O_2) (Sasaki *and* John, 2007). Mekanisme pembentukan radikal bebas melalui XO dijelaskan pada gambar berikut :



Gambar 2.5 Mekanisme pembentukan radikal bebas oleh xantin oksidase (dikutip dari Sasaki *and* John, 2007)

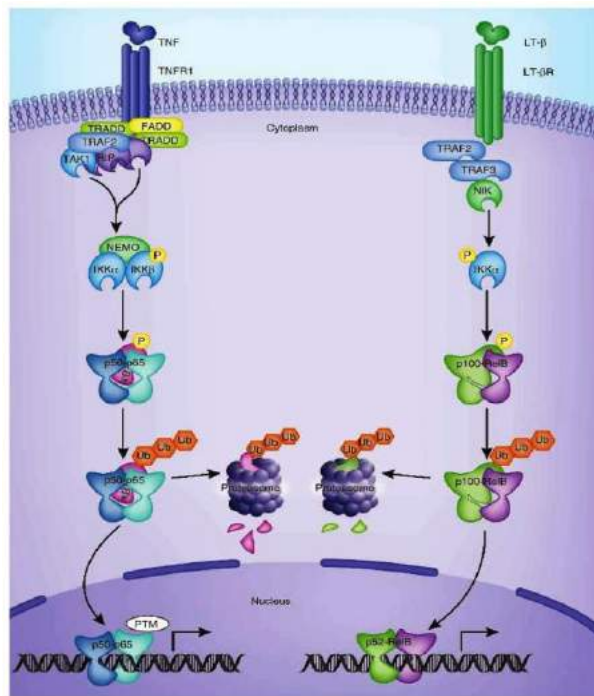
2.2.4 Mekanisme inflamasi melalui aktivasi NF κ B pada laparoskopi.

Aktivasi NF κ B dipicu oleh stimulus yang bersifat multipel dan kompleks. Senyawa oksigen reaktif, stres karena hipoksia, sitokin dapat mengaktifkan NF κ B (Gambar 2.6) (Garg *and* Aggarwal, 2002).



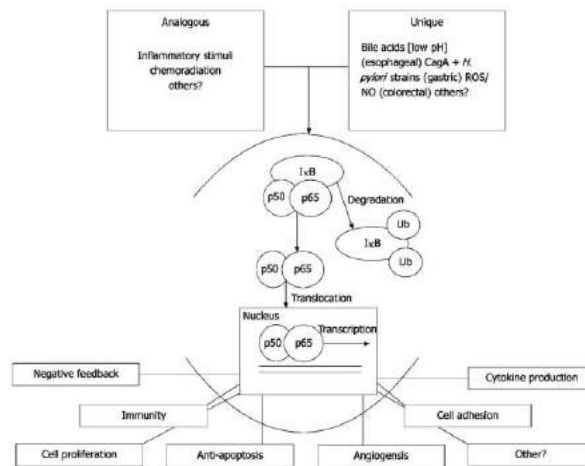
Gambar 2.6 Aktivasi NFκB dipicu oleh berbagai stimulus (dikutip dari, Garg *and* Aggarwal, 2002)

Aktivasi NFκB menyebabkan translokasi p50 dan p65 ke dalam nucleus melalui jalur canonical dan translokasi p52 dan RelB melalui jalur non canonical ke dalam nukleus (Morgan *and* Liu, 2011., Oekinghaus *et al*, 2011).



Gambar 2.7 Jalur aktivasi NFκB. Canonical pathway menyebabkan translokasi p50 dan p65 ke dalam nukleus. Noncanonical pathway menyebabkan p52 dan RelB ke dalam nukleus (Dikutip dari Oeckinghaus *et al*, 2011).

Stimulus inflamasi (termasuk TGF- β) mencetuskan fosforilasi sisi aktif I κ B dan menyebabkan aktivasi dari IKK α , IKK β dan IKK γ (NEMO). gambar 2.13 (Morgan *and* Liu, 2011., Gambhir *et al*, 2015).



Gambar 2.8 Stimulasi canonical pathway. Stimulasi canonical pathway menyebabkan ekspresi protein yang ditentukan oleh NF κ B. Stimulasi akan menginduksi inflamasi. Senyawa oksigen reaktif (SOR) berperan pada aktivasi NF κ B. (dikutip dari Gambhir *et al*, 2015).

Senyawa oksigen reaktif berinteraksi dengan NF κ B di jalur sinyal NF κ B. Senyawa oksigen reaktif menyebabkan aktivasi degradasi IKK (Morgan *and* Liu, 2011).

2.3. Bawang Dayak

Bawang Dayak (*Eleutherine* Sp) merupakan tanaman herbal, dengan ciri bulbus (umbi) tanaman berwarna merah. Komposisi daun berpasangan, bersirip ganda, tulang daun sejajar, tepi daun licin dan berbentuk pita. Bunga berukuran mungil, berkelopak lima dan berwarna putih. Bulbus (umbi) berbentuk bulat lonjong, memanjang sebesar biji nangka dan berwarna merah. Bulbus (umbi) berasa pahit dan jika dimakan lidah akan terasa keras seperti minum air panas. Bagian yang digunakan untuk obat adalah daun dan bulbus (umbi) nya (Saleh, 2010). Bawang

Dayak mampu beradaptasi pada berbagai iklim dan struktur tanah. Tanaman ini dapat dibudidayakan dan dipanen dengan cepat (Paramapojn *et al.*, 2008).

Di Kalimantan, bulbus (umbi) bawang Dayak digunakan untuk pengobatan. Penelitian Setyowati *et al* membuktikan bahwa bawang Dayak memiliki manfaat untuk penyembuhan luka (Setyowati, 2010). Analisa fitokimia membuktikan, bawang Dayak mengandung bahan aktif naphthoquinon dan anthraquinon, flavonoid, tannin dan phenol. Bahan aktif diketahui memiliki kemampuan modulator inflamasi dan modulator stres oksidatif (Han *et al*, 2008., Song *et al*, 2009).



Klasifikasi Bawang Dayak
(*Eleutherin amerinana* L merr)

Kingdom	: plantae
Divisi	: spermatophyte
Sub-divisi	: angiospermae
Kelas	: monocotyledonae
Ordo	: liliales
Famili	: iridaceae
Genus	: eleutherine
Spesies	: <i>Eleutherine Americana</i> L. Merr

Diunduh dari
<http://www.ecplaza.net/trade-leads-seller/eleutherine-palmifolia-7806106.html> pada tanggal 28/12/2016

Bawang Dayak diklasifikasikan sebagai berikut: kingdom (*plantae*), divisi (*spermatophyte*), sub divisi (*angiospermae*), kelas (*monocotyledonae*), ordo (*liliales*), famili (*iridaceae*), genus (*eleutherine*), spesies (*Eleutherine Americana* L. Merr). Bawang Dayak memiliki beberapa nama daerah di Indonesia : si marbawang-bawang (Sumatera Utara), brambang sabrang (Jawa), bawang sabrang (Sunda), bawang

Dayak (Pontianak), bawang hutan (Kalimantan Timur), bawang tiwai (Kutai) (Ifesan *et al*, 2009., Song *et al*, 2009).

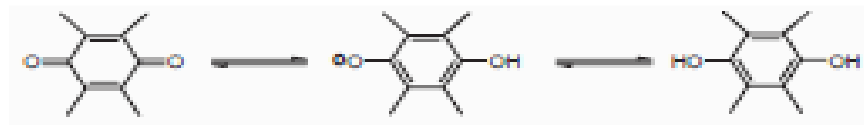


Gambar 2.9 **Bulbus (umbi) bawang Dayak.** Bulbus (umbi) bawang Dayak berbentuk bulat lonjong, memanjang sebesar biji nangka dan berwarna merah (dikutip dari Nur, 2011).

2.3.1 Bahan aktif bawang Dayak

Napthoquinon merupakan metabolit sekunder disintesis melalui jalur asetat dan malonat (plumbagin), jalur kombinasi shikimat/suksinil CoA (lawsone) dan jalur shikimat/melavonat (alkannin) (Babula *et al*, 2009).

Napthoquinon memiliki struktur dan aktivitas sebagai modulator inflamasi. Napthoquinon sebagai inhibitor kuat terhadap transpor elektron menghambat pelepasan sitokin, *Nucleus Factor kappa Beta* (NF- κ B) (Babula *et al*, 2009., Pinho *et al*, 2011). Siklus redoks quinon diawali reduksi satu atau dua elektron. Mekanisme reaksi turunan quinon sebagai modulator stres oksidatif karena kemampuannya sebagai akseptor elektron (Kuntorini, 2013).



Gambar 2.10 **Mekanisme Quinon sebagai Modulator stres oksidatif** (dikutip dari Kuntorini, 2013)

Penelitian terdahulu membuktikan flavonoid mampu menekan sitokin pro-inflamasi dan merupakan modulator stres oksidatif kuat. Aktivitas modulator stres oksidatifnya karena kemampuan donor Hidrogen. Mekanisme kemampuan modulator stres oksidatif dapat dilihat sebagai berikut (Pinho *et al.*, 2011):



Flavonoid dapat menghambat peroksidase berperan sebagai peredam anion superoksid dan radikal hidroksil. Flavonoid menghambat siklooksigenase dan lipooksigenase yang berperan dalam inflamasi, sehingga terjadi degranulasi neutrofil (Sandhar *et al.*, 2011).

Alkaloid, menghambat pergerakan neutrofil dan monosit dan transformasi limfosit. Kemampuan modulator inflamasinya menekan pelepasan dan aktivitas sitokin inflamasi. **Terpenoid** terbukti menekan aktivitas NF- κ B dan produksi NO secara efektif (Beg *et al.*, 2011).

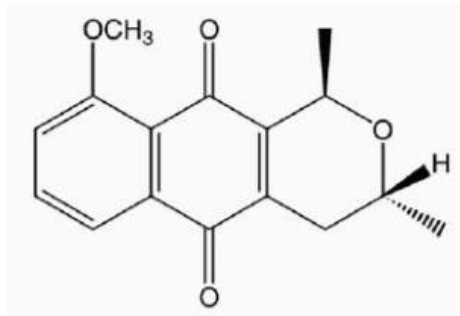
2.3.2 Kemampuan Modulator inflamasi, Modulator stres oksidatif dan potensi penstabil Sel Mast bawang Dayak

Penelitian membuktikan kemampuan modulator stres oksidatif dan modulator inflamasi bawang Dayak karena kandungan fitokimia bawang Dayak antara lain: derivat naftokuinon, flavonoid, alkaloid, glikosida, senyawa fenol, terpenoid.

Efek modulator stres oksidatif. Bawang Dayak mempunyai kemampuan modulator stres oksidatif pada struktur mikro anatomi tubulus seminiferus tikus jantan. Pemberian ekstrak etanol bulbus (umbi) bawang Dayak dengan dosis 60 mg/kg BB dan 90 mg/kg BB meningkatkan jumlah spermatid akibat radikal bebas asap rokok. (Ernawati *and* Nurliani, 2012). Terbukti efek modulator stres oksidatif

ekstrak etanol bulbus (umbi) bawang Dayak menurunkan kerusakan dinding bronkioli dan alveolus paru-paru tikus (Nur, 2011., Nurliani *et al*, 2012).

Aktivitas modulator stres oksidatif berhubungan dengan umur bawang Dayak. Penelitian membuktikan aktivitas modulator stres oksidatif usia tanaman 12 minggu terbukti lebih kuat dibanding usia 6 minggu. Bawang Dayak usia 12 minggu memiliki berkas pengangkut dengan ukuran dan jumlah sel lebih banyak, sehingga transpor dan akumulasi metabolit sekunder lebih baik (Kuntorini, 2013). Senyawa (-)-isoeleutherin, (+)-eleutherin mempunyai antiinflamasi yang kuat (Han *et al*, 2008) mampu menghambat aktivasi transkripsional NF- κ B sebagai faktor penting pada regulasi ekspresi enzim dan gen sitokin pro-inflamasi (Song *et al*, 2009).



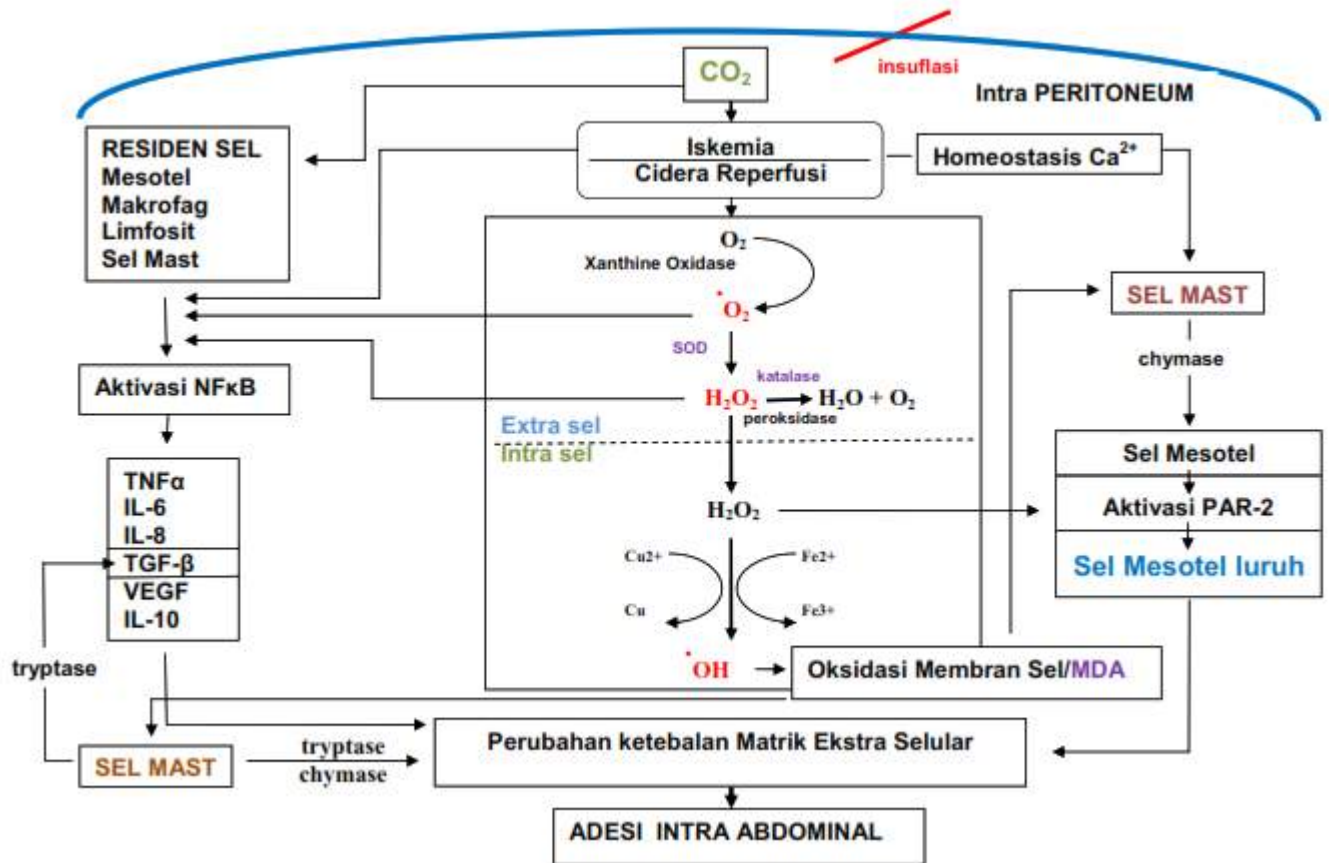
Gambar 2.11 Skema (-)-isoeleutherin. Struktur (-)-isoeleutherin yang diisolasi dari bulbus (umbi) bawang Dayak (Dikutip dari Song *et al*, 2009).

Derivat naftokuinon bawang Dayak, eleutherine, iso-eleutherine, eleutherol, eleuthone, isoeleuthoside mempunyai efek modulator inflamasinya (Govindappa *et al.*, 2011). Derivat flavonoid , 3',4,5,7'-tetrahydroxy-3-methoxy luteolin (methlut), mempunyai potensi inhibitor pada sel mast lebih kuat dibanding luteolin dan cromolyn. Mekanisme methlut melalui inhibisi sekresi β -hexosaminidase dan histamin. (Weng *et al*, 2014).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka teori



Gambar 3.1 Kerangka teori

Pneumoperitoneum

Gas karbon dioksida (CO₂) standar digunakan secara universal pada proses insufflasi pembedahan laparoskopi. Untuk mendapatkan visualisasi yang baik, diperlukan insufflasi gas CO₂. Insufflasi gas CO₂, umumnya dilakukan pada tekanan 10 – 15 mmHg. Tekanan intra-abdominal (TIA) melebihi tekanan fisiologis rongga

abdomen (0 – 3 mmHg) dan tekanan fisiologis vena porta (7 – 10 mmHg) dan terbukti menurunkan perfusi rongga peritoneum secara signifikan (Cevrioglu *et al*, 2004., Gutt *et al*, 2004., Bayzal *et al*, 2009., Sammour, 2011., Papparella *et al*, 2013).

Penurunan perfusi rongga peritoneum menyebabkan iskemia organ dalam rongga peritoneum. Iskemia splanknik mengakibatkan metabolisme anaerob sel, dan terjadi pemecahan *Adenosin Tri Phospat* (ATP) menjadi *Adenosin Di Phospat* (ADP), dan memicu terbentuknya *Hypoxanthine*. Pada kondisi iskemia terjadi pembentukan *Xanthine Oxidase* (XO), yang berasal dari *Xanthine Dehydrogenase* (XD). Perubahan XD menjadi XO, merupakan reaksi yang terjadi karena enzim protease. Enzim protease diaktifkan karena peningkatan kadar kalsium (Ca^{2+}) pada kondisi iskemia. Saat desuflasi, terjadi aliran darah yang kaya oksigen (O_2) ke sirkulasi splanknik. Hypoxanthine bereaksi dengan O_2 , membentuk Senyawa Oksigen Reaktif (SOR) antara lain: superoksida ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$). Pembentukan SOR terjadi karena enzim XO (Sasaki *and* John, 2007)

Peningkatan $\text{O}_2^{\cdot-}$ memicu aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD), enzim SOD mengkatalis perubahan $\text{O}_2^{\cdot-}$ menjadi H_2O_2 (Sasaki dan John, 2007). Molekul $\cdot\text{OH}$ berasal dari senyawa H_2O_2 melalui reaksi Fenton yang melibatkan logam Fe dan atau reaksi Harber-Weiss yang melibatkan logam Cu, H_2O_2 merupakan oksidan kuat yang stabil dan mampu menembus membran sel (Kant, 2011). Radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$) menyebabkan reaksi acak dengan molekul penyusun membran, mengakibatkan kerusakan biologis dengan menstimulasi reaksi struktur rantai lipid membran fosfolipid. Kerusakan membran sel mengakibatkan lepasnya sel serta

organelnya (Sasaki *and* John, 2007., Kant *et al*, 2011). Reaksi peroksidasi lipid pada sel terukur sebagai malonaldehid (MDA).

Omentum mayus merupakan akumulasi jaringan limfoid yang disebut *milky spot*. Pada keadaan normal komposisi *milky spot* mengandung: 70% makrofag, 10% limfosit T, 10% limfosit B dan 10% sel mast. *Milky spot* juga diidentifikasi di beberapa area intra peritoneum. Iskemia dan SOR akan memicu residen sel peritoneal dan menyekresi mediator TGF- β melalui aktivasi NF κ B (Sammour *et al*, 2010, Maciver *et al*, 2011., Teller *and* White, 2011., Baratawidjaja *and* Rengganis, 2014., Abbas *et al*, 2015). Peritoneum mengatur proliferasi dan diferensiasi sel residen sebagai pertahanan lokal peritoneum (Kuhry *et al*, 2004).

Hipoksia berpengaruh pada regulasi *growth factor* termasuk TGF- β (Saed *et al*, 2002). TGF- β mempunyai peran penting dalam peningkatan fibroblas dan ekspresi gen, pada pembentukan MES. Fibrosis dipicu melalui peningkatan pembentukan kolagen, sistesa fibronektin dan penurunan degradasi matrik (Shuang, 2015., Yoshida *et al*, 2016). TGF- β memicu residen sel peritoneal termasuk sel mesotel meningkatkan sintesa PAI-1 dan sitokin lainnya, sehingga mempercepat migrasi dan proliferasi adesif fibroblas (Brokelman *et al*, 2011., Zhou *et al*, 2016). TGF- β sebagai sitokin pro-fibrotik dapat digunakan sebagai indikator terjadinya adesi intra abdominal.

Interleukin-10 (IL-10) mempunyai efek multipel dan pleotropik, berperan pada imunoregulasi dan inflamasi. (Mosser *and* Zhank, 2008). IL-10 merupakan sitokin menghambat fibrosis dan menghambat aktifitas NF κ B (Sharma *et al*, 2009). Sel mast sebagai residen sel peritoneal juga memproduksi IL-10 (Grimbaldeston *et*

al, 2007). Pemberian eksogen IL-10 terbukti menurunkan kejadian adesi intra abdominal pada percobaan tikus (Maciver *et al*, 2011., Beyene *et al*, 2015). Sitokin di dalam cairan peritoneal pasca trauma, terbukti mempunyai peran penting dalam pembentukan adesi. Pengukuran TGF- β dan IL-10 cairan peritoneal, dapat dipakai sebagai indikator fibrosis dan anti-fibrosis rongga abdomen (Beyene *et al*, 2015).

Kerusakan membran sel akibat $\cdot\text{OH}$, bisa terjadi pada sel mast sebagai residen sel rongga peritoneum (Sasaki *and* John, 2007., Kant *et al*, 2011). Mekanisme lain degranulasi sel mast, terjadi akibat kegagalan hemostasis Ca^{2+} di dalam sel. (Dong *et al*, 2006., Ma *and* Beaven, 2011). Degranulasi sel mast mengakibatkan keluarnya granula sel mast, khususnya *tryptase* dan *chymase*. Enzim *tryptase* dan *chymase* berperan pada keseimbangan pembentukan matrik ekstra seluler. Kelebihan enzim diatas menyebabkan pembentukan kolagen berlebihan, sehingga memicu terjadinya adesi intra abdominal. Peningkatan jumlah dan degranulasi sel mast diduga dapat diidentifikasi pada omentum mayus, mesenterium dan peritoneum (Ibrahim *et al*, 2006., Ibrahim *et al*, 2008).

Mediator penting cedera reperfusi ialah radikal bebas. Hidrogen peroksida (H_2O_2) merupakan sumber radikal bebas saat hipoksia, memicu terbentuknya TGF- β . Peningkatan Ca^{2+} intraseluler sebagai respon metabolisme adaptif intraseluler, akan membentuk kompleks kalsium pirofosfat dan pembentukan asam urat yang dikenal sebagai inflamasom. Inflamasom termasuk molekul – molekul adaptor yang memediasi peningkatan dan sekresi sitokin pro-inflamasi melalui aktivasi NF- κB (Lutz *et al*, 2010., Ashraf *et al*, 2012).

Sel mast tryptase dan chymase menstimulasi aktivasi (PAR)-2 dan merusak fungsi barier epitel. Kedua sel mast protease, mengubah struktur ZO-1 sebagai protein *tight junction*. Perubahan struktur protein tight junction mengakibatkan ikatan antar sel. Pelepasan struktur mesotel peritoneal, akan memicu terjadinya adesi intra abdominal (Pejler *et al.*, 2010., Groschwitz *et al.*, 2013., Li *et al.*, 2014).

Matrik Ekstra Seluler (MES) merupakan komponen penting dari jaringan. MES mempunyai peran penting pada biokimia dan biofisika pada morfogenesis, diferensiasi dan hemostasis jaringan. Penggunaan gas CO₂ standar yang dingin dan kering, mengakibatkan penguapan dan perubahan struktur dari MES. Perubahan struktur MES mengakibatkan perubahan struktur protein MES. Perubahan struktur protein mengakibatkan perubahan proses sinyal serta ekspresi gen yang meningkatkan inflamasi dan sel molekul adesi. Sel inflamasi akan menginfiltrasi struktur MES yang berubah. Perubahan struktur MES akan menarik TGF- β yang akan memicu perubahan fibroblas menjadi mio-fibroblas. Resultan efek dari proses diatas adalah perubahan ketebalan MES yang mengarah pada proses adesi intra peritoneum.

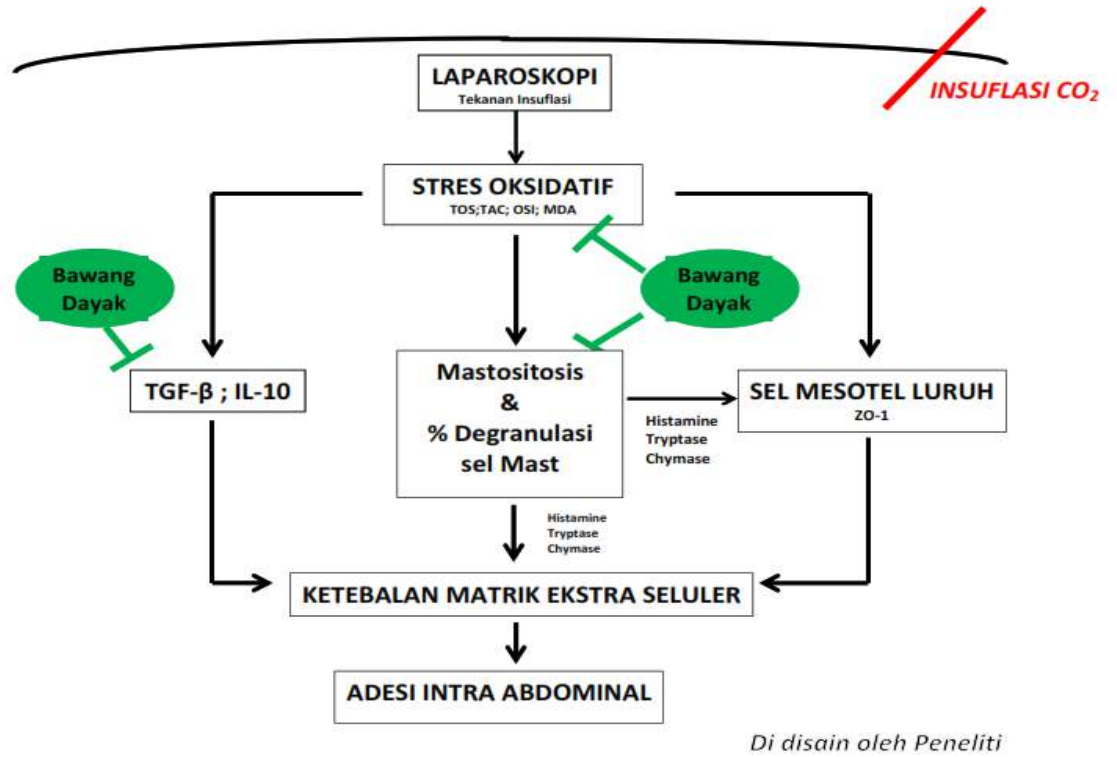
Adesi intra peritoneum adalah perlengketan antar organ intra-abdominal atau perlengketan organ intra-abdominal dengan dinding dalam abdomen. Adesi intra-abdominal terjadi akibat kerusakan peritoneum parietal dan/atau peritoneum viseral. Kerusakan peritoneum mengakibatkan membrana basalis serta MES terpapar dengan jaringan sekitar. Proses diatas akan mengakibatkan perubahan ketebalan MES yang mengarah pada adesi intra peritoneum. Perubahan ketebalan MES diakibatkan akumulasi efek dari: fisik sifat gas CO₂ murni yang dingin dan kering,

stres oksidatif akibat iskemia dan cedera reperfusi, proses inflamasi dan luruhnya sel mesotel dari membrane basalis.

Ekstrak etanol bulbus (umbi) bawang Dayak terbukti memiliki khasiat modulator stres oksidatif yang kuat. Derivat quinon bulbus (umbi) bawang Dayak mempunyai kemampuan sebagai akseptor elektron. Siklus redoks quinon diawali dengan reduksi

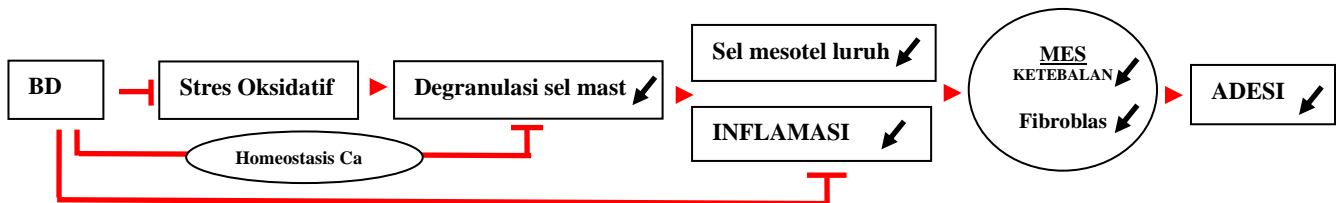
satu atau dua elektron. Reduksi satu elektron quinon dikatalase oleh enzim NADPH-sitokrom P450 reduktase, dan menghasilkan semi-quinon yang tidak stabil. Quinon mampu memberikan elektron ke molekul oksigen. Derivat flavonoid sebagai pendonor hidrogen, mampu menghambat peroksidase lipid karena mampu meredam superoksida (O_2^-) dan radikal hidroksil ($\cdot OH$). Kemampuan modulator stres oksidatif bulbus (umbi) bawang Dayak menghambat oksidan yang mencetuskan aktivasi NFkB akibat SOR. Derivat quinon, flavonoid dan senyawa polifenol terbukti mempunyai kemampuan modulator inflamasi.

3.2 Kerangka penelitian dan hipotesa



Gambar 3.2 Kerangka Penelitian

HIPOTESA



Gambar 3.3 Hipotesa penelitian

Insufiasi gas CO₂ dilakukan pada tekanan 5 mmHg, 8 mmHg, 10-12 mmHg disebutkan sebagai tekanan pneumoperitoneum rendah, sedang, dan tinggi. Tekanan insufiasi yang dilakukan melebihi tekanan fisiologis rongga abdomen.

Pneumoperitoneum mengakibatkan penurunan perfusi rongga peritoneum, menyebabkan iskemia splanknik. Iskemia splanknik mengakibatkan pernafasan anaerob sel mesotel peritoneum. Pemecahan ATP menjadi AMP memicu terbentuknya *hypoxanthine*. Peningkatan Ca²⁺ sitosol akibat iskemia jaringan, mengaktifkan enzim protease yang merubah XD menjadi XO. Pada saat desufiasi, terjadi aliran darah yang kaya O₂. Hypoxanthine akan bereaksi dengan O₂ membentuk SOR antara lain: superoksida (O₂⁻), hidrogen peroksida (H₂O₂) dan radikal hidroksil (·OH).

Peningkatan superoksida (O₂⁻) memicu peningkatan SOD. Perubahan O₂⁻ menjadi H₂O₂ merupakan reaksi katalis oleh enzim SOD. Perubahan molekul H₂O₂ menjadi molekul ·OH, melalui reaksi Fenton yang melibatkan logam Fe, dan atau reaksi Harber-Weiss yang melibatkan logam Cu. Molekul H₂O₂ merupakan oksidan kuat yang mampu menembus sel.

Iskemia secara langsung mempengaruhi metabolisme sel mesotel. Gangguan sistem pada membran sel, peningkatan kadar Ca²⁺ dalam sitoplasma memicu luruhnya sel mesotel dari membran basalis. Peningkatan *tryptase* dan *chymase* akibat degranulasi sel mast mengaktifkan (PAR)-2, sehingga terjadi peningkatan permeabilitas epitel. Struktur protein ZO-1 sebagai komponen *tight junction* akan berubah. Perubahan struktur protein mempengaruhi stabilitas ikatan antar, dan menyebabkan lepasnya ikatan antar sel.

Sifat fisik CO₂, iskemia jaringan dan SOR memicu residen sel peritoneum. Molekul ·OH dan molekul H₂O₂ memicu lepasnya ikatan inaktif NF-κB. Lepasnya ikatan inaktif NF-κB, menyebabkan translokasi gen p50 dan p65 ke dalam nukleus dan NF-κB akan teraktifasi. Dengan aktifasi NF-κB, sitokin proses inflamasi akan dilepaskan dalam rongga peritoneum.

Molekul ·OH menyebabkan oksidasi membran sel melalui peroksidasi lipid, termasuk membran sel mast. Kerusakan dan stimulasi membran sel mast menyebabkan degranulasi sel mast. Granula dalam sel mast akan keluar ke dalam rongga peritoneum, terutama protease. Peningkatan *tryptase* dan *chymase* yang merupakan protease utama sel mast, akan mempengaruhi ketebalan matrik ekstra seluler.

Luruh sel mesotel mengakibatkan MES akan terpapar. Suhu dingin gas CO₂ menyebabkan evaporasi MES dan memicu terjadinya adesi. Terpaparnya MES menyebabkan perubahan susunan protein matrik, yang memicu aktifasi proses inflamasi.

Perubahan ketebalan MES akan memicu terjadinya adesi intra-peritoneum. Peran penting MES pada morfogenesis, diferensiasi, dan hemostasis jaringan, ditentukan oleh susunan biokimia dan biofisika. Perubahan ketebalan MES menyebabkan perubahan proses sinyal dan ekspresi gen inflamasi dan adesi.

Efek modulator stres oksidatif ekstrak etanol bulbus (umbi) bawang Dayak diharapkan mampu menghambat stres oksidatif pada pembedahan laparoskopi. Derivat quinon sebagai akseptor elektron dan derivat flavonoid pendonor hidrogen menurunkan gangguan ekspresi gen APC. Kemampuan modulator stres oksidatif

ekstrak etanol bulbus (umbi) bawang Dayak menghambat perubahan transkripsi gen NFkB, diharapkan menurunkan derajat inflamasi pasca laparoskopi. Ditambah kemampuan senyawa polifenol sebagai modulator inflamasi, diharapkan perubahan biokimia MES tidak terlalu besar. Diharapkan ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak mengandung senyawa derivat flavonoid , 3',4,5,7'-tetrahydroxy-3-methoxy luteolin (methlut), dan terbukti mempunyai potensi stabiliser pada sel mast manusia.

3.3 Hipotesis penelitian

Berdasarkan latar belakang, rumusan masalah, kerangka teori dan kerangka penelitian diajukan hipotesis penelitian sebagai berikut:

Ada penurunan jumlah dan degranulasi sel mast, serta skoring adesi intra abdominal kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi dibanding kelompok kontrol.

3.3.1 Sub-hipotesis penelitian

1. Ada penurunan kadar TGF- β , IL-10 dan rasio TGF- β / IL-10 cairan peritoneal pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi dibanding kelompok kontrol.
2. Ada penurunan kadar Total Oxidant Status (TOS), Total Antioxidant Capacity (TAC) cairan peritoneal, Oksidatif Stres Indek (OSI) dan kadar MDA jaringan peritoneum pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi dibanding kelompok kontrol.
3. Ada penurunan jumlah sel mast dan persentase degranulasi sel mast, kadar *histamine*, *tryptase* dan *chymase* cairan peritoneal pada

kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoscopi dibanding kelompok kontrol.

4. Ada penurunan ekspresi *zone-occludin 1* (ZO-1) jaringan peritoneal pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoscopi dibanding kelompok kontrol.
5. Ada penurunan ketebalan matrik ekstra seluler (MES) jaringan peritoneal pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoscopi dibanding kelompok kontrol.
6. Ada penurunan skoring adesi intra-abdominal dan perubahan mikrokopis pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoscopi dibanding kelompok kontrol.

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Jenis desain penelitian

Merupakan penelitian eksperimental dengan *randomised post test only control group design*.

4.2 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilakukan di, Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Ulin/Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin bulan Agustus 2018 – Mei 2019.

4.3 Sampel penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur *Sprague Dawley* dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Kriteria inklusi: umur 20-25 minggu, berat 200 - 250 gram, sehat dan sesuai kebutuhan (Sengupta, 2013). Kriteria eksklusi: mati selama penelitian (putus uji) dan diganti dengan tikus yang memenuhi kriteria inklusi.

4.4 Penentuan besar sampel penelitian.

Besaran sampel penelitian penelitian eksperimental dihitung berdasarkan rumus Federer sebagai berikut:

$$\{(t-1).(r-1)\} \geq 15$$

$$\{(4-1).(r-1)\} \geq 15$$

$$r-1 \geq 5 ; r \geq 4$$

konversi risiko drop out: $f = 20 \%$

t : jumlah perlakuan/kelompok subyek r : replikasi/jumlah sampel per kelompok

4.5 Randomisasi

Subyek atau unit eksperimen dibagi dalam kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, secara acak sederhana (*simple random*). Menggunakan kode penomoran dan dilakukan undian.

4.6 Variabel penelitian

4.6.1 Variabel bebas

Tekanan insuflasi gas CO₂

Kadar ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak

4.6.2 Variable tergantung

Kadar sitokin TGF- β , IL-10 dan rasio TGF- β /IL-10 cairan peritoneal.

Kadar TOS, TAC, OSI cairan peritoneal, dan kadar MDA jaringan peritoneal.

Jumlah dan persentase degranulasi sel mast, pada jaringan peritoneum, mesenterium dan omentum.

Kadar *histamine*, *tryptase* dan *chymase* cairan peritoneal.

Derajat luruhnya sel mesotel, dengan menghitung ekspresi ZO-1 (*Zona Occludin-1*) jaringan peritoneal.

Derajat perubahan ketebalan matrik ekstra seluler (MES) jaringan peritoneal.

Skoring adesi intra abdominal secara makroskopis dan perubahan mikroskopis jaringan peritoneal: sel mesotel, sel PMN, sel fibroblas, vaskuler dan ketebalan glikokalik.

4.7 Definisi operasional.

- 4.7.1** Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dari laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, merupakan hewan coba tikus galur *Sprague Dawley* dewasa (3 bulan) dengan berat badan 200 – 250 gram, dipilih kelamin jantan untuk menghindari fase estrus (Sengupta, 2013). Sebelum mendapat perlakuan, tikus dilakukan aklimatisasi selama 2 minggu, memberikan kondisi fisik dan psikologik yang sama, agar tikus beradaptasi. Selama proses ini, tikus diberi pakan dan minum air mineral yang sama. Pada setiap pembedahan, hewan coba dilakukan anastesi menggunakan ketamin 50mg/kgBB intramuskular pada paha. Pada terminasi, tikus dimasukkan kedalam wadah tertutup berisi kapas yang dibasahi larutan eter dan dilakukan dislokasi leher. Tindakan nekropsi dilakukan setelah denyut jantung hilang dan tikus tidak bernafas.
- 4.7.2** Laparoscopi merupakan prosedur pembedahan invasif minimal menggunakan kamera dan instrumen bedah yang dimasukkan melalui insisi kecil. (Aldana *et al*, 2003). Insufiasi adalah tindakan memasukkan gas CO₂ ke dalam rongga peritoneal tikus dengan tekanan tertentu dan waktu tertentu. (Baysal *et al*, 2009., Hendrickson, 2012). Tekanan yang diberikan adalah 5 mmHg, 8 mmHg, 10 mmHg dan 12mmHg. Tekanan tersebut merupakan tekanan yang lazim digunakan pada lapaorskopi, dan merupakan tekanan rendah, sedang dan tinggi, dan tekanan yang disesuaikan/konversi pada tikus (Avital *et al*, 2008., Papparella *et al*, 2013). Area pembedahan di kulit abdomen dilakukan pencukuran dan desinfeksi menggunakan larutan betadin dan

alkohol. Kelompok tikus yang diinsuflasi akan dianestesi dengan menggunakan ketamine intra muskuler di paha dengan dosis 50 mg/kg berat badan. Tikus diletakkan di tempat operasi dan diberi alas. Insuflasi dilakukan dengan memasukkan gas CO₂ melalui kanula (Surflo IV catheter 18 G), diinsersi pada linea mediana abdomen tikus. Gas CO₂ dialirkan dari insuflator laparoscopi otomatis (Gimmi CO₂-Insufflator) dan diatur sesuai kebutuhan tiap kelompok (Sammour, 2011).

Pasca laparoscopi adalah masa 2 jam setelah pembedahan untuk memonitor komplikasi pasca laparoscopi. Dilakukan evaluasi kesadaran, tanda vital, sampai dengan kembali ke kondisi normal.

4.7.3 Gas karbon dioksida (CO₂) digunakan sebagai gas insuflator, merupakan gas CO₂ standar dengan suhu dingin bertekanan tinggi dan kelembaban rendah (kering). (Baysal *et al.*, 2009., Sammour *et al.*, 2009). Gas CO₂ berasal dari PT Aneka Gas Samator Malang.

4.7.4 Mediator inflamasi meliputi, TGF- β , dan IL-10. TGF- β merupakan sitokin dan *growth factor* pemicu fibrotik, dan IL-10 merupakan sitokin penanda anti-fibrosis. Sampel adalah cairan peritoneal dan diukur menggunakan metode *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (Cloud Clone ELISA Kit for Interleukin 10 (IL-10) for *Rattus norvegicus* (Rat) SEA056Ra dan Cloud Clone ELISA Kit for Transforming Growth Factor (TGF-b1) species *Rattus norvegicus* (Rat) SEA124Ra). Hasil yang diperoleh dihitung dalam satuan **ng/ml**, dan dianalisis rasio TGF- β /IL-10 sebagai indeks inflamasi.

4.7.5 Pengukuran radikal bebas oksigen sebaiknya dilakukan secara kumulatif. Semua komponen SOR dapat diukur dengan Hidrogen peroksida/*Total Oxidant Status* (TOS), merupakan metode mudah dan praktis (Erel, 2005., Wei *et al.*, 2010). Pengukuran TOS cairan peritoneal dilakukan dengan metode kolorimetri menggunakan kit komersial Biovision *Hydrogen Peroxide Colorimetric/Fluorometric Assay Kit* K265-200. Absorben sampel dibaca dengan tehnik spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm sebagai sampel blanko. Hasil pengukuran diaplikasikan pada kurva standar untuk menilai konsentrasi hidrogen peroksida dalam satuan **nmol**.

Total Antioxidant Capacity (TAC) diukur menggunakan sampel cairan peritoneal dengan pengenceran dengan metode kolorimetri menggunakan kit komersial Biovision *Total Antioxidant Capacity Colorimetric Assay Kit* K265200. Absorben diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm. Hasil pengukuran diplot pada kurva standar untuk menghitung konsentrasi trolox, dan dinyatakan dalam nmol/ μ l atau Trolox equivalent. Dalam keadaan normal, pembentukan SOR akan diregulasi oleh keseimbangan oksidan dan modulator stres oksidatif dalam tubuh. TOS adalah indikator status oksidasi dalam tubuh, dan TAC adalah indikator kemampuan kompensasi tubuh dalam mengatasi stres oksidatif. Sedangkan parameter keseimbangan fisiologis oksidatif dinyatakan oleh rasio antara TOS:TAC. Rasio TOS:TAC dikenal sebagai Oxidative Stress Index (OSI) (Yazici *et al*, 2014). OSI merupakan indikator stress oksidatif yang sebenarnya (Baltacioglu *et al*, 2014). OSI dihitung sebagai berikut :

$$\text{OSI} = \text{TOS, } \mu\text{mol/L} / \text{TAC, mmol Trolox Equiv/L} \times 100$$

Indikator lipid peroksidasi digunakan kadar MDA jaringan peritoneal. MDA merupakan indikator utama dan terbaik yang paling sering digunakan pada penelitian (Wei *et al*, 2010., Kiran *et al*, 2016). Pemeriksaan MDA jaringan menggunakan jaringan peritoneal segar 10mg, dicuci dengan PBS dingin. Pemeriksaan menggunakan metode *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dengan kit komersial Cloud-Clone Corp. ELISA Kit for Malondialdehyde (MDA) for pan-species CEA597Ge. Hasil dibaca dengan absorbansi 450nm dan dikalkulasi menggunakan kurva standar menghasilkan konsentrasi MDA dalam ng/mL.

4.7.6 Keluarnya granul-granul akibat kerusakan sel mast disebut degranulasi sel mast. Granul metakromatik teridentifikasi berwarna ungu, pada pewarnaan *toluidine blue*. Sel mast yang intak adalah sel mast yang diam, sel mast yang aktif adalah sel mast mengeluarkan mediator (Gilfillan and Tkaczyk, 2006., Abbas *et al*, 2015).

Pengamatan sel mast dilakukan pada jaringan peritoneum, mesenterium dan omentum. Pengamatan jaringan menggunakan metode *in vivo intra vital* (Kubes *et al*,1993, Ibrahim *et al*.,2006). Pengukuran degranulasi sel mast dilakukan pada jaringan peritoneum, mesenterium dan omentum. Peningkatan secara signifikan dijumpai pada hari ke 7 pasca pembedahan abdominal (Hermanowics *et al*, 2010). Setelah hewan coba dilakukan terminasi, dilakukan insisi midline abdomen sampai dengan bagian paru. Dilakukan pengambilan jaringan peritoneum, mesenterium dan omentum

yang memiliki pembuluh darah. Jaringan dibersihkan dengan larutan fisiologis hingga bebas dari bercak darah dan mucus. Jaringan direntangkan pada gelas preparat, dan dikeringan/diinkubasi pada suhu 70⁰ C selama 3 menit. Selanjutnya jaringan ditetesi dengan toluidin blue selama 5 menit, dibilas dengan air mengalir dan dikering seperti tehnik diatas (Kubes *et al*, 1983, Ibrahim *et al*, 2008). Segera dilakukan pengamatan dengan mikroskop dan pengambilan gambar. Sel mast dihitung menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 100 kali dalam area 300 X 300 μM oleh 3 orang pengamat (dalam supervisi ahli patologi anatomi) pada masing-masing preparat dan diambil rerata. Dilakukan penghitungan sel mast yang intak dan sel mast terdegranulasi dan dihitung rerata pada 10 lapangan pandang. Persentase sel mast terdegranulasi dihitung dengan cara:

$$\% \text{ degranulasi} = \frac{\text{Jumlah sel mast terdegranulasi}}{\text{Jumlah sel mast terdegranulasi} + \text{jumlah sel mast intak}} \times 100\%$$

Selain histamin, sel mast mengandung *tryptase* dan *chymase* dalam presentasi yang cukup besar. *Tryptase* adalah protease utama pada granula sel mast. Peningkatan *tryptase* merupakan karakteristik dan penanda degranulasi sel mast. *Tryptase* juga diproduksi oleh basofil, tetapi dalam jumlah yang sangat sedikit, sebanyak 300-700 kali lebih kecil dibanding sel mast (Storjord *and* Nielsen, 2008). *Chymase* mempunyai peranan penting pada kejadian keloid kulit. *Chymase* mengaktifkan fibroblas melalui TGF-β dan memicu produksi ekstraseluler matrik (Dong *et al*, 2015., Wang *et al*, 2015). *Chymase* juga berperan penting pada kejadian fibrosis pada jaringan

paru dan peritoneum (Kosanovic *et al*, 2013., Virupahshaiah *and* Rozindar, 2016)

Pengukuran *histamine*, *tryptase* dan *chymase* cairan peritoneal dilakukan dengan metode Enzyme-linked immunosorbant assay menggunakan kit komersial Cloud-clone corp. ELISA Kit for Chymase 1, Mast Cell (CMA1) for Rat SEG515Ra, Cloud-clone corp. ELISA Kit for Histamine (HA) for pan species CEA927Ge dan Cloud-clone corp. ELISA Kit for Tryptase (TPS) for Rat SEB070Ra. Cairan peritoneal dikumpulkan setelah dilakukan lavase menggunakan 10 ml NaCl 0,9% hangat dan steril. Setelah terpapar selama 30 detik, cairan peritoneal di hisap dengan semprit steril dan dilakukan sentifuse dengan kecepatan 240 RCF selama 10 menit pada suhu 4⁰ C. Supernatan disimpan pada suhu -80⁰ C dan ditambah koktail protease inhibitor (P8340; Sigma Aldrich, St Louis, MAU, USA) dengan perbandingan (1:100), untuk mencegah degradasi protein oleh protease endogen. (The *et al*, 2008., Hermanowicz *et al*, 2010).

Stabilisator sel mast adalah bahan yang mampu mencegah terjadinya degranulasi sel mast dan lepasnya mediator sel mast.

4.7.7 Perubahan ketebalan MES mempengaruhi *signaling* lingkungan mikro peritoneal. Perubahan MES meningkatkan inflamasi, peningkatan transformasi fibroblas yang mengarah pada fibrosis. Perubahan ketebalan MES diukur menggunakan metode pewarnaan histokimia *Masson trichrome stain*, berdasarkan produksi dan deposisi kolagen Trichrome Stain (*Connective Tissue Stain*) Skytec TRM-1-IFU). Hasil dilakukan kwantifikasi

dengan *ImageJ software*. Prosedur pewarnaan histokimia *Masson trichrome stain* sebagai berikut:

Deparafinisasi merupakan bagian yang penting dan dilakukan hidrasi dengan air suling. Panaskan Bouin fluid dalam bak air untuk 56-64°C dalam lemari asam atau daerah yang berventilasi baik. Tempatkan slide dalam cairan Bouin yang dipanaskan selama 60 menit diikuti dengan periode pendinginan 10 menit. Bilas slide dalam air keran sampai benar-benar bersih. Bilas sekali lagi dengan air suling. Campur sama banyak Weigert (A) dan Weigert (B) dan noda slide dengan Weigert Iron Hematoksilin selama 5 menit. Bilas slide dalam menjalankan air keran selama 2 menit. Gunakan Biebrich Scarlet/Acid Fuchsin selama 15 menit. Bilas slide dalam air suling. Bedakan di fosfomolibdat/fosfotungstat Asam Solusi selama 10-15 menit atau sampai kolagen tidak merah. Tanpa membilas, menerapkan aniline Biru Solusi untuk meluncur selama 5-10 menit. Bilas slide dalam air suling. Gunakan Acetic Acid Solution (1%) selama 3-5 menit. dehidrasi sangat cepat dalam 2 perubahan dari 95% Alkohol, diikuti oleh Absolute Alkohol. Hapus dengan *Xylene* atau *Xylene Substitutue* dan ikat/mount dengan resin sintetis.

- 4.7.8** Sel mesotel luruh adalah lepasnya sel mesotel dari membrana-basalis. *Tryptase* dan *chymase* menyebabkan lepasnya ikatan antar sel terutama pada *tight junction*. *Tryptase* dan *chymase* mengaktifkan reseptor PAR-2, sehingga terjadi perubahan struktur protein ZO-1. Perubahan protein ZO-1 menyebabkan lepasnya ikatan antar sel. Peningkatan ZO-1 pada ruang inter

seluler/sitoplasma merupakan indikator lepasnya ikatan antar sel. (Pejler *et al*, 2010., Groschwitz *et al*, 2013., Bankova *et al*, 2014). Pemeriksaan ZO-1 menggunakan metode Imunohistokimia jaringan peritoneal dengan anti ZO-1 tight junction antibodi (Santa Cruz ZO-1 antibody Sc-33725).

4.7.9 Adesi intra peritoneal adalah perleketaan organ padat, usus, omentum dan dinding abdomen selama proses penyembuhan (Kavic *and* Kavic, 2002). Perleketaan merupakan kondisi patologis yang dibentuk oleh jaringan ikat dengan ketebalan bervariasi, lapisan fibrous yang tebal mengandung pembuluh darah dan saraf, atau perleketaan langsung permukaan 2 organ (Basbug *et al*, 2011., Abbas *and* Mohamed, 2012., Coccolini *et al*, 2013., Poehnert *et al*, 2015).

Anti adesi adalah bahan yang diberikan secara oral atau intra peritoneal yang digunakan untuk mencegah adesi intra abdominal. Anti adesi mencegah ikatan antar sel.

Bedasarkan studi kepustakaan, dibuat modifikasi pembuatan skoring adesi yang dapat diterapkan secara akurat. Modifikasi skoring dari beberapa peneliti adalah sebagai berikut :

Skoring Skala adesi secara makroskopis	
0	Tidak dijumpai adesi
1	Adesi tipis, mudah dipisahkan, sedikit dan teratur.
2	Adesi tebal terbatas pada satu area, mudah dipisahkan dengan intensitas sedang, dijumpai awal vaskularisasi.
3	Adesi tebal, luas, tidak bisa dipisahkan secara tumpul, dipisahkan secara tajam, vaskularisasi tebal.
4	Adesi tebal dan luas, melibatkan dinding anterior dan posterior abdomen, Padat dan dipisahkan secara tajam, vaskularisasi sangat tebal.

Tabel 4.1 **Modifikasi skoring skala adesi** (Abbas *and* Mohamed, 2012., Altinel *et al*, 2014., Sahbaz *et al*, 2015)

Modifikasi skoring yang dibuat masih sulit diterapkan secara klinis. Peneliti mencoba menyusun skoring yang dapat diterapkan secara klinis dengan mudah.

Skoring Adesi Makroskopis		
Area Adesi	Derajat keparahan Adesi	Perdarahan saat deseksi
0 : tidak dijumpai adesi	0 : tidak dijumpai adesi	0 : tidak dijumpai adesi
1 : < 25% area adesi	1 : tidak ada deseksi tajam, mudah dipisahkan secara tumpul,	1 : tidak berdarah saat deseksi
2 : 25 – 50% area adesi	2 : deseksi tajam < 50%	2 : darah berhenti spontan saat deseksi
3 : > 50% area adesi	3 : deseksi tajam > 50%	3 : darah tidak berhenti spontan saat deseksi

Tabel 4.2 Laparoskopiskoring adesi metode UB-ULM

4.7.10 Ekstrak bulbus (umbi) Bawang Dayak

Ekstrak etanol bulbus (umbi) bawang Dayak dibuat dari simplisia bulbus (umbi) bawang Dayak. Sampel bulbus (umbi) bawang Dayak diambil dari kebun di Kabupaten Pulang Pisau. Bulbus (umbi) dipanen saat berusia 12 minggu, dan dilakukan determinas di UPT Materia Medica Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur Kota Batu, untuk mendapatkan sertifikasi spesies *Eleutherine americana L merr.* Pembuatan ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak dilakukan dengan cara maserasi di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Penentuan senyawa aktif ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang menggunakan tehnik *liquid chromatography*.

Bulbus (umbi) bawang Dayak dirajang dengan ketebalan 1 mm, kemudian dimasukkan kedalam oven 50⁰ C selama 6 jam. Simplisia di haluskan kemudian ditimbang 500 gr, ditambah dengan pelarut etanol 70 ml hingga pelarut setinggi 1 cm diatas permukaan sampel. Ekstraksi dilakukan 3X24 jam dan penggantian pelarut dilakukan tiap hari. Pelarut diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40⁰ C sampai pelarut tidak menguap

lagi. Filtrat diuapkan diatas waterbath sehingga dihasilkan 12 gr ekstrak. Ekstrak disterilkan dengan metode filtrasi dengan membran berdiameter 0,22- μ m. Kelompok perlakuan diberikan ekstrak etanol bulbus (umbi) bawang Dayak dengan dosis 30 mg/kg bb; 60 mg/kg bb dan 90 mg/kg bb melalui sonde lambung (Ernawati *and* Nurliani, 2012). Perlakuan diberikan secara oral menggunakan sonde lambung menggunakan pelarut aquadest. Pemberian ekstrak bawang dayak diberikan setiap hari selama 54 hari sebelum pembedahan.

4.7.11 Hyaluronic Acids/Carboxy Methyl Cellulose (Mediclor)

Mediclor merupakan barrier steril dan tranparan yang mengandung 2 anion polisakarida yaitu: sodium hyaluronate (HA) dan sodium carboxymethylcellulose (CMC). Mediclor (HA/CMC) terbukti menurunkan kejadian adesi, ekstensi dan derajat keparahan adesi pasca laparoskopi. Pemberian Mediclor diberikan intraperitoneal setelah dilakukan pneumoperitoneum, dengan dosis 5ml/kgBB (Ha *et al.*, 2016).

4.8 Prosedur pengumpulan dan pengolahan sampel

Dilakukan identifikasi sampel yang terkumpul dengan memberi label.

4.9 Alur penelitian

Penelitian dilakukan dalam 3 tahap, yaitu: penelitian insilico (tahap1), tahap 2 dan tahap 3.

4.10 Persetujuan Komite Etik Penelitian

Penelitian ini akan diusulkan untuk mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lambung

Mangkurat Banjarmasin. Penelitian secara *in vivo* menggunakan hewan coba *Rattus norvegicus*. Subyek penelitian diperlakukan sebaik mungkin, tidak menyakiti saat perlakuan dan digunakan anastesi.

4.11 Analisis data.

4.11.1 Uji prasyarat parametrik

Untuk membuktikan hipotesis, data yang diperoleh diuji statistik komparasi. Uji normalitas dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan uji varians *Levene's Test*.

4.11.2 Uji komparasi

Uji Anova adalah uji perbandingan rerata variabel terukur pada kelompok kontrol dan perlakuan. Pada penelitian tahap 2 dan tahap 3 data dianalisis dengan one way ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95% dan uji *post hoc* LSD untuk melihat perbedaan antar kelompok bila berdistribusi normal dan data homogeny.

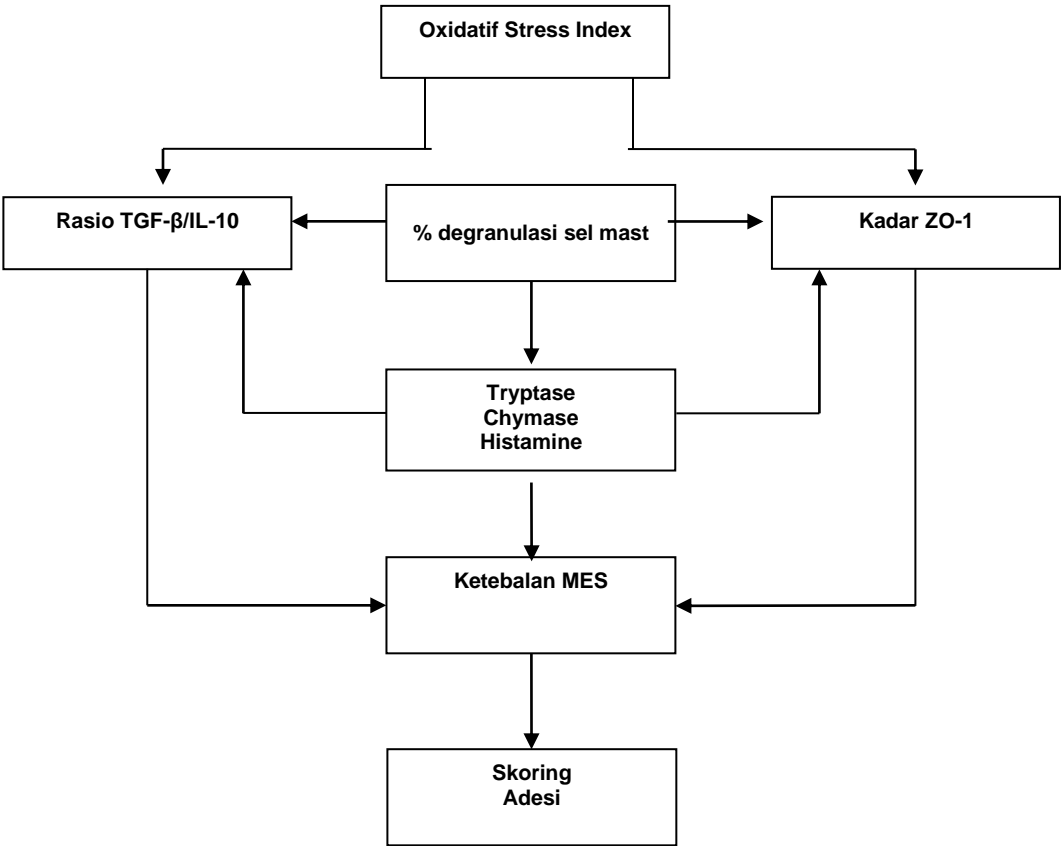
Uji Welch Robust Tests of Equality of Means dengan tingkat kepercayaan 95% dan uji Post Hoc Games-Howell Tests untuk melihat perbedaan antar kelompok bila data berdistribusi normal dan tidak homogeny.

Uji non parametrik Kruskal Wallis dengan tingkat kepercayaan 95% dan uji uji post Hoc Mann Whitney untuk melihat perbedaan antar kelompok bila data berdistribusi tidak normal

4.11.3 Uji analisis jalur (*path analysis*)

Bila hasil analisa penelitian tahap 3 memenuhi persyaratan untuk dilakukan analisis, uji analisis jalur digunakan untuk mengetahui hubungan kausal antar

variabel yang sesuai kerangka konsep. Uji analisis jalur didasarkan adanya korelasi yang signifikan antar variabel terukur, dengan memperhatikan nilai-nilai koefisiennya.



BAB 5 HASIL PENELITIAN

PENELITIAN INSILIKO/TAHAP 1

5.1 Pendahuluan

Bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*) banyak digunakan sebagai modulator inflamasi dan penyembuh luka/*bahimang* oleh masyarakat Dayak di Kalimantan (Setyowati, 2010). Berdasarkan analisa fitokimia, bioaktif yang terkandung didalamnya mempunyai kemampuan modulator inflamasi dan modulator stres oksidatif (Han *et al*, 2008., Song *et al.*, 2019). Penelitian sebelumnya membuktikan bioaktif bawang Dayak turunan naphthoquinon mempunyai aktivitas modulator inflamasi yang kuat (Babula *et al*, 2009., Pinho *et al*, 2011) dan *scavenging* SOR (Pinto *and* de Castro, 2009). Turunan Flavonoid mempunyai aktivitas modulator stres oksidatif melalui mekanisme donor hidrogen (Grael *et al*, 2010., Sandhar *et al*, 2011). Penelitian sebelumnya membuktikan turunan alkaloid, glikosida dan terpenoid mempunyai aktivitas modulator inflamasi yang poten (Beg *et al*, 2011). Prosedur laparoskopi menyebabkan cedera reperfusi dan pembentukan SOR (Baysal *et al*, 2009., Hendrickson, 2012), sehingga terjadi lepasnya/*detachment* sel mesotel dan area denudasi (Volz *et al*, 1999., Suematsu *et al*, 2001., Neuhaus *and* Watson, 2004). Cedera mesotelium memicu proses inflamasi, bila berlebihan berpotensi terjadi adesi intra-abdominal. Menarik untuk diteliti, apakah ekstrak bawang Dayak berpotensi menurunkan jumlah dan degranulasi sel mast sebagai anti adesi intra abdominal pasca laparoskopi.

Belum diketahui jalur (*pathway*) baru ekstrak bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*) sebagai modulator stres oksidatif, pengoptimal fisiologi inflamasi, stabilisator sel mast pada pencegahan adesi intra-abdominal. Diharapkan ditemukan jalur (*pathway*) baru ekstrak bawang Dayak menurunkan jumlah dan degranulasi sel mast dalam pencegah adesi intra-abdominal.

5.2 Perumusan Masalah

5.2.1 Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, dirumuskan masalah sebagai berikut:

Apakah secara komputasi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*) mampu menurunkan jumlah dan degranulasi sel mast dan serta adesi intra-abdominal pasca laparoskopi?

5.2.2 Sub Masalah

1. Apakah secara komputasi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*) mempunyai peranan sebagai modulator inflamasi.
2. Apakah secara komputasi peranan ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*) mempunyai peranan sebagai modulator stres oksidatif.
3. Apakah secara komputasi peranan ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*) mempunyai peranan sebagai anti adesi, melalui interaksi dengan enzim *tryptase*.

4. Apakah secara komputasi peranan ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*) mempunyai peranan sebagai anti adesi, melalui interaksi dengan enzim *chymase*.
5. Apakah secara komputasi peranan ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*) mempunyai peranan sebagai anti adesi, melalui interaksi dengan enzim *histamine relase inhibitor*.
6. Apakah secara komputasi peranan ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*) mempunyai peranan sebagai stabilisator sel mast melalui mekanisme *calcium channel (voltage-sensitive) inhibitor* dan *activator*.

5.3 Tujuan Penelitian Insiliko

Penelitian ini bertujuan untuk memprediksi secara komputasi peranan ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*) dalam menurunkan jumlah sel dan degranulasi sel mast serta adesi intra-abdominal pasca laparoskopi.

5.3.1 Tujuan Umum

Mempelajari dan memprediksi secara komputasi, pengaruh ekstrak umbi bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*) dalam menurunkan jumlah dan degranulasi sel mast, serta adesi intra-abdominal pasca laparoskopi.

5.3.2 Tujuan Khusus

1. Memperoleh nilai prediksi secara komputasi peranan ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*) sebagai modulator inflamasi.

2. Memperoleh nilai prediksi secara komputasi peranan ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*) sebagai modulator stres oksidatif.
3. Memperoleh nilai prediksi secara komputasi peranan ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*) sebagai anti adesi, melalui interaksi dengan enzim *tryptase*.
4. Memperoleh nilai prediksi secara komputasi peranan ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*) sebagai anti adesi, melalui interaksi dengan enzim *chymase*.
5. Memperoleh nilai prediksi secara komputasi peranan ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*) sebagai anti adesi, melalui interaksi dengan enzim *histamine release inhibitor*.
6. Memperoleh nilai prediksi secara komputasi peranan ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*) sebagai stabilisator sel mast, melalui mekanisme *calcium channel (voltage-sensitive)*.

5.4 Metodologi penelitian

5.4.1 Interaksi senyawa aktif bawang Dayak terhadap potensi modulator inflamasi, potensi modulator stres oksidatif, enzim *Tryptase*, *Chymase*, *Histamine release inhibitor* dan stabilisator sel mast melalui mekanisme *Calcium (Ca²⁺) Channel*.

Identifikasi senyawa aktif bawang Dayak (*Eleutherine americana L.Merr*). Penelitian dilakukan dengan pencarian sekuen asam amino dan struktur komponen aktif bawang Dayak (*Eleutherine americana L. Merr*). Struktur SMILES

dan 3D komponen senyawa aktif *Eleutherine americana* L. Merr diperoleh dari *PubChem Open Chemistry Database*, selanjutnya diunduh dan dianalisa. Didapatkan 14 senyawa aktif, yaitu: triterpenoid, naphthol, anthraquinone, eleuthoside B, eleutheroside A, eleutherol, isoeleutherine, elecanacin, eleutherine, dihydroeleutherinol, eleutherinone/eleutherinol, hongconin, naphthoquinone dan isoeleutherol.

Prediksi Aktivitas biologi. Prediksi aktivitas biologi dilakukan menggunakan PASS SERVER <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>, berdasarkan pendekatan SAR (*structure activity relationship*). Apabila senyawa memiliki struktur dan gugus aktif yang sama maka diprediksikan memiliki aktivitas yang sama. Skoring PASS SERVER menggunakan konstanta (P_a), yaitu *probability activity*, dengan batas ambang 0,7. Apabila $P_a > 0,7$ maka hasil prediksi secara komputasi tidak akan jauh berbeda apabila diuji secara laboratorium (Goel *et al*, 2011). Aktivitas biologi yang dianalisis yaitu: modulator inflamasi, modulator stres oksidatif, *tryptase inhibitor*, *chymase inhibitor*, *histamine release inhibitor*, *Calcium channel (voltage-sensitive) inhibitor*, dan *calcium channel (voltage-sensitive) activator*. Sehingga potensi senyawa aktif bisa diprediksikan mekanisme kerjanya.

Prediksi Protein Target. Senyawa aktif yang paling berpotensi kemudian dianalisis protein targetnya menggunakan HIT-PICK(<http://mips.helmholtz-muenchen.de/hitpick/>). *Targeted-focused library* pendekatan yang digunakan untuk mencari target potensi protein dari suatu kumpulan senyawa baru. Prinsipnya mencari kesamaan gugus fungsi dan struktur dari senyawa baru dengan senyawa yang sudah diketahui protein targetnya (Malo *et al*, 2006). Protein target tersebut

dianalisis mekanisme pathway kerjanya. Sehingga dapat dipelajari proses biologi yang terganggu bila obat berikatan dengan protein target.

Molecular Docking digunakan untuk mempelajari mekanisme inhibisi/aktivasi suatu senyawa terhadap protein target tertentu. Senyawa bahan alam yang paling potensial dan protein target yang paling besar kemungkinan berinteraksi, dipelajari secara detail menggunakan program *Molecular Docking PyRx 0.8*. Proses *docking* menggunakan autodock-vina dan dilakukan secara spesifik pada sisi aktif protein target. *Molecular docking* dapat memprediksikan afinitas pengikatan suatu senyawa terhadap protein target tertentu (Trott *et al*, 2010). Semakin tinggi afinitas maka potensi obat akan semakin baik.

Prediksi pathway interaksi protein. Digunakan yaitu StringDB (<http://string-db.org>) untuk menganalisis protein yang menjadi target dianalisis interaksinya dengan protein yang terlibat dalam suatu *pathway* tertentu. String database digunakan untuk mempelajari interaksi *protein-protein functional menus*. String memfasilitasi analisis proses biologi yang melibatkan protein (Szklarczyk *et al*, 2015). Metode penelitian bertujuan, untuk mengusulkan pathway baru yang diinduksi.

Interaksi molekuler dan visualisasi. Komplek protein dan senyawa aktif dianalisis lebih lanjut terkait asam amino yang berinteraksi menggunakan program LIGPLOT+ dan proses visualisasi menggunakan PYMOL (<http://pymol.org>) untuk menyajikan data (Laskowski, 2011).

5.5 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Biokomputasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam jurusan Biologi Universitas Brawijaya Malang.

5.6 Bahan dan Alat

Proses pengambilan data dilakukan komputerisasi menggunakan Lenovo ideapad S210 touch, microsoft window 10 home single language, intel® core™ i3-3217U, 1.80 GHz, 64 bit operation system, 488 GB HDD dan 4,00 GB. PASS SERVER, HIT-PICK, Molecular Docking PyRx 0.8, Autodock Vina, Sting DB, LIGPLOT+ dan PYMOL.

5.7 Manfaat penelitian

Diperoleh prediksi bahan aktif bawang Dayak *Eleutherine americana L. merr* sebagai anti adesi intra abdominal pasca laparoskopi melalui jalur modulator stres oksidatif, modulator inflamasi dan penstabilan sel mast. Nilai prediksi penelitian insiliko menjadi pedoman pada penelitian tahap berikutnya.

5.8 Hipotesis penelitian

Berdasarkan latar belakang, rumusan masalah, kerangka teori dan kerangka penelitian diajukan hipotesis penelitian sebagai berikut:

Ada peningkatan nilai prediksi kekuatan ikatan bioaktif bawang Dayak dengan protein target pada sel mast dan protein target yang berhubungan dengan skoring adesi intra abdominal.

5.8.1 Sub-hipotesis penelitian

1. Ada peningkatan nilai prediksi kadar kekuatan ikatan bioaktif bawang Dayak dengan protein target inflamasi TGF- β dan NF κ B
2. Ada peningkatan nilai prediksi kadar kekuatan ikatan bioaktif bawang Dayak dengan protein target *xanthine oxidase*.

3. Ada peningkatan nilai prediksi kadar kekuatan ikatan bioaktif bawang Dayak dengan protein target *tryptase*.
4. Ada peningkatan nilai prediksi kadar kekuatan ikatan bioaktif bawang Dayak dengan protein target *chymase*.
5. Ada peningkatan nilai prediksi kadar kekuatan ikatan bioaktif bawang Dayak dengan protein target *histamine*.
6. Ada peningkatan nilai prediksi kadar kekuatan ikatan bioaktif bawang Dayak dengan protein target Ca^{2+} channel.

5.9 Hasil, Analisis dan Pembahasan

5.9.1a. Determinasi spesies *Eleutherine Americana L Merr.*

Determinasi spesies bawang Dayak penelitian ini adalah spesies *Eleutherine Americana L Merr.*

PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU
Jalan Labor No 87, Telp. (0341) 593396
KOTA BATU 65313

Nomor : 574/059/162-2/2017
 Sifat : biasa
 Perihal : **Determinasi Tanaman Bawang Dayak**

Menurut permohonan saudara

Nama : dr. HERY POERWOSANTA, SpB, SpBA(K), Fis
 NIM : 12520109611992
 Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN
 UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Perihal determinasi tanaman bawang dayak
 Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
 Divisi : Spermatophyta
 Sub Divisi : Angiospermae
 Kelas : Monocotyledoneae
 Ordo : Liliales
 Famili : Liliaceae
 Genus : Eleutherine
 Spesies : *Eleutherine americana* (L.Merr.) Merr.
 Nama Umum : Bawang salang, bawang tawai, bawang dayak, bawang bertan, bawang kapal, bawang kambe, bawang manuk hutan, hembang salang.
 Kunci determinasi : 1b-2b-1b-4b-12b-12b-1b-7b-10b-10b-30b-21b-27b-27b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-29b-31a-12a-11b-15a-16d-71b-18b-19a-411a-2b-44b-45b-46b-57b-51b-57b-14b-59b-57b-11b-94b-12b-71b-11a-11b-59b-332b-22-4b-212a-334a-237b-238b-341b-342b-343b-344a-1a-2a-31a-4a-6-1

2. Morfologi
 Habitat: Hutan, semesta tinggi 20-40 cm. Batang: Sempit, umbi bertapis bulat tidak menyala. Daun: Tangkai, berlekuk pita, sangat dan mudah rontok, tepi rata. Biji: Biji Majemuk, tumbuh di ujung batang, panjang tangkai ± 40 cm, berlekuk silindris kelopak terdapat dari dua daun kelopak, biji kelengkapan, embrionya terdapat dari empat daun lembaga, biji, panjang ± 1 mm, putih, bawang hari sangat legada saat kering, paku berlekuk, kasar, panjang ± 1 mm, putih keabuan. Akar: Sumbu, tidak menyala.
3. Nama Sempit : *Eleutherine Americana* Umbi Bawang Salang.
4. Kandungan : *Eleutherine americana* mengandung flavonoid, alkaloid, saponin, sterpenoid, steroid, glikosida, tannin, dan polifenol.
5. Fitokimia : Flavonoid.
6. Daftar Pustaka
 • Antonin. <http://unit.ac.id/eol/index.php?search=Eleutherine-Americana>, diakses tanggal 16 Juni 2019.
 • Antonin. http://www.waratchi.fisika.go.id/pengaruh_kesehatan/manfaat_eleutherine-112.pdf, diakses tanggal 23 Oktober 2019.
 • Baker, C. A. & Walsman Van Der Brink, R.C. 1963. *Flora of Java (Spermatophytes Only)*, N.V.P., Noordhoff, Groningen.
 • Baker, C. A. & Baharuzar Van Der Brink, R.C. 1968. *Flora of Java (Spermatophytes Only)*, Vol. III, N.V.P. Noordhoff, Groningen.

Deskripsi surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 22 Februari 2017
 Kepala UPT Materia Medica Batu

 D. Haini R.M., Dr., Apt., M.Kes.
 N.P. 19670501199103 1 003

Gambar 5.1 Determinasi bawang Dayak UPT Materia Medica.

5.9.1b Hasil Identifikasi senyawa aktif bawang Dayak.

Berdasarkan PubChem Open Chemistry Database diperoleh data 14 bio-aktif bawang Dayak. Diunduh dan dianalisa struktur SMILE, 3D komponen senyawanya, Human Intestinal Absorbtion (HIA+) dan dosis letal. Didapatkan data pada tabel 5.1 sebagai berikut:

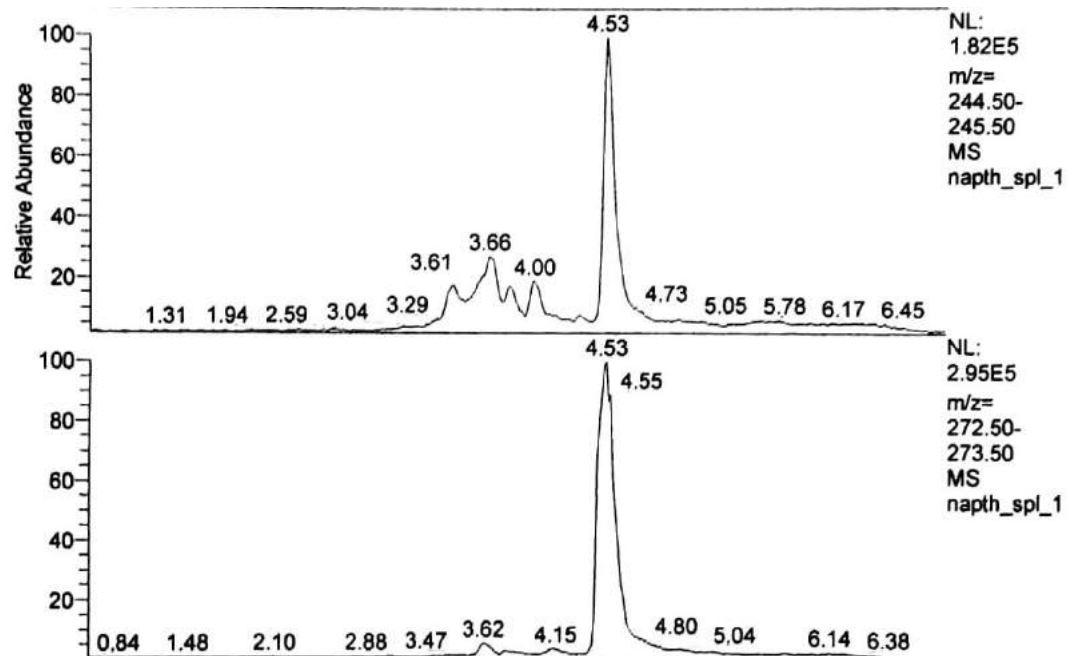
Tabel 5.1 Senyawa aktif, Pubchem CID dan Canonical SMILES

No	Nama Senyawa	CID	Canonical SMILES	HIA+	LD50 (Mol/kg)
1.	triterpenoid	451674	<chem>CC1(CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CCC5C4(CCC(C5(C)COS(=O)(=O)O)O)C)C)C2C1)C)C(=O)O)C</chem>	0.9840	2.4620
2.	naphthol	8663	<chem>C1=CC=C2C=C(C=CC2=C1)O</chem>	1.0000	1.8556
3.	anthraquinone	6780	<chem>C1=CC=C2C(=C1)C(=O)C3=CC=CC=C3C2=O</chem>	1.0000	2.7726
4.	eleuthoside B	95224384	<chem>CC1C2=C(C=C3C=CC=C(C3=C2OC4C(C(C(C(O4)COC5C(C(C(C(O5)CO)O)O)O)O)O)OC)C(=O)O1</chem>	0.5342	2.5761
5.	eleutheroside A	101855622	<chem>CC1=CC(=O)C2=C(C=C3C=C(C=C(C3=C2O1)O)OC4C(C(C(C(O4)CO)O)O)O)C</chem>	0.6505	2.3027
6.	eleutherol	120697	<chem>CC1C2=C(C=C3C=CC=C(C3=C2O)OC)C(=O)O1</chem>	0.9838	3.0288
7.	isoeleutherine	10445924	<chem>CC1CC2=C(C(O1)C)C(=O)C3=C(C2=O)C=CC=C3OC</chem>	0.9920	2.8741
8.	elecanacin	102091822	<chem>CC1CC23C(CC2O1)C(=O)C4=C(C3=O)C=CC=C4OC</chem>	0.9963	2.6281
9.	eleutherine	10166	<chem>CC1CC2=C(C(O1)C)C(=O)C3=C(C2=O)C=CC=C3OC</chem>	0.9920	2.8741
10.	dihydroeleutherinol	102473740	<chem>CC1CC(=O)C2=C(C=C3C=C(C=C(C3=C2O1)O)O)C</chem>	0.9637	2.3861
11.	Eleutherinol/ eleutherinone	15559106	<chem>CC1=CC(=O)C2=C(C=C3C=C(C=C(C3=C2O1)O)O)C</chem>	0.9722	2.1674
12..	hongconin	110108147	<chem>CC1C2=C(C3=C(C=CC=C3OC)C(=C2C(=O)C(O1)C)O)O</chem>	0.9524	2.9636
13.	naphthoquinone	8530	<chem>C1=CC=C2C(=O)C=CC(=O)C2=C1</chem>	1.0000	2.8888
14.	isoeleutherol	10800314	<chem>CC1C2=C(C=C3C=CC=C(C3=C2O)OC)C(=O)O1</chem>	0.9838	3.0288

5.9.1c Hasil analisa senyawa aktif bawang Dayak.

Analisis senyawa aktif dikerjakan dengan metode LCMS (Liquid Chromatography Mass Spectrometry). Prinsip dasar metode LCMS: ekstrak encer diionisasi sehingga terseparasi pada *fase static* dan *fase mobile*. Senyawa aktif terekam sesuai masing-masing *mass to charge ratio* (m/z) dan retensi waktunya (rt), sehingga dapat dibandingkan dengan referensi (Ardrey, 2003). Pada penelitian ini, hasil analisis LCMS dari ekstrak kasar bawang Dayak didapatkan 3 senyawa yang

dominan yakni isoeleutherol (m/z 244.50; rt 4.00), eleutherol (m/z 245.00; rt 4.53) dan eleutherine (m/z 272.00; rt 4.53) (Gambar 5.2).

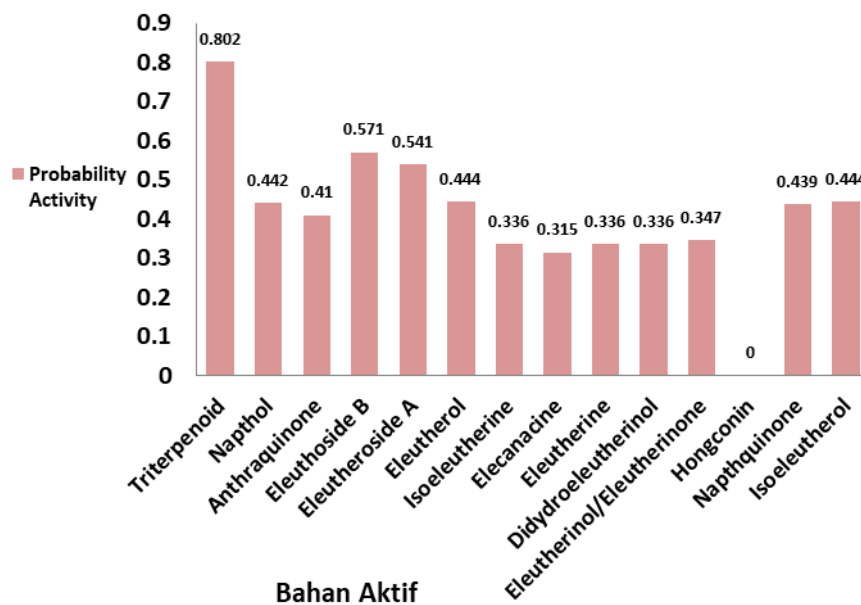


Gambar 5.2 Analisis LCMS Ekstrak Etanol 96% Umbi Bawang Dayak (atas) senyawa isoeleutherol pada rt 4.00 dan eleutherol pada rt 4.53; (bawah) senyawa eleutherine pada rt 4.53

Hasil ekstraksi sesuai dengan penelitian Setiawan dan Febriyanti yang menyatakan bahwa pelarut etanol 96% dapat mengekstrak senyawa flavonoid, fenolik, alkaloid, saponin, dan triterpenoid paling baik dibanding pelarut lain (Setiawan and Febrianti, 2017). Penelitian sebelumnya menunjukkan hasil analisis LCMS ekstrak etanol 96% bawang Dayak menunjukkan senyawa dengan berat molekul yang sama, 272, dan dari hasil pengukuran spectrum NMR isolat merupakan turunan senyawa kromen yaitu 9-methoxy-1,3-dimetyl-3,4-dihydro-1H-benzo [g] isochromene-5,10-dione, C₁₄H₁₆O₄ (eleutherine) (Suroto, 2018).

5.9.2a Hasil prediksi aktivitas biologi bawang Dayak sebagai modulator inflamasi

Prediksi aktivitas biologi sebagai modulator inflamasi dilakukan menggunakan PASS SERVER <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>, berdasarkan pendekatan SAR (*structure activity relationship*) didapatkan Triterpenoid (0.802), eleuthoside B (0.571) dan eleutheroside A (0.541) mempunyai aktivitas biologi yang terbaik sebagai modulator inflamasi (gambar 5.3).

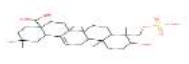
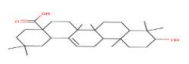
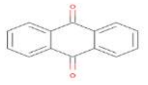

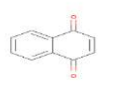
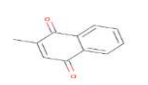
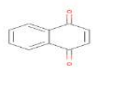


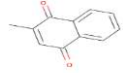


Gambar 5.3 Hasil prediksi aktivitas bawang Dayak sebagai modulator inflamasi menggunakan PASS SERVER. Triterpenoid (0.802), Eleuthoside B (0.571) dan Eleutherol (0.541) mempunyai kemampuan sebagai modulator inflamasi.

Untuk menilai prediksi protein target digunakan *HITPICK Target Prediction*. Didapatkan 2 target yang paling potensial yaitu NR1H4 dan ESR2. Triterpenoid yang merupakan salah satu bio-aktif bawang Dayak, diprediksi menggunakan HITPICK dapat mentarget Protein NR1H4 dengan presisi 94.8 % dan similaritas dengan senyawa yang terbukti mentarget protein tersebut sebesar 76%

NR1H4 (*nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4*) merupakan protein yang berperan untuk regulasi inflamasi. NR1H4 terlibat pada penurunan ekspresi sitokin pro-inflamasi dan berperan sebagai modulator inflamasi.

Tabel 5.2 Analisis HITPICK bioaktif bawang Dayak dengan protein target modulator inflamasi. Triterpenoid bekerja pada protein target NR1H4 dan Napthol pada ESR2.

	ID	Target	Precision(%)	Tc similarity
Triterpenoid	query_1.	NR1H4	94.8	0.76
				
	Similar compound: CID000010494			
				
Antraquinone	query_3.	TOP1	77	0.56
				
	Similar compound: CID000006688			
				
naphthoquinone	query_13.	GGCX	77	0.53
				
	Similar compound: CID000004055			
				
naphthoquinone	query_13	VKORC1	54.3	0.53
				
	Similar compound: CID000004055			

naphthol	 query_2  Similar compound: CID010192730 	ESR2	53.3	0.48
----------	--	------	------	------

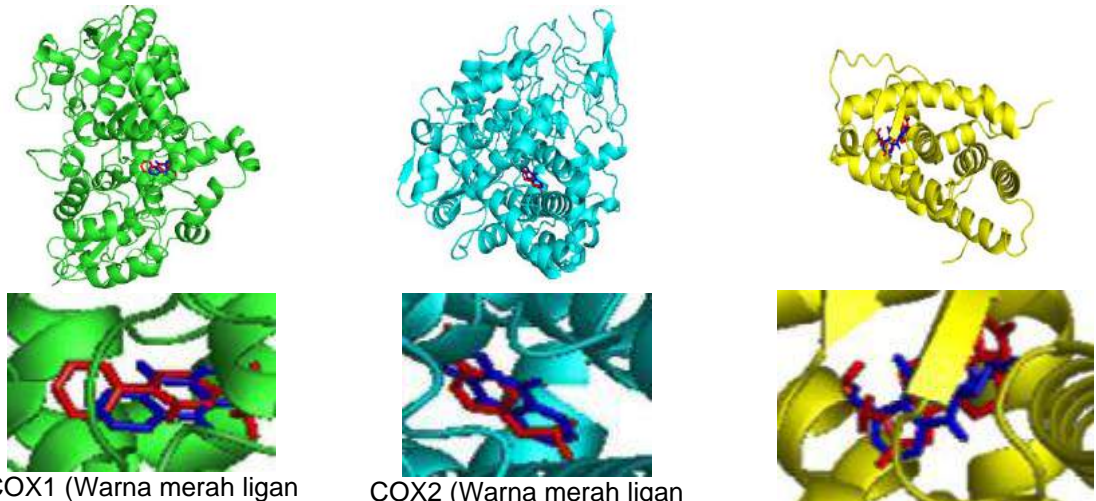
Analisis *docking* menggunakan program Autodock PyrX 9.5 bertujuan mengetahui *binding affinity* yang terjadi antara reseptor dan ligan. Tujuan analisa adalah mengetahui kekuatan ikatan dengan skor tertinggi dari hasil *docking*. Semakin negatif semakin kuat ikatan yang terjadi. Dexametason digunakan sebagai kontrol modulator inflamasi. Empat belas senyawa aktif bawang Dayak dibandingkan dengan sisi aktif kontrol. Elecanacine dan anthraquinone merupakan senyawa yang paling potensial berperan sebagai modulator inflamasi berdasarkan kekuatan ikatan dengan protein targetnya (table 5.3).

Tabel 5.3 Hasil Autodock PyrX 9.5 binding affinity bawang Dayak sebagai modulator inflamasi. Antraquinone mendekati kemampuan Flurbiprofen/flp sebagai anti COX1 dan Ibuprofen/ibp sebagai anti COX2. Elecanacin mendekati kemampuan Dexamethasone/dex.

	Binding Affinity (kcal/mol)	rmsd/ub	rmsd/lb
cox_1_flp_anthraquinone	-8.5	0	0
cox_1_flp_flp	-9.3	0	0
cox2_ibp_anthraquinone	-8.4	0	0
cox2_ibp_ibp	-7.7	0	0
gr_dex_elecanacin	-8.9	0	0
gr_dex_dex	-12.6	0	0

Program Ligplot digunakan untuk melakukan analisis kontribusi asam amino yang berikatan antara reseptor dan ligan. Asam amino yang berinteraksi warna biru

adalah ikatan hydrogen (warna biru) dan ikatan hidrofobik (warna merah). (gambar 5.4)



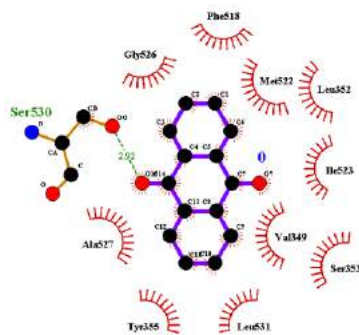
COX1 (Warna merah ligan kontrol Flurbiprofen/FLP, biru antraquinone)

COX2 (Warna merah ligan kontrol Ibuprofen /IBP, biru antraquinone)

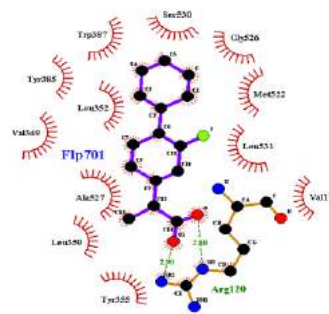
GR2 (Warna merah ligan kontrol Dexamethasone /DEX, biru Elecanacin)

Gambar 5.4 Interaksi asam amino reseptor-ligan

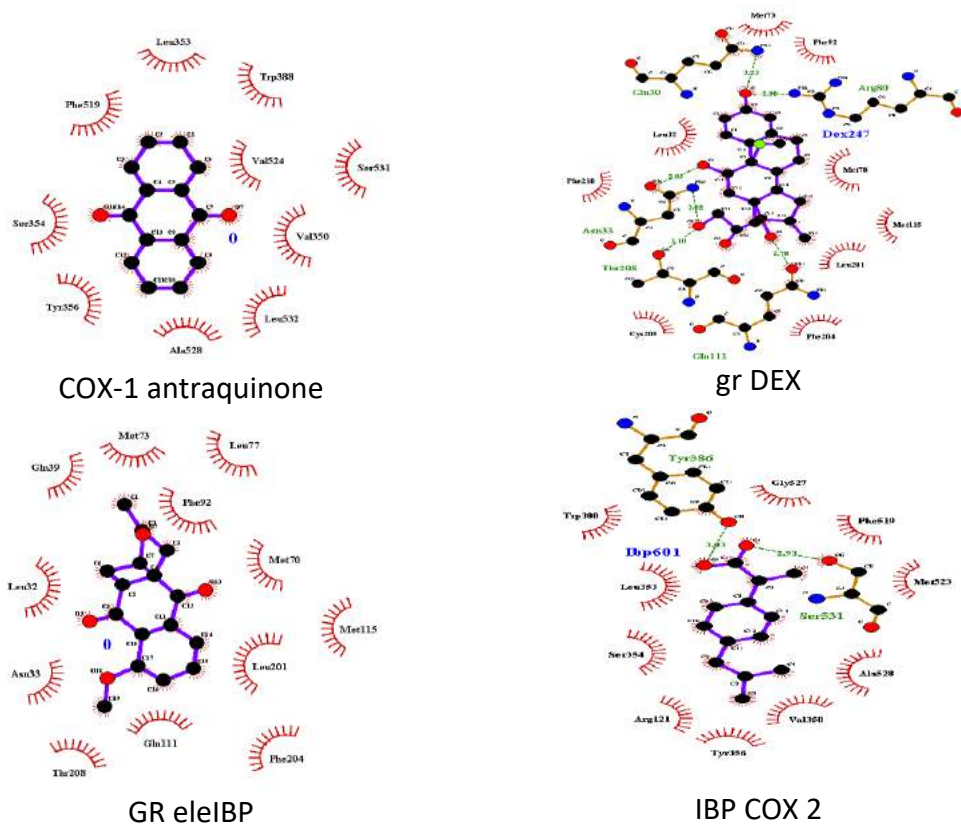
- A. GR2 Warna merah ligan kontrol Dexamethasone /DEX, biru Elecanacin
- B. COX1 Warna merah ligan kontrol Flurbiprofen/FLP, biru antraquinone
- C. COX2 Warna merah ligan kontrol Ibuprofen /IBP, biru antraquinone



COX-1 antra



COX-1 FLP1



Gambar 5.5 Visualisasi interaksi ligan dan reseptor. Visualisasi interaksi bioaktif bawang Dayak dengan reseptor modulator inflamasi

Hasil analisa dibuktikan adanya ikatan hidrofobik dan hidogen antara reseptor dan ligan (tabel 5.4)

Tabel 5.4 Reseptor modulator inflamasi, ligan bioaktif bawang Dayak dan ikatan kimia. Ikatan bioaktif bawang Dayak disusun oleh protein dengan ikatan hidrofobik dan hydrogen.

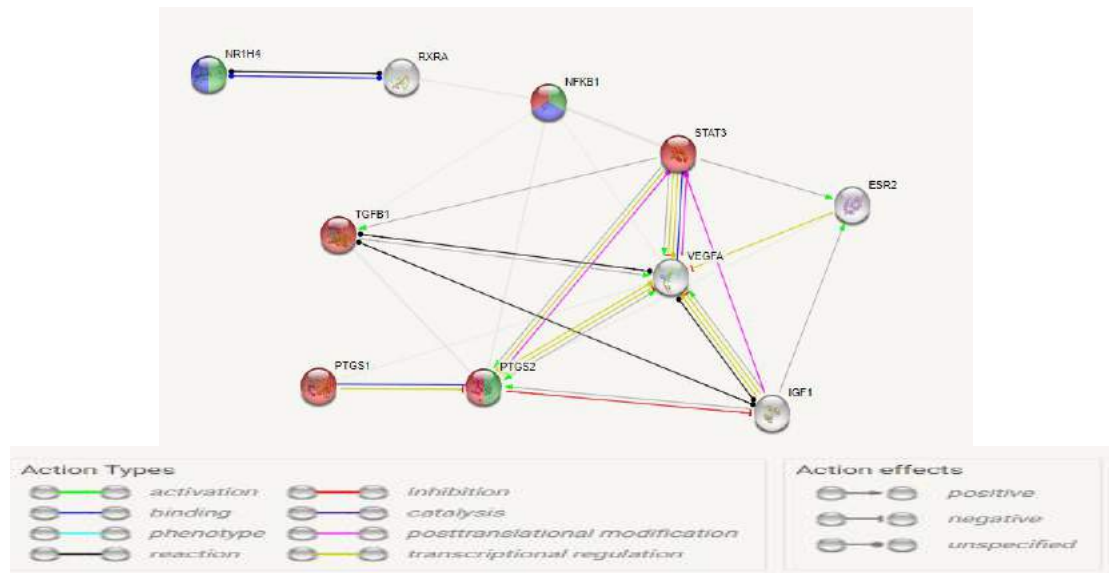
Reseptor	Ligand	Ikatan hidrofobik	Ikatan hidrogen
COX1	FLP	Ser530, Gly526, Met522, Leu531, Val116, Tyr355, Leu356, Vval349, Leu352, Tyr385, Trp387	Arg120
	Antraquinone	Ala527, Tyr355, Leu531, Ser353, Val349, Ile523, Met522, Phe518, Leu352	Ser530
COX2	IBP	Trp388, Leu353, Ser354, Arg121, Tyr356, Val350, Ala528, Met523, Phe519, Gly527	Tyr386, Ser531
	Antraquinone	Leu353, Trp388, Val524, Val350,	

GR	DEX	Ser351, Leu352, Ala528, Tyr356, Ser354, Phe519 Met73, Phe92, Met70, Met115, Leu201, Phe204, Cys205, Phe218, Leu32	Gln111, Asn33, Thr208, Gln39, Arg80
	Elecanacin	Met73, Leu77, Phe92, Met70, Met115, Leu201, Phe204, Gln111, Thr208, Asn33, Leu32, Gln39	

Analisa *STITCH Pathway Prediction* dilakukan untuk menilai pendekatan senyawa – protein antara bio-aktif bawang Dayak dengan TGF- β , ternyata kedua protein tersebut tidak dapat berikatan secara langsung. Perlu dilakukan pendekatan *protein–protein interaction* dengan program STRING (gambar 5.6)

Hasil analisa STRING didapatkan tidak dijumpai interaksi protein target dengan reseptor TGF- β . Aktivitas faktor transkripsi NF κ B, merupakan bagian dari persinyalan RANK-RANKL. Analisis alternatif dilakukan untuk mencari peran senyawa aktif bawang Dayak terhadap jalur persinyalan klasik NF κ B, yang melibatkan aktivitas kompleks I κ B kinase (I κ K) pada proses fosforilasi inhibitor NF κ B (I κ B) yang menyebabkan I κ B terdegradasi melalui proses ubiquitinasi, dan NF κ B selanjutnya dapat bertranslokasi menuju nukleus dan mengaktifkan transkripsi dari gen-gen targetnya (Liu *et al*, 2015)

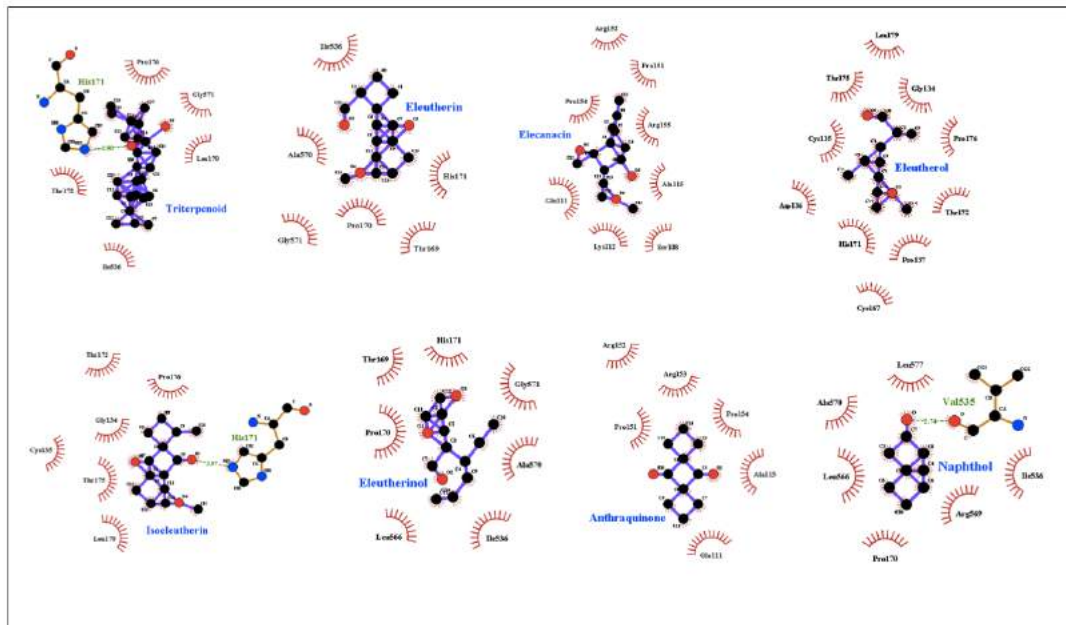
Tahap awal dilakukan docking antara senyawa aktif bawang Dayak dengan kompleks NF κ B-I κ B, dan didapatkan bahwa senyawa yang paling mudah berinteraksi dengan kompleks NF κ B-I κ B adalah triterpenoid (tabel 5.5)



Gambar 5.6 Analisa STRING bawang Dayak sebagai modulator inflamasi. Triterpenoid mempunyai kemampuan modulator inflamasi yang paling baik berdasarkan metode STRING.

Tabel 5.5 Docking senyawa aktif bawang Dayak terhadap aktivitas faktor transkripsi NFκB. Kemampuan Triterpenoid dan eleutherin berikatan dengan baik pada protein target NFκB-IκB.

Molekul	Binding energy
NFκB, IκB - triterpenoid	-334.62 kJ/mol
NFκB, IκB - eleutherin	-231.16 kJ/mol
NFκB, IκB - elecanacin	-219.92 kJ/mol
NFκB, IκB - eleutherol	-218.21 kJ/mol
NFκB, IκB - isoeleutherin	-217.38 kJ/mol
NFκB, IκB - eleutherinol	-201.37 kJ/mol
NFκB, IκB - anthraquinone	-173.80 kJ/mol
NFκB, IκB - naphthol	-160.28 kJ/mol



Gambar 5.7 Visualisasi ikatan senyawa aktif bawang dayak pada protein target NFκB-IκB. Ikatan NFκB disusun oleh beberapa protein.

Enam senyawa aktif bawang Dayak mendukung aktivitas faktor transkripsi NFκB karena semakin mempermudah ikatan antara IKK dengan kompleks NFκB-IκB. Senyawa-senyawa tersebut yaitu: naphthol, anthraquinone, eleutherol, triterpenoid, elecanacin, dan isoeleutherin. Besarnya *binding energy* yang dibutuhkan untuk interaksi dapat dilihat pada tabel 5.6.

Tabel 5.6 *Binding energy* senyawa aktif bawang Dayak terhadap aktivitas faktor transkripsi NFκB-IKK. Naphthol, anthraquinone dan eleutherol meningkatkan kemampuan ikatan NFκB-IκB.

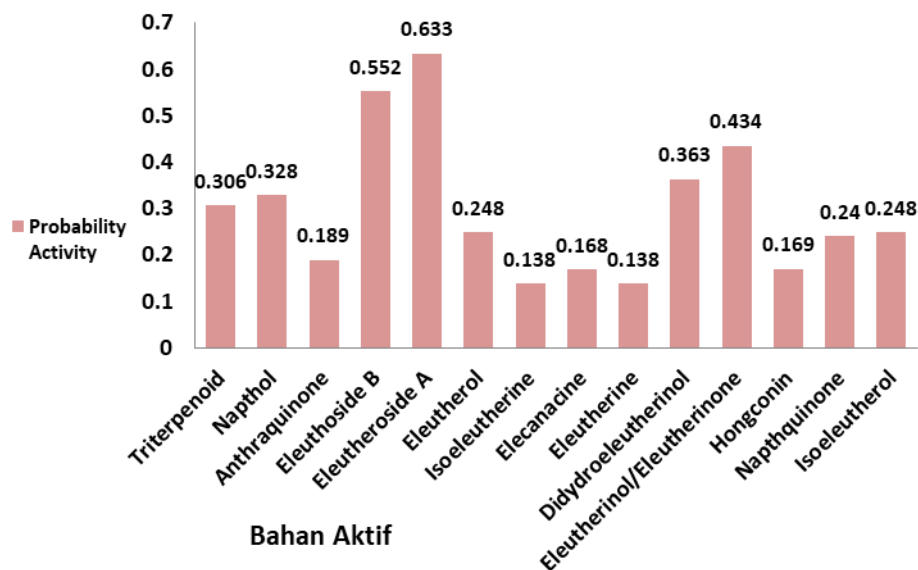
Molekul	Binding energy
NFκB/IκB - IKK	-211.95 kJ/mol
NFκB/IκB, naphthol - IKK	-224.07 kJ/mol
NFκB/IκB, anthraquinone - IKK	-223.71 kJ/mol
NFκB/IκB, eleutherol - IKK	-217.71 kJ/mol
NFκB/IκB, triterpenoid - IKK	-217.11 kJ/mol
NFκB/IκB, elecanacin - IKK	-213.75 kJ/mol
NFκB/IκB, isoeleutherin - IKK	-212.57 kJ/mol

Potensi bawang Dayak sebagai modulator inflamasi diprediksi melalui mekanisme aktivasi transkripsi NFκB. Mendukung penelitian sebelumnya, iso-eleutherine menghambat sitokin inflamasi melalui mekanisme transkripsi NF-κB (Song *et al.*, 2009). Berbeda dengan penelitian sebelumnya, ekstrak bawang Dayak mampu berikatan dengan TGF-β (Upadhyay *et al.*, 2013).

Pada penelitian ini didapatkan temuan, bahwa ekstrak bawang Dayak yang diteliti mengandung iso-eleutherol, eleutherol dan eleutherine dengan kadar tinggi. Ketiga senyawa aktif tersebut tidak mampu berikatan dengan protein target TGF-β. Potensi eleutherol sebagai modulator inflamasi karena mampu berikatan dengan protein target pada jalur NFκB. Triterpenoid, eleuthoside B dan eleutheroside A mempunyai potensi modulator inflamasi yang tinggi, tetapi kadarnya rendah dan tidak mampu berikatan dengan protein target TGF-β dan NFκB.

5.9.2b Hasil prediksi aktivitas biologi sebagai modulator stres oksidatif

Prediksi aktivitas biologi sebagai modulator stres oksidatif, dilakukan menggunakan PASS SERVER <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>, berdasarkan pendekatan SAR (*Structure Activity Relationship*) didapatkan Eleutheroside A (0.633), eleuthoside B (0.552) dan eleutherinol/eleutherinone (0.434) mempunyai aktivitas biologi yang terbaik sebagai modulator stres oksidatif (gambar 5.8).



Gambar 5.8 Hasil prediksi aktivitas biologi bawang Dayak sebagai modulator stres oksidatif menggunakan PASS SERVER. Eleutherosid A (0.633), Eleuthoside B (0.552) dan Eleutherinal/Eleutherinone (0.434) diprediksi mempunyai kemampuan modulator stres oksidatif yang paling baik.

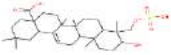

Xanthine Oxidase (PDB ID 3NFY) adalah protein yang berperan pada stres oksidatif akibat iskemia. Analisis *docking* dilakukan untuk mengetahui *binding affinity* antara reseptor dan ligan. Program Autodock PyrX 9.5 digunakan untuk mengetahui kekuatan ikatan adalah skor tertinggi dari hasil docking. Semakin negatif hasil docking maka semakin kuat ikatan yang terjadi. Quercetin merupakan senyawa modulator stres oksidatif yang terbukti menghambat stres oksidatif melalui target protein xanthine oxidase. Empat belas senyawa aktif bawang Dayak dibandingkan dengan sisi aktif XO yang telah berikatan dengan quercetin (kontrol). Napthoquinone merupakan senyawa yang paling potensial pada bawang Dayak untuk mencegah stres oksidatif dan berperan sebagai modulator stres oksidatif (tabel 5.7)

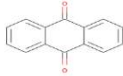


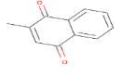


Tabel 5.7 **Hasil Autodock PyrX 9.5 binding affinity bawang Dayak sebagai modulator stres oksidatif.** Napthoquinone mempunyai kemampuan paling dibandingkan quercetine baik sebagai kontrol modulator stres oksidatif.

Ligand	Binding Affinity	rmsd/ub	msd/lb
xanthineoxidase_iseuletherol	-6.6	0	0
xanthineoxidase_napthoquinone	-8.2	0	0
xanthineoxidase_hongconin	-7	0	0
xanthineoxidase_eleutherinol	-7.2	0	0
xanthineoxidase_dihydroeleutherinol	-6.8	0	0
xanthineoxidase_eleutherine	-7.1	0	0
xanthineoxidase_elecanacin	-5.9	0	0
xanthineoxidase_iseuletherine	-7.1	0	0
xanthineoxidase_eletherol	-6.6	0	0
xanthineoxidase_eletheroside_a	-5.7	0	0
xanthineoxidase_elethoside_b	-0.3	0	0
xanthineoxidase_anthraquinone	-7.5	0	0
xanthineoxidase_naphthol	-7.9	0	0
xanthineoxidase_triterpenoid	14.7	0	0
xanthineoxidase_que_fix	-8.3	0	0

Bio-aktif bawang Dayak diprediksi terlebih dahulu dengan menggunakan HITPICK dan SWISS Target Prediction. Hasil pendekatan HITPICK didapatkan data sebagai berikut (tabel 5.8).

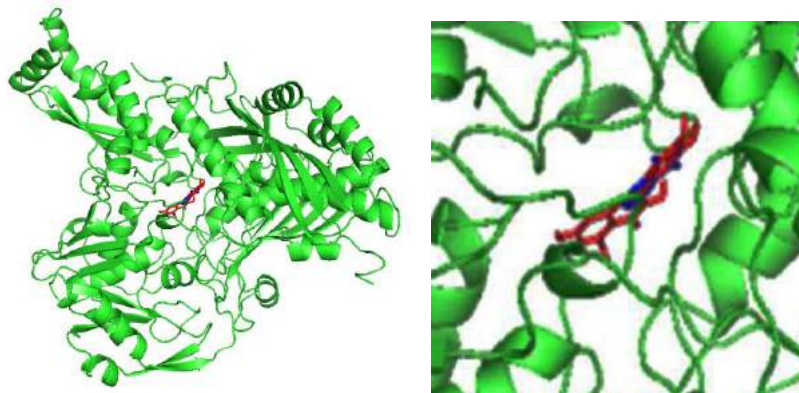
Tabel 5.8 **Pendekatan HITPICK bawang Dayak sebagai modulator stres oksidatif.** Kemiripan struktur Triterpenoid dengan NR1H4 dan Antraquinone dengan TOP1 sehingga bahan aktif dapat berikatan.

	ID	Target	Precision(%)	Tc similarity
Triterpenoid	query_1.	NR1H4	94.8	0.76
				
	Similar compound: CID000010494			
				
Antraquinone	query_3.	TOP1	77	0.56

					
	Similar compound: CID000006688				
Napthoquinone	query_13.	GGCX	77		0.53
					
	Similar compound: CID000004055				
Napthoquinone	query_13	VKORC	54.3	1	0.53
					
	Similar compound: CID000004055				
					
Napthol	query_2	ESR2	53.3		0.48
					
	Similar compound: CID010192730				
					

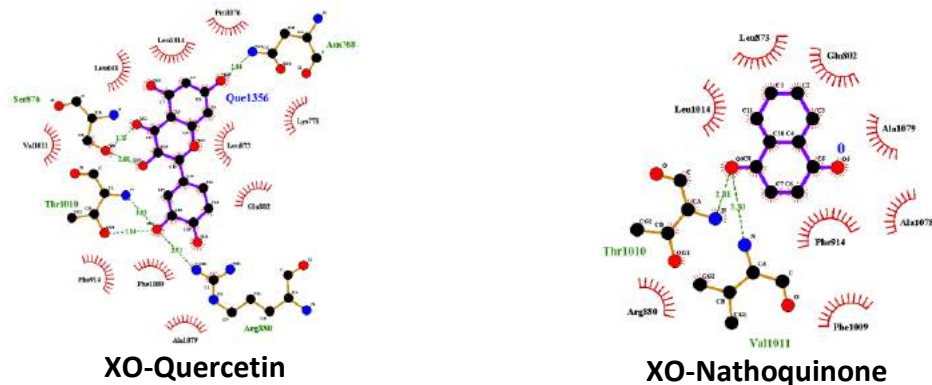
Pada pendekatan senyawa–protein dengan STITCH *Pathway Prediction*, ikatan bio-aktif bawang Dayak dengan protein target kurang baik. Perlu dilakukan pendekatan *protein–protein interaction* dengan program STRING.

Analisis *docking* menggunakan program Autodock PyrX 9.5 bertujuan mengetahui *binding affinity* yang terjadi antara reseptor dan ligan. Analisa dilakukan untuk menilai kontribusi asam amino pada ikatan reseptor dan ligan. Asam amino yang berinteraksi pada ikatan berwarna hijau adalah ikatan hydrogen dan hitam adalah ikatan hidrofobik. (gambar 5.9).



Gambar 5.9 Ikatan bioaktif dengan protein target Xanthine Oxidase (Biru Napthoquinone, Merah Quercetin). Napthoquinone berikatan dengan XO pada sisi aktif XO

Berdasarkan analisa Ligplot senyawa aktif bawang Dayak terdapat persamaan protein Quercetin (kontrol) dan Napthoquinone. Kesamaan protein memperkuat ikatan hidrofobik (Leu1014, Glu802, Phe 1009) dan ikatan hydrogen (Thr1010) (tabel 5.9).

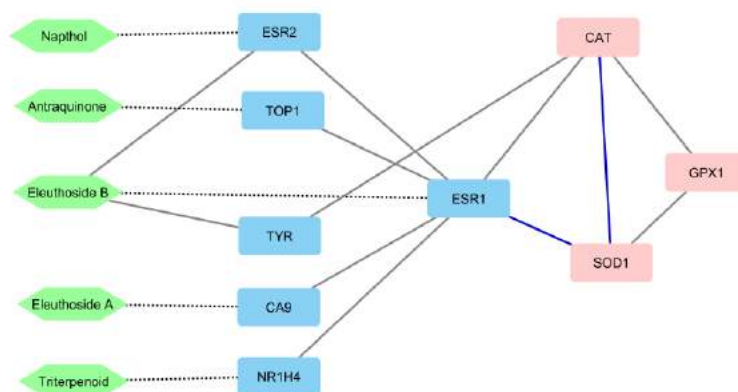


Gambar 5.10 Interaksi ligan dan reseptor senyawa aktif bawang Dayak sebagai modulator stres oksidatif. Ikatan bahan aktif dengan protein target didukung oleh ikatan hidrofobim dan hydrogen.

Tabel 5.9 Kesamaan protein dengan ikatan hidrofobik dan ikatan hidrogen

Reseptor	Ligand	Ikatan hidrofobik	Ikatan hidrogen
Xanthine Oxidase	Quercetin	Leu648, Leu1014 , Pro1076, Lys771, Leu873, Glu802 , Ala1079, Phe1009 , Phe914, Val1011	SER876, Thr1010 , Arg880, Asn768
	Napthoquinone	Leu873, Leu1014 , Glu802 , Ala1079, Phe914, Ala1078, Phe1009 , Arg880	Val1011, Thr1010

Pada pendekatan senyawa–protein dengan *STITCH Pathway Prediction*, ikatan senyawa aktif bawang Dayak dengan protein target kurang baik. Perlu dilakukan pendekatan *protein–protein interaction* dengan program STRING.



Gambar 5.11 Analisa STRING senyawa aktif bawang Dayak sebagai modulator stres oksidatif. Bahan aktif bekerja melalui protein perantara sebagai aktifitas modulator stres oksidatif.

Tabel 5.10 Interaksi bioaktif bawang Dayak dengan protein target modulator stres oksidatif

Uniprot ID	Gene Code	ChEMBL ID	By Homology	Probability	Number of sim. cmpds (3D)	Number of sim. cmpds (D2)	Target Class
Q92731	ESR2	CHEMBL242	Yes	0.37	2	3	Transcription Factor

Interaksi antara senyawa bawang Dayak dengan protein modulator stres oksidatif: CAT (Catalase), SOD1 (superoxide dismutase 1), dan GPX1 (Glutathione Peroxidase 1) diperantarai oleh ESR2. ESR2 merupakan target dari Eleuthoside B dengan nilai prediksi 0.37. Sehingga bawang Dayak diprediksi dapat terlibat dalam induksi protein yang berperan sebagai modulator stres oksidatif secara tidak langsung.

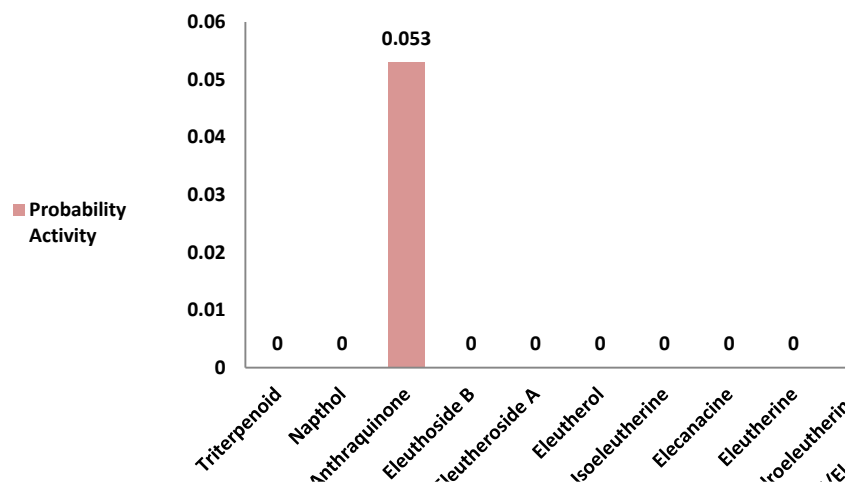
Mendukung penelitian sebelumnya, ekstrak bawang Dayak mempunyai kemampuan sebagai modulator stres oksidatif. Naphthoquinone mempunyai aktifitas scavenging SOR ($O_2\bullet$, $\bullet OH$, $BuOO\bullet$) (Yoshida *et al.*, 2014). Senyawa aktif (-)-

isoeleutherin (Han *et al.*, 2008) triterpenoids (Cai *et al.*, 2019) dan anthraquinone mempunyai potensi modulator stres oksidatif yang kuat (Han *et al.*, 2019). Pada penelitian ini didapatkan senyawa eleutherine mempunyai kadar yang tinggi dan mampu berikatan dengan protein target *xanthine-oxidase*.

5.9.2c Hasil prediksi sebagai anti adhesi melalui enzim *Tryptase*.

Pada pendekatan PASS SERVER, anthraquinone (Pa 0,053) mempunyai kemampuan yang sangat kecil (Pa<0,3) sebagai *tryptase inhibitor*.

Berdasarkan HIT-PICK dan *molecular docking*, tidak dijumpai senyawa aktif bulbus (umbi) bawang Dayak yang mampu berikatan lebih baik dengan protein *tryptase inhibitor*, dibandingkan dengan kontrol *tryptase* (Ba -12,1). Dari hasil komputasi dapat disimpulkan bahwa senyawa aktif bulbus (umbi) bawang Dayak tidak dapat bereaksi dengan *tryptase inhibitor*.



Gambar 5.12 *Probability activity tryptase inhibitor*. Pada pendekatan PASS SERVER didapatkan anthraquinone (Pa 0,053) mempunyai kemampuan yang sangat kecil sebagai *tryptase inhibitor*.

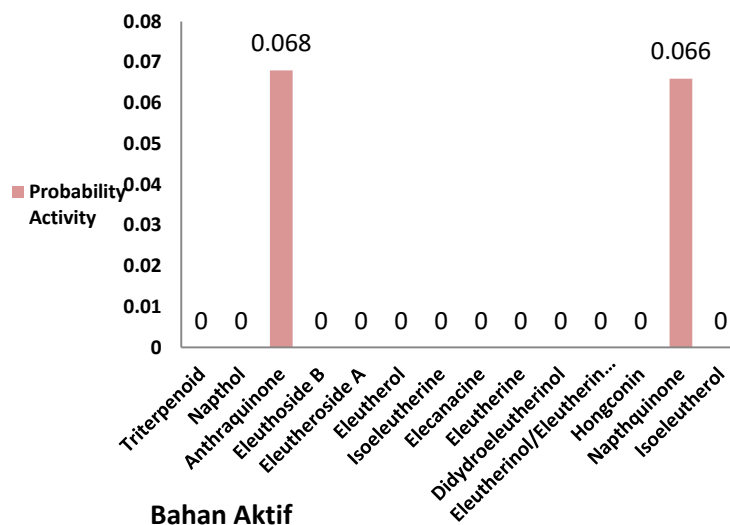
Tabel 5.11 **Probability activity tryptase inhibitor**, pada prediksi protein target terhadap enzim tryptase, eleuthoside B (Ba -8,8) diprediksi mampu berikatan dengan protein *tryptase inhibitor* dibawah kontrol *tryptase*.

Ligand	Binding Affinity	rmsd/ub	rmsd/lb
kontrol tryptase	-12.1	0	0
eleuthoside B	-8.8	0	0
triterpenoid	-8.6	0	0
dihydroeleutherinol	-8.1	0	0
Eleutheroside A	-8	0	0
eleutherinone/ Eleutherinol	-7.5	0	0
anthraquinone	-7.4	0	0
hongconin	-7.1	0	0
elecanacin	-7	0	0
isoeleutherine	-6.9	0	0
eleutherine	-6.9	0	0
eleutherol	-6.7	0	0
isoeleutherol	-6.7	0	0
naphthoquinone	-6	0	0
naphthol	-5.9	0	0

Berbeda dengan penelitian sebelumnya, pemberian anthraquinone menghambat aktivasi tryptase (Garcia-Vilas *et al.*, 2015). Pada penelitian ini tidak dijumpai senyawa aktif bawang Dayak yang mempunyai kemampuan sebagai *tryptase inhibitor*. Hal ini diduga karena belum ada data penelitian tentang ekstrak bawang Dayak sebagai *tryptase inhibitor*.

5.9.2d Hasil prediksi sebagai anti adhesi melalui enzim *chymase*.

Triterpenoid mempunyai kemampuan *binding affinity* yang lebih baik dibanding kontrol *chymase* pada pendekatan *HIT-PICK* dan *molecular docking*. Tetapi pada pendekatan PASS SERVER, triterpenoid tidak mempunyai aktifitas sebagai *chymase inhibitor*. Anthraquinone (Pa 0,068) dan naphthoquinone (Pa 0,066) mempunyai kemampuan yang sangat kecil (Pa<0,3) sebagai *chymase inhibitor*. Dapat disimpulkan senyawa aktif bawang Dayak tidak mempunyai potensi sebagai *chymase inhibitor*.



Gambar 5.13 *Probability activity chymase inhibitor*. Pada pendekatan PASS SERVER didapatkan anthraquinone (Pa 0,068) dan npathoquinone (Pa 0,066) mempunyai kemampuan yang sangat kecil sebagai *chymase inhibitor*.

Tabel 5.12 *Probability activity chymase inhibitor*, prediksi protein target terhadap enzim *chymase inhibitor*, triterpenoid (Ba -7,7) diprediksi mampu berikatan dengan protein *chymase inhibitor* diatas kontrol *chymase* (Ba -7,6).

Ligand	Binding Affinity	rmsd/ub	rmsd/lb
triterpenoid	-7.7	0	0
kontrolchymase	-7.6	0	0
eleuthoside B	-7.5	0	0
anthraquinone	-7.2	0	0
dihydroeleutherinol	-7.1	0	0
eleutheroside A	-7.1	0	0
eleutherine	-6.7	0	0
hongconin	-6.7	0	0
isoeleutherine	-6.7	0	0
eleutherinone/eleutherinol	-6.6	0	0
elecanacin	-6.6	0	0
isoeleutherol	-6.6	0	0
eleutherol	-6,6	0	0
naphthoquinone	-6.3	0	0
naphthol	-5.8	0	0

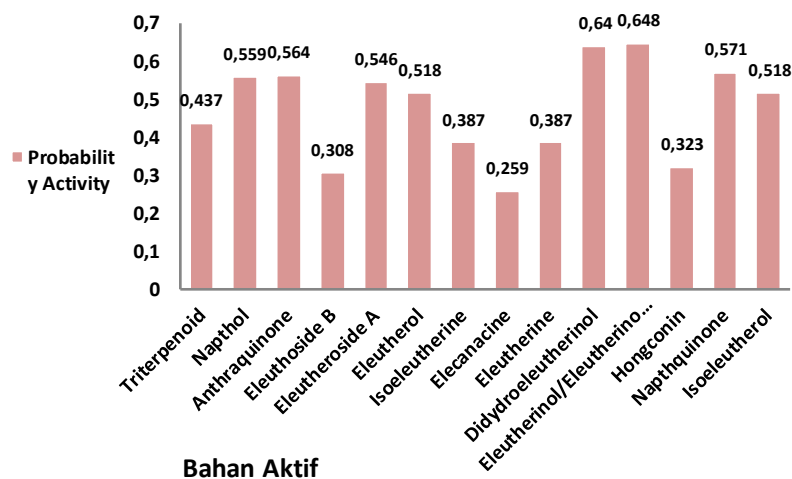
Berbeda dengan penelitian sebelumnya, senyawa anthraquinones dan naphthoquinones memiliki aktivitas *chymase inhibitor* (Devarajan *et al.*, 2018). Pada penelitian ini dengan pendekatan PASS SERVER diprediksi antraquinone (Pa 0.068)

dan naphthoquinone (Pa 0.066) mempunyai aktivitas yang sangat kecil sebagai *chymase inhibitor*. Triterpenoid, eleuthoside B dan anthraquinone mampu berikatan dengan protein target *chymase* dibanding dengan kontrol *chymase*, tetapi tidak memiliki aktivitas sebagai *chymase inhibitor*.

5.9.2e Hasil prediksi sebagai anti adhesi melalui enzim *histamine release inhibitor*.

Pada pendekatan prediksi aktivitas biologi menggunakan PASS-SERVER didapatkan 2 senyawa aktif bawang Dayak sebagai *histamine release inhibitor*, yaitu: eleutherinone/eleutherinol (Pa 0,648) dan dihydroeleutherinol (Pa 0,640).

Pendekatan HIT-PICK dan *molecular docking* dengan pembanding doxepine sebagai kontrol *histamine*, tidak didapatkan senyawa aktif yang berpotensi lebih baik dibanding doxepine sebagai kontrol *histamine* (Ba -11). Naphthol (Ba -8,1) mempunyai kemampuan yang paling baik diantara senyawa aktif bawang Dayak.



Gambar 5.14 *Probability activity sebagai enzim histamine release inhibitor.* Eleutherinol (0.648), dihydroeleutherinol (0.64) dan naphthol (0.599) mempunyai kemampuan yang paling baik sebagai histamine release inhibitor.

Table 5.13 **Prediksi protein target terhadap enzim histamine release inhibitor.** Tidak ada bahan aktif bahan Dayak yang mempunyai kemampuan lebih baik disbanding control pada protein target *histamine*

Ligand	Binding Affinity	rmsd/ub	rmsd/lb
eleuthoside_b	-1.6	0	0
hongconin	-5.1	0	0
eleutherine	-5.5	0	0
isoeleutherine	-5.5	0	0
eleutherinoside_a	-5.6	0	0
dihydroeleutherinol	-5.8	0	0
eleutherol	-6.5	0	0
isoeleutherol	-6.5	0	0
eleutherinol/eutherinone	-6.7	0	0
elecanacin	-6.8	0	0
anthraquinone	-7.5	0	0
naphthoquinone	-7.9	0	0
naphthol	-8.1	0	0
control	-11	0	0
triterpenoid	22.9	0	0

Walaupun eleutherinone/eleutherinol (Pa 0,648) dan dihydroeleutherinol (Pa 0,640) mempunyai aktifitas yang baik sebagai *histamine release inhibitor*, tetapi ke 2 senyawa tersebut tidak mempunyai kemampuan ikatan dengan protein target *histamine release inhibitor*. Sedangkan naphthol walaupun mempunyai kemampuan ikatan yang cukup baik dengan protein *histamine release inhibitor*, tetapi tidak mampu berikatan dengan *histamine release inhibitor*.

Pada pendekatan PASS SERVER eleutherinol/eleutherinone (Pa 0.648) dan dihydroeleutherinol (Pa 0.640) diprediksi mempunyai aktivitas *histamine release inhibitor*. Tetapi kedua senyawa tersebut tidak mampu berikatan dengan baik pada protein target *histamine release inhibitor* dibanding kontrol.

5.9.2f Hasil prediksi sebagai anti adhesi melalui enzim *calcium channel*.

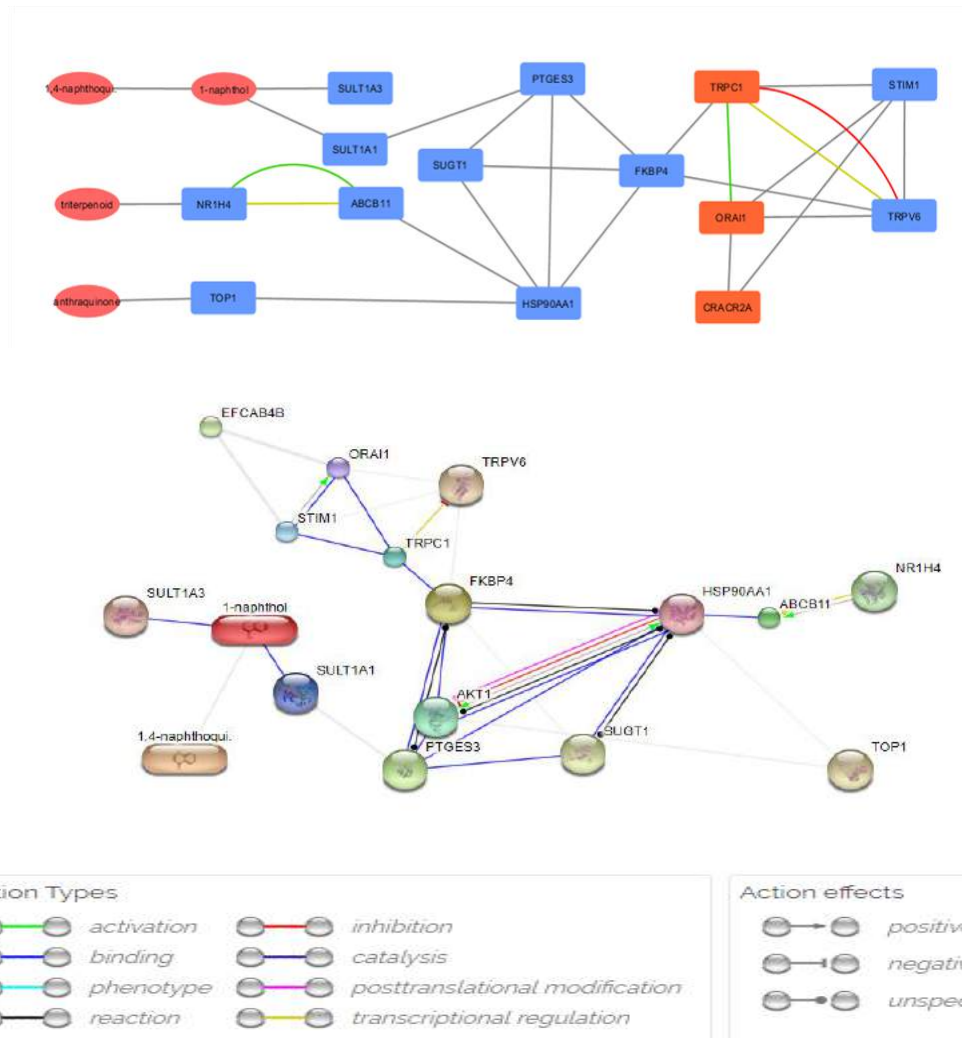
Pada pendekatan prediksi aktivitas biologi menggunakan PASS-SERVER tidak didapatkan aktivitas bulbus (umbi) bawang Dayak sebagai *calcium channel*

inhibitor atau *blocker*. Diduga tidak adanya aktifitas sebagai calcium channel inhibitor/blocker karena belum ada data penelitian yang cukup pada bawang Dayak. Pendekatan HIT-PICK dan *molecular docking* dengan pembanding nomodipine sebagai kontrol *calcium blocker*, didapat 2 senyawa aktif yang berpotensi sebagai *calcium channel blocker*, yaitu : triterpenoid dan anthraquinone.

Tabel 5.14 **Prediksi *Calcium inhibitor/blocker*.** Berdasarkan PASS SERVER tidak ditemukan data probability activity bulbus (umbi) bawang Dayak sebagai calcium channel inhibitor atau blocker. Berdasarkan pendekatan HIT-PICK, 2 senyawa aktif: triterpenoid dan anthraquinone mempunyai potensi lebih baik sebagai calcium blocker dibanding dengan kontrol nomodipine (A+B)

Ligand	Binding Affinity	rmsd/ub	rmsd/lb
triterpenoid	-7.1	0	0
anthraquinone	-6.7	0	0
eleutherinone/eleutherinol	-6.5	0	0
elecanacin	-6.3	0	0
eleutherinoside A	-6.3	0	0
dihydroeleutherinol	-6.2	0	0
eleutherine	-6.1	0	0
isoeleutherine	-6.1	0	0
antraquinone	-6	0	0
isoeleutherol	-6	0	0
eleuthoside B	-6	0	0
control_nomodipine	-5.8	0	0
eleutherol	-5.8	0	0
hongconin	-5.6	0	0
naphthol	-5.4	0	0
naphthoquinone	-5.2	0	0

STITCH analysis dilakukan pada naphthol, anthraquinone dan triterpenoid pada TRPC1, ORAI1 and CRAC sebagai *calcium channel* pada membran sel. Analisis dilakukan untuk medeteksi potensi senyawa aktif bulbus (umbi) bawang Dayak sebagai *calcium channel inhibitor*.



Gambar 5.15 Analisis STITCH bioaktif bawang Dayak pada protein target TRPC1, ORAI1 dan CRAC kanal calcium

Interaksi protein *calcium channel inhibitor* mampu berinteraksi dengan protein inhibitor (TRPC1, ORAI1, CRACR2A) melalui perantara beberapa protein. Senyawa 1,4 Naphthoquinone berinteraksi dengan protein SULTIA1 dan PTGES3, selanjutnya dengan protein HSP90AA1 dan mampu berinteraksi dengan protein *calcium channel inhibitor*. Anthraquinone berinteraksi melalui protein TOP1 dan HSP90AA1. Berdasarkan analisa target protein HITPICK, dapat disimpulkan bahwa

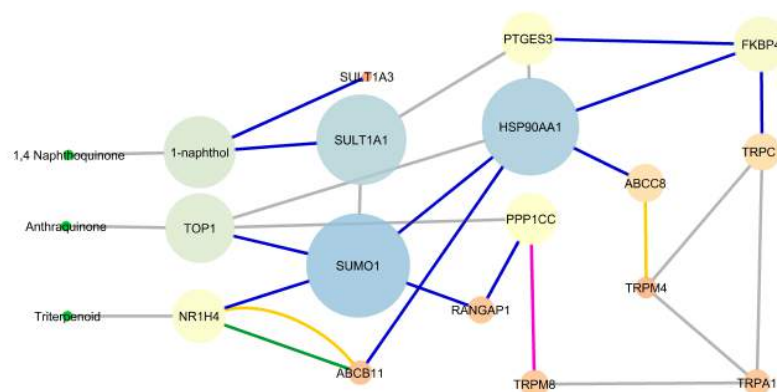
protein NR1H4 merupakan protein target Napthoquinone. NR1H4 mengaktifkan ekspresi dari protein ABCB11, kemudian berikatan dengan protein HSP90AA1 untuk berinteraksi dengan protein *calcium channel inhibitor* melalui FKBP4. TRPV6 dan TRPC1 merupakan protein *calcium channel* pada membran sel yang dihambat agar kadar calcium dalam sitosol menjadi stabil.

Tabel 5.15 Average shortes path length pada kanal calcium membran sel

Protein Target	Average shortes path length
TRPC1	2.82352941
EFCAB4B	4.41176471
Orai1	3.52941176

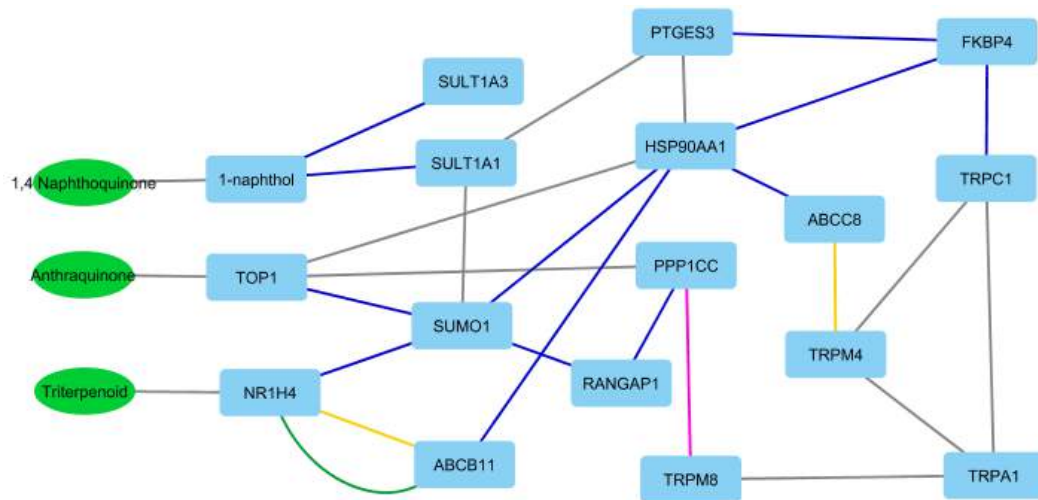
Average shrorest path length analysis merupakan analisis untuk mengetahui jalur tercepat dan terefektif dari suatu network pathway, TRPC1 diprediksi merupakan protein yang paling cepat berinteraksi dengan napthoquinone.

STITCH analysis dilakukan pada naphthol, anthraquinone dan triterpenoid pada TRPM4 dan TRPM8 sebagai *calcium channel* pada membran sel yang sensitif oleh rangsangan mekanik tekanan dan dingin.



Gambar 5.16 Analisis STITCH bioaktif bawang Dayak pada protein target TRPM4 dan TRPM8 kanal calcium inhibitor

Berdasarkan analisa protein utama, SUMO1 dan HSP90AA1 merupakan protein mediator yang banyak dilewati untuk interaksi *calcium channel*. Semakin besar ukuran dan semakin gelap warna visualisasi protein tersebut, maka semakin dominan peranan protein tersebut pada interaksi *calcium inhibitor*.



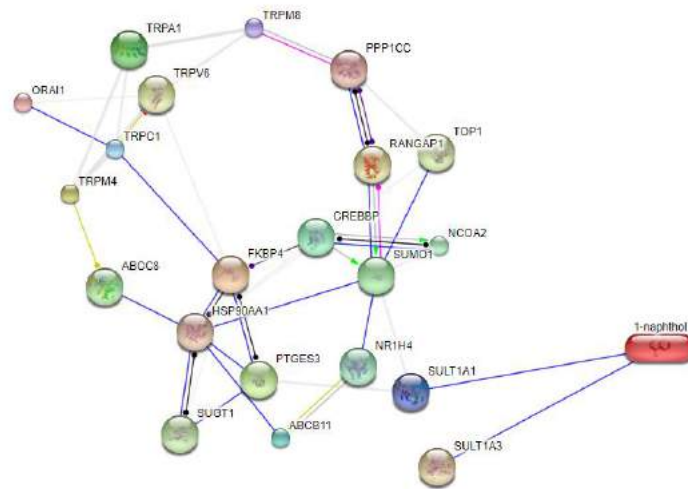
Gambar 5.17 Interaksi bioaktif bawang Dayak dengan protein mediator dengan protein target kanal *calcium inhibitor*

Interaksi protein calcium inhibitor mampu berinteraksi dengan protein inhibitor (TRPM4, TRPM8) melalui perantara beberapa protein. Senyawa 1,4 Naphthoquinone berinteraksi dengan protein SULTIA1 dan PTGES3. Sehingga protein HSP90AA1 dan ABCC8 mampu berinteraksi dengan protein calcium inhibitor. Anthraquinone berinteraksi dengan protein calcium inhibitor melalui TOP1, SUMO1 dan HSP90AA1. NR1H4 merupakan protein target triterpenoid dari analisa target protein HITPICK. NR1H4 mengaktifkan ekspresi protein ABCB11, selanjutnya berikatan dengan protein HSP90AA1 untuk berinteraksi dengan protein calcium inhibitor melalui FKBP4. HSP90AA1 berikatan dengan ABCC8 dan diprediksi memiliki interaksi *transcriptional regulation* dengan TRPM8.

Tabel 5.16 Analisis jalur bioaktif bawang Dayak dengan TRPM4 dan TRPM8

Protein Target	Average shortes path length
TRPM4	3.26315789
TRPM8	3.31578947

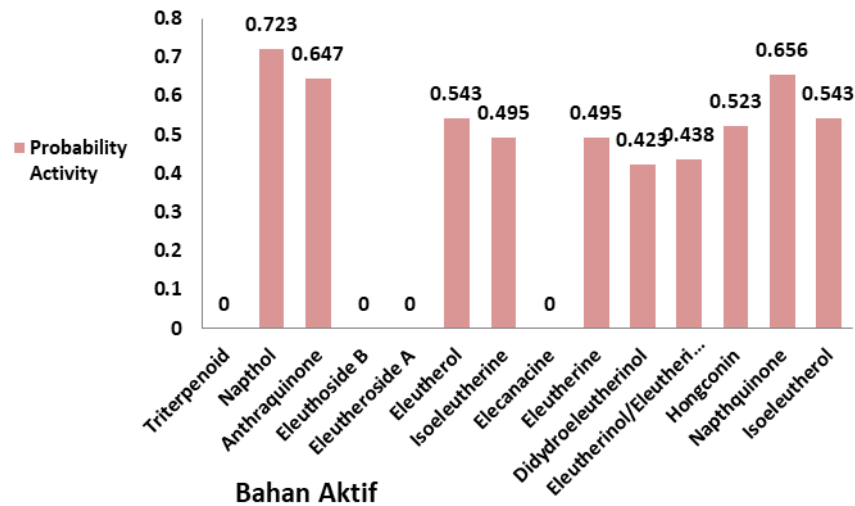
Average shrorest path length analysis merupakan analisis untuk mengetahui jalur tercepat dan terefektif dari suatu *network pathway*, TRPM4 diprediksi merupakan protein yang paling cepat berinteraksi dengan senyawa aktif bulbus (umbi) bawang Dayak.



Gambar 5.18 Analisis Average shrorest path length analysis dengan TRPM4 dan TRPM 8 inhibitor kanal calcium

Berbeda dengan potensi sebagai calcium channel activator, didapatkan 3 senyawa aktif bulbus (umbi) bawang Dayak yaitu: naphthol (Pa 0,723), anthraquinone (Pa 0,647) dan naphthoquinone (Pa 0,656), yang berpotensi paling baik sebagai *calcium channel activator*. Berdasarkan temuan penelitian komputasi ini, didapatkan potensi jalur baru aktifitas bulbus (umbi) bawang Dayak sebagai penstabil sel termasuk sel mast, melalui aktifitasnya pada protein membran sel. Maka penelitian

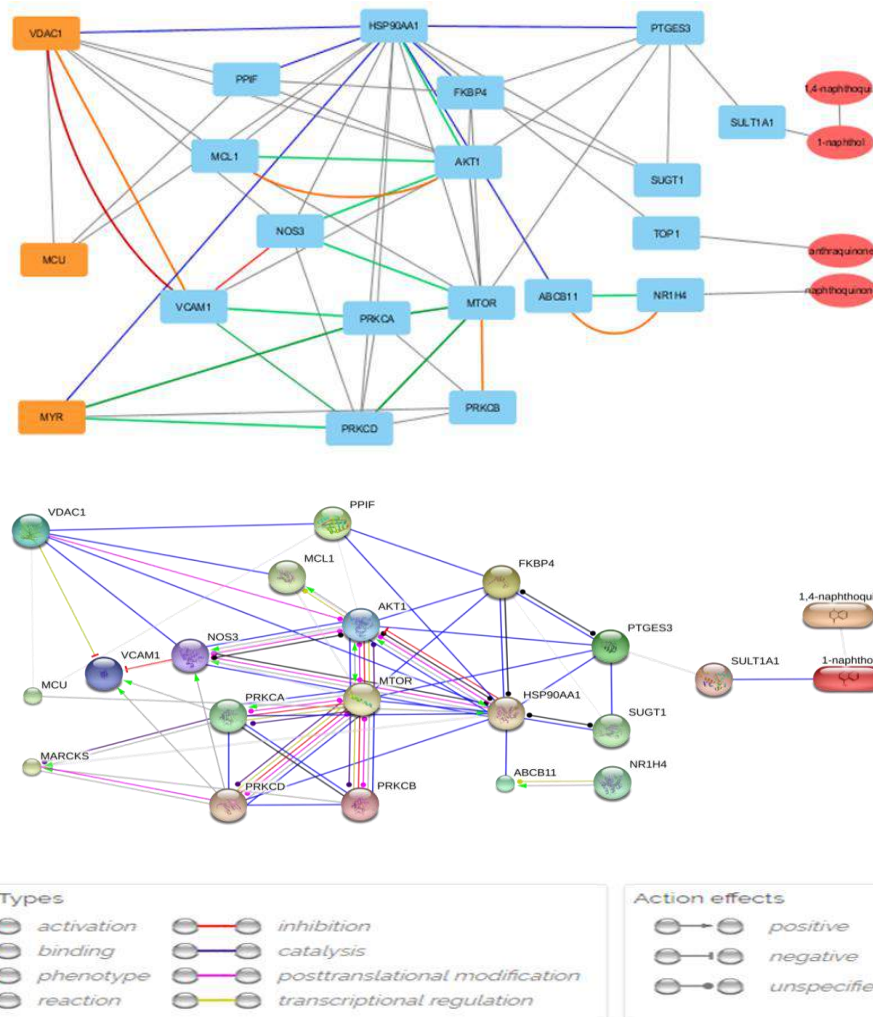
difokuskan pada aktifitas bulbus (umbi) bawang Dayak pada protein calcium channel homeostasis, merupakan keterbaruan penelitian insiliko.



Gambar 5.19 **Prediksi *calcium channel activator*.** Berdasarkan pendekatan PASS SERVER didapatkan 3 senyawa aktif: naphthol, anthraquinone dan naphthoquinone mempunyai potensi lebih baik sebagai *calcium channel activator* (Ca^{2+})

Berdasarkan hasil analisis STITCH, senyawa aktif bulbus (umbi) bawang Dayak naphthoquinone, anthraquinone, dan naphthol mampu berinteraksi dengan protein calcium activator membran mitokondria (VDAC1, MCU, MARCKS/MYR) melalui perantara beberapa protein. 1,4 Naphthoquinone berinteraksi dengan protein SULTIA1 dan PTGES3 kemudian dengan protein HSP90AA1 dan akhirnya mampu berinteraksi dengan protein *calcium activator*. Anthraquinone berinteraksi melalui TOP1 dan HSP90AA1. Berdasarkan analisa target protein HITPICK, NR1H4 merupakan protein target dari Napthoquinone. NR1H4 dapat mengaktifkan ekspresi dari protein ABCB11, kemudian berikatan dengan protein HSP90AA1 untuk berinteraksi dengan protein *calcium activator*. VCAM1 merupakan protein *calcium*

channel pada membran yang dihambat oleh *calcium channel* mitokondria (VDAC1) agar kadar calcium menjadi stabil.



Gambar 5.20 Analisis STITCH bioaktif bawang Dayak dengan *activator channel calcium* mitokondria VDAC1, MCU dan MARCKS

Tabel 5.17 Analisis average shortest path length bioaktif bawang Dayak dengan *activator kanal calcium* mitokondria VDAC1, MCU dan MARCKS

Protein Target	Average shortest path length
VDAC1	2.05
MCU	2.25
MARCKS	2.15

Hasil *average shortest path length analysis*, VDAC1 diprediksi merupakan protein yang paling cepat jalurnya untuk berinteraksi dengan senyawa aktif bulbus (umbi) bawang Dayak sebagai *calcium channel activator*.

Pada penelitian didapatkan temuan baru potensi ekstrak bawang Dayak dalam stabilisasi sel termasuk sel mast melalui homeostasis ion Ca^{2+} . Laparoskopi menyebabkan cedera reperfusi dan stres oksidatif (Veekash *et al.*, 2010., Sammour, 2011). Ekstrak bawang Dayak mampu mencegah aktivasi: TRPM2 yang diaktifkan oleh oksidan, TRPM4 dan TRPM8 yang diaktifkan oleh perubahan suhu dan tekanan, dan TRPC1, ORAI1, CRACR2A yang mampu berikatan dengan naphthoquinone dan anthraquinone. Kanal VDAC1, MCU, dan MARCKS mitokondria, diaktifkan oleh naphthoquinone dan anthraquinone sehingga mampu menyerap ion Ca^{2+} kedalam mitokondria. Dengan diserapnya ion Ca^{2+} dalam mitokondria maka kadar Ca^{2+} dalam sitoplasma menjadi stabil.

PENELITIAN TAHAP 2

6.1 Pendahuluan

Laparoskopi memerlukan insuflasi gas CO₂ untuk mendapatkan visualisasi yang baik. Umumnya insuflasi dilakukan pada tekanan 10–12 mmHg yang berpotensi terjadinya iskemia splanknik karena lebih tinggi dari tekanan fisiologis rongga peritoneum. Saat desuflasi dapat terjadi cedera reperfusi, sehingga terjadi stres oksidatif (Baysal *et al*, 2009., Sammour, 2011., Hendrickson, 2012). Pada hewan coba tekanan diatas 5 mmHg menyebabkan gangguan fisiologis paru. Pada manusia tekanan diatas 12 mmHg menimbulkan *Intra Abdominal Hypertensi* (IAH) dan tekanan diatas 20 mmHg menimbulkan *Abdominal Compartement Syndrome* (ACS) (Avital *et al.*, 2009, Hatipoglu *et al.*, 2014).

Belum ada penelitian tentang besar tekanan dan pengaruh pada perubahan mikroskopis, perubahan sel mast dan skoring adesi intra-abdominal. Penelitian ini diharapkan dapat menentukan tekanan laparoskopi yang menyebabkan perubahan patologis pada rongga peritoneum dari aspek: derajat inflamasi, derajat stres oksidatif, derajat degranulasi sel mast, perubahan sel mesotelial, perubahan matrik ekstra seluler dan derajat adesi. Diharapkan dapat memberikan rekomendasi tekanan yang optimal pada laparoskopi.

Berdasarkan penjelasan pada latar belakang, penelitian tahap 2 didapatkan rumusan masalah dan submasalah sebagai berikut:

6.2 Perumusan Masalah tahap 2

6.2.1 Masalah Penelitian

Apakah terdapat perbedaan skoring adesi intra abdominal kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi pada tekanan 5 mmHg, 8 mmHg, 10 mmHg dan 12 mmHg pasca laparoscopi.

6.2.2 Sub Masalah Penelitian

1. Apakah terdapat perbedaan kadar TGF β , IL-10 dan rasio TGF- β /IL-10 cairan peritoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi pada tekanan 5 mmHg, 8 mmHg, 10 mmHg dan 12 mmHg pasca laparoscopi ?
2. Apakah terdapat perbedaan kadar *Total Oxidant Status (TOS)*, *Total Antioxidant Capacity (TAC)*, Oksidatif Stes Indek (OSI) cairan peritoneal dan kadar MDA jaringan peritoneum pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi pada tekanan 5 mmHg, 8 mmHg, 10 mmHg dan 12 mmHg pasca laparoscopi ?
3. Apakah terdapat perbedaan jumlah sel mast dan persentase degranulasi sel mast, kadar *histamine*, *tryptase* dan *chymase* cairan peritoneal, pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi pada tekanan 5 mmHg, 8 mmHg, 10 mmHg dan 12 mmHg pasca laparoscopi ?
4. Apakah terdapat perbedaan ekspresi *zone occludin-1 (ZO-1)* jaringan peritoneum pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang

diberikan tekanan insuflasi pada tekanan 5 mmHg, 8 mmHg, 10 mmHg dan 12 mmHg pasca laparoscopi ?

5. Apakah terdapat perbedaan ketebalan matrik ekstra seluler (MES) pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi pada tekanan 5 mmHg, 8 mmHg, 10 mmHg dan 12 mmHg pasca laparoscopi ?
6. Apakah terdapat perbedaan skoring adesi intra-abdominal dan perubahan mikroskopis kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi pada tekanan 5 mmHg, 8 mmHg, 10 mmHg dan 12 mmHg pasca laparoscopi ?

6.3 Tujuan Penelitian tahap 2

6.3.1 Tujuan Umum

Secara umum penelitian tahap bertujuan memperoleh bukti:

Terdapat perbedaan skoring adesi intra abdominal kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi pada tekanan 5 mmHg, 8 mmHg, 10 mmHg dan 12 mmHg pasca laparoscopi dan derajat adesi paling berat pada tekanan 12 mmHg.

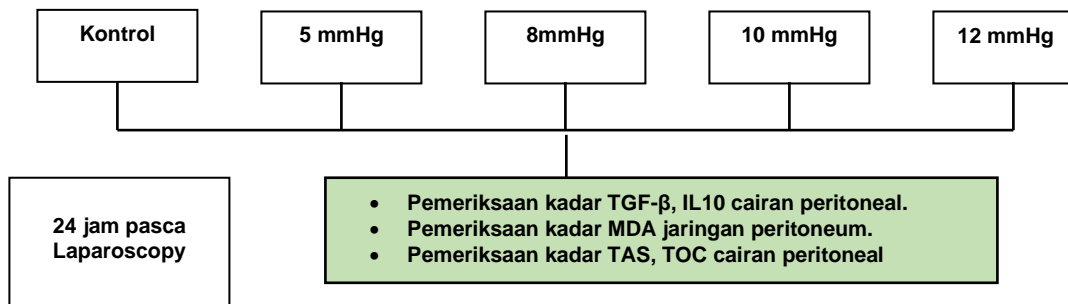
6.3.2 Tujuan Khusus

1. Memperoleh bukti ada perbedaan kadar TGF β , IL-10 dan rasio TGF- β /IL-10 cairan peritoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi pada tekanan 5 mmHg, 8 mmHg, 10 mmHg dan 12 mmHg pasca laparoscopi.

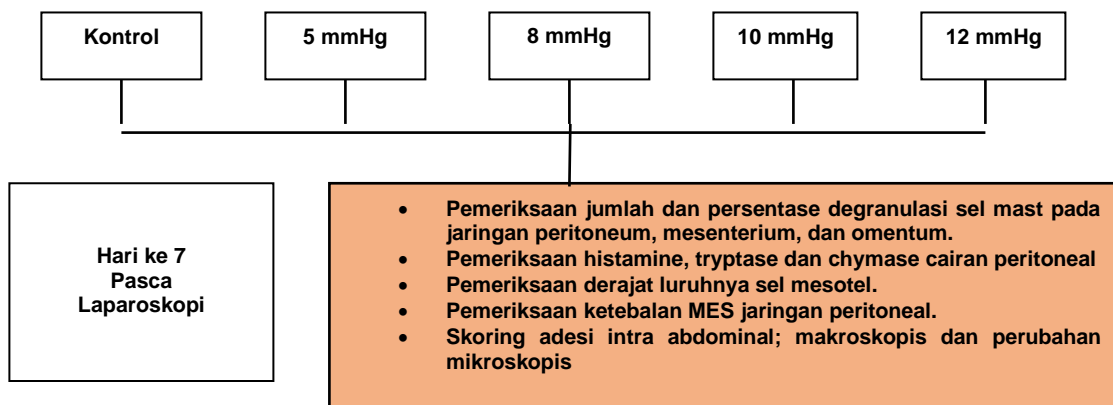
2. Memperoleh bukti ada perbedaan kadar *Total Oxidant Status* (TOS), *Total Antioxidant Capacity* (TAC), Oksidatif Stres Indek (OSI) cairan peritoneal dan kadar MDA jaringan peritoneum pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi pada tekanan 5 mmHg, 8 mmHg, 10 mmHg dan 12 mmHg pasca laparoskopi.
3. Memperoleh bukti ada perbedaan jumlah sel mast dan persentase degranulasi sel mast, kadar *histamine*, *tryptase* dan *chymase* cairan peritoneal, pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi pada tekanan 5 mmHg, 8 mmHg, 10 mmHg dan 12 mmHg pasca laparoskopi.
4. Memperoleh bukti ada perbedaan ekspresi *zone occludin 1* (ZO-1) jaringan peritoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi pada tekanan 5 mmHg, 8 mmHg, 10 mmHg dan 12 mmHg pasca laparoskopi.
5. Memperoleh bukti ada perbedaan ketebalan matrik ekstra seluler (MES) pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi pada tekanan 5 mmHg, 8 mmHg, 10 mmHg dan 12 mmHg pasca laparoskopi.
6. Memperoleh bukti ada perbedaan skoring adesi intra abdominal dan perubahan mikroskopis kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi pada tekanan 5 mmHg, 8 mmHg, 10 mmHg dan 12 mmHg pasca laparoskopi.

6.4 Manfaat dan Alur Penelitian tahap 2

Memperoleh bukti tekanan insuflasi tekanan 10 mmHg menyebabkan skoring adesi intra-abdominal paling berat, untuk dijadikan dasar pada penelitian tahap 3. Berdasarkan perhitungan jumlah sampel, maka jumlah sampel tiap kelompok adalah 6.



Keterangan : Kelompok kontrol, Kelompok laparoskopi dengan tekanan 5 mmHg, Kelompok laparoskopi dengan tekanan 8 mmHg, Kelompok laparoskopi dengan tekanan 10 mmHg, Kelompok laparoskopi dengan tekanan 12 mmHg



Keterangan: Kelompok kontrol, Kelompok laparoskopi dengan tekanan 5 mmHg, Kelompok laparoskopi dengan tekanan 8 mmHg, Kelompok laparoskopi dengan tekanan 10 mmHg.; Kelompok laparoskopi dengan tekanan 12 mmHg.

6.5 Hipotesis penelitian tahap 2

Berdasarkan latar belakang, rumusan masalah, kerangka teori dan kerangka penelitian diajukan hipotesis penelitian sebagai berikut:

Ada peningkatan jumlah dan degranulasi sel mast, serta skoring adesi intra abdominal kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi 10 mmHg dibanding kelompok kontrol.

6.5.1 Sub-hipotesis penelitian

1. Ada peningkatan kadar TGF- β , IL-10 dan rasio TGF- β / IL-10 cairan peritoneal pada kelompok perlakuan kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi 10 mmHg dibanding kelompok kontrol.
2. Ada peningkatan kadar *Total Oxidant Status* (TOS), *Total Antioxidant Capacity* (TAC) cairan peritoneal, *Oxidative Stress Index* (OSI) dan kadar MDA jaringan peritoneum kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi 10 mmHg dibanding kelompok kontrol.
3. Ada peningkatan jumlah sel mast dan persentase degranulasi sel mast, kadar *histamine*, *tryptase* dan *chymase* cairan peritoneal kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi 10 mmHg dibanding kelompok kontrol.
4. Ada peningkatan ekspresi *zone-occludin 1* (ZO-1) jaringan peritoneal kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi 10 mmHg dibanding kelompok kontrol.

5. Ada peningkatan ketebalan matrik ekstra seluler (MES) jaringan peritoneal kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi 10 mmHg dibanding kelompok kontrol.
6. Ada peningkatan skoring adesi intra-abdominal dan perubahan mikrokopis kelompok perlakuan yang diberikan tekanan insuflasi 10 mmHg dibanding kelompok kontrol.

6.6 Hasil dan Analisa penelitian tahap 2

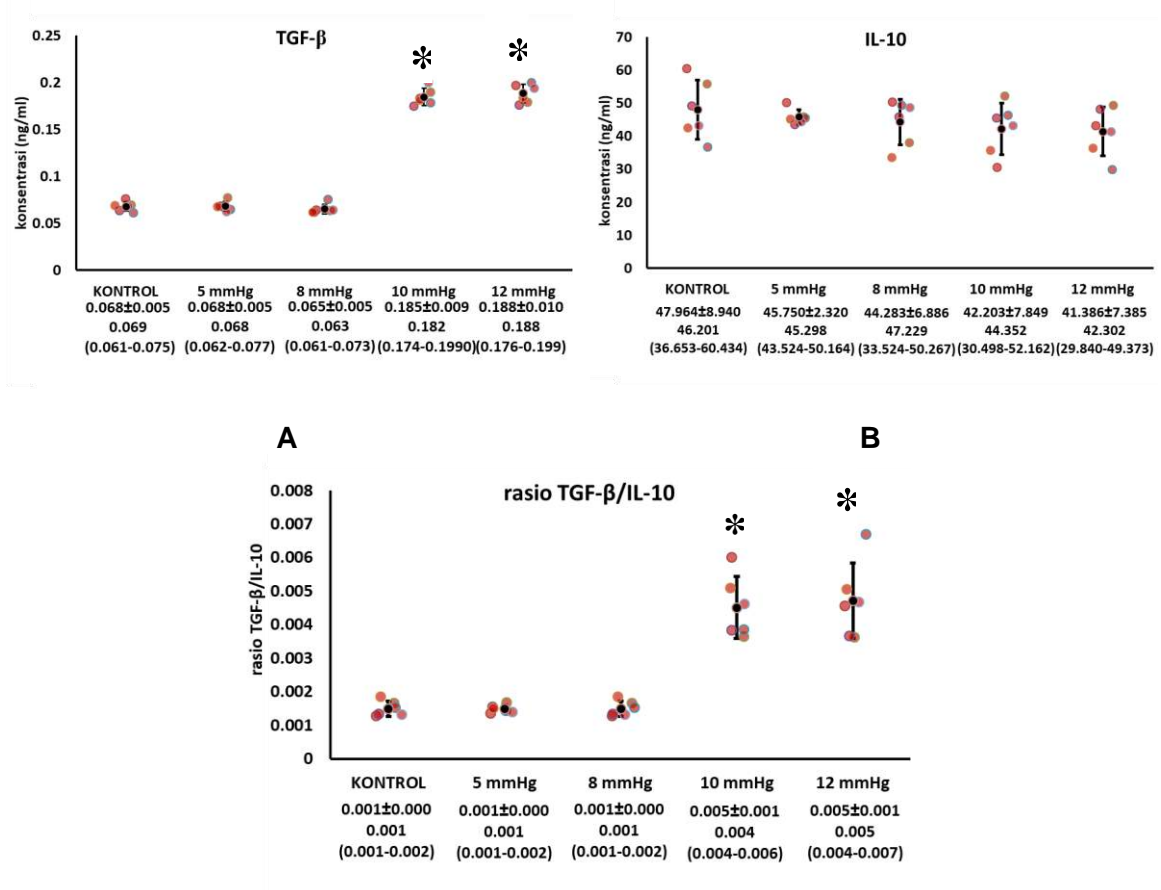
6.6.1 Profil inflamasi pasca pemberian tekanan

Mendukung penelitian sebelumnya: bahwa pneumo-peritoneum melebihi tekanan vena porta (7-10 mmHg) mengakibatkan hipoksia, cedera reperfusi (Sammour *et al.*, 2009., Patel and Yadav, 2016) dan stres oksidatif, kerusakan sel mesotel dan residen sel rongga abdomen (Sammour *et al.*, 2009). Sebagai respon cedera sel, tubuh mengaktifkan respon inflamasi untuk mengeliminasi sel yang rusak (Arung *et al.*, 2011., Sammour, 2011). Respon inflamasi memicu peningkatan sel mast dan memicu produksi TGF- β (Pribadi *et al.*, 2016., Maciver *et al.*, 2011., Sammour, 2011). Vasodilatasi mempermudah rekrutmen sel fagosit untuk mengeliminasi sel yang rusak (Teller and White, 2011.; Widjajanto, 2012).



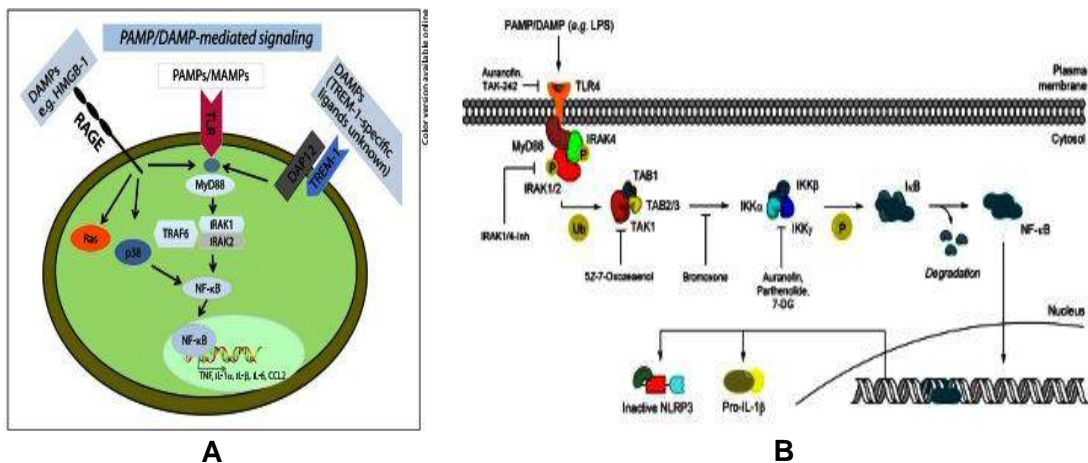
Gambar 6.1 Hubungan TGF- β dan SOR. TGF- β memicu pembentukan SOR dan SOR mengaktifkan TGF- β laten (dikutip dari Liu and Desai, 2015)

Histamine berperan penting pada mekanisme vasodilatasi, sedang TGF- β merupakan *growth factor* terpenting proliferasi. TGF- β meningkatkan proliferasi dan transformasi fibroblas mengakibatkan peningkatan ketebalan MES (Teller *and* White, 2011). SOR mengaktifkan TGF- β dan menginduksi ekspresi gen TGF- β . Sebaliknya TGF- β memicu terjadinya SOR (Gambar 6.1) (Liu *and* Desai, 2015).



Grafik 6.1 Kadar TGF- β , N=6, menggunakan uji Kruskal Wallis dan post Hoc Mann Whitney, * p<0.05 vs kontrol (A); IL-10 Kadar IL-10 cairan peritoneal N=6, menggunakan uji Anova dan Post Hoc LSD p>0.05 vs kontrol (B); cairan peritoneal dan rasio TGF- β /IL-10 N=6, menggunakan uji Welch Robust Tests of Equality of Means dan Post Hoc Games-Howell, * p<0.05 vs kontrol (C), kelompok Kontrol; tekanan 5 mmHg, tekanan 8mmHg, tekanan 10 mmHg dan tekanan 12 mmHg.

Terbukti tekanan 10 mmHg atau lebih pada Rattus norvegicus, menyebabkan cedera reperfusi yang memicu kerusakan sel mesotel, dengan indikator lepasnya sel mesotel dari membrana basalis. Kerusakan sistem mesotelial, mensekresi *Damage Associated Molecular Patterns* (DAMPs) dan mencetuskan respon inflamasi dalam rangka homeostasis (Gambar 6.2). Respon inflamasi menyebabkan sekresi TGF- β berlebihan (Grafik 6.1A). Residen sel bertanggung jawab pada respon inflamasi dan berperan aktif secara otokrin dan parakrin pada proses penyembuhan jaringan, proses regenerasi dan fibrosis. Respon inflamasi harus dikendalikan dengan baik agar proses penyembuhan berjalan dengan baik untuk menghindari kerusakan jaringan dan fibrosis. Mekanisme ini tergantung dari lingkungan mikro, jenis dan beratnya trauma (Wynn *and* Vannella, 2016).

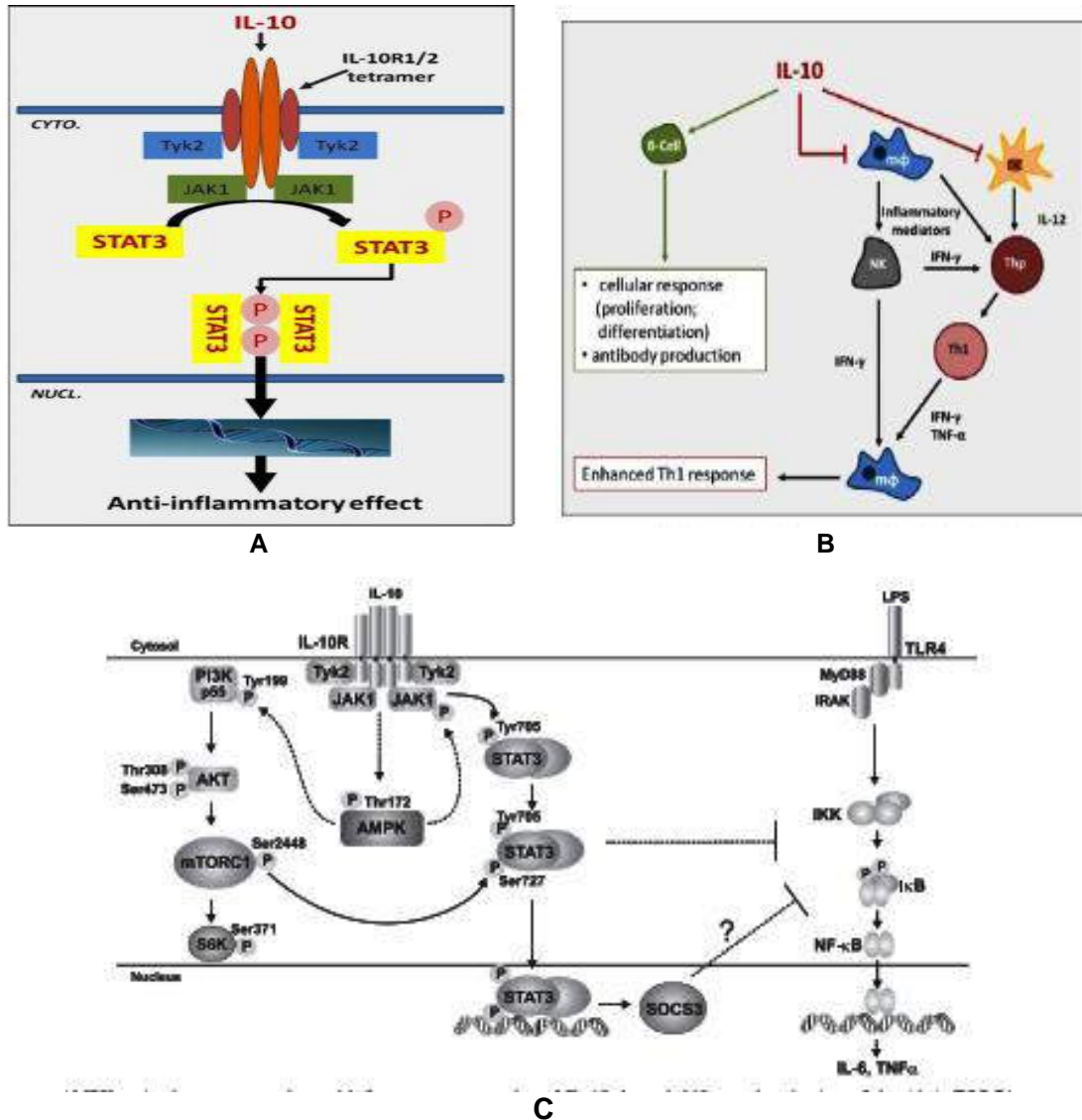


Gambar 6.2 Aktifasi NFκB pasca cedera reperfusi. Molekul DAMPs yang terjadi pasca cedera reperfusi, mengaktifkan respon inflamasi melalui jalur NFκB. DAMP melalui jalur pensinyalan RAGE (A) (dikutip dari Balwin *et al.*, 2015) dan melalui reseptor TLR4 (B) (dikutip dari Mueller *et al.*, 2012)

TGF- β berperan ganda, dalam keadaan normal TGF- β akan meregulasi respon inflamasi dan proses penyembuhan. Pada kondisi patologis, sekresi TGF- β yang berlebihan memicu respon inflamasi melalui aktivasi NFκB. TGF- β memicu

TGF- β sehingga terjadi mesotelial transformasi yang mengarah fibrosis (Yung *and* Chang, 2012).

Penelitian sebelumnya terbukti terjadi perbedaan bermakna kadar IL-10 (Cheong *et al.*, 2001, Saxena *et al.*, 2015 Mataram, 2016). IL-10 merupakan regulator proses inflamasi yang dimodulasi oleh jaringan mesotelial (Sammour *et al.*, 2010). Efek modulator inflamasi IL-10 bekerja melalui blokade gen inflamasi yang mengkode sitokin, kemokin, *cell-surface protein* dan molekul lainnya (Murray, 2009). IL-10 meregulasi makrofag (Cao *et al.*, 2015., Hou *et al.*, 2017) melalui reseptornya (Opal *and* DePalo, 2000). IL-10 merupakan imuno-regulator melalui degradasi gen sitokin proinflamasi (Beghdadi *et al.*, 2011). Tidak didapatkan perbedaan bermakna kadar IL-10 pada penelitian ini. Diduga SOR menyebabkan perubahan reseptor IL-10 pada sel residen rongga abdomen yang berperan pada respon inflamasi sehingga tidak mampu mengikat IL-10. Diduga SOR menyebabkan kerusakan gen IL-10 sehingga respon inflamasi tinggi. Diduga IL-10 yang diproduksi tidak mampu berikatan dengan sel target, sehingga kadar bebas dalam cairan peritoneal tetap tinggi (Grafik 6.1B).. IL-10 merupakan sitokin modulator negatif inflamasi yang berkerja pada reseptor spesifik sel. Ikatan IL-10 pada reseptornya memicu pembentukan gen modulator inflamasi melalui jalur intraseluler STAT3. Peningkatan kadar IL-10 mengekspresikan respon inflamasi yang tinggi. Kadar dalam rentang normal memberikan respon yang baik (Fioranelli *and* Grazia, 2014). Jalur aktivasi IL-10 terjadi pada respon inflamasi yang sangat besar (Zhu *et al.*, 2014) (Gambar 6.3). Diduga respon inflamasi yang disebabkan minimal invasif laparoskopi tidak mengaktifkan jalur IL-10 sehingga kadar IL-10 sehingga tidak didapatkan perbedaan bermakna dengan kontrol.



Gambar 6.3 **Aktivasi IL-10.** Setelah IL-10 terikat pada reseptor, melalui jalur STAT3 terjadi migrasi STAT3 ke nucleus dan terbentuk gen modulator inflamasi (A). IL-10 menjaga keseimbangan sitokin pro dan modulator inflamasi. Respon inflamasi diaktifkan melalui sel B, IL-10 menghambat IFN- γ melalui sel Th1 (B) (dikutip dari Fioranelli and Grazia, 2014). IL-10 mengaktifkan modulator inflamasi melalui jalur JAK/STAT (C) (dikutip dari Zhu et al., 2014)

Mekanisme yang lain, diduga stres oksidatif menyebabkan kerusakan gen yang memblokir koding inflamasi sehingga respon inflamasi tinggi (Grafik 6.1.B)

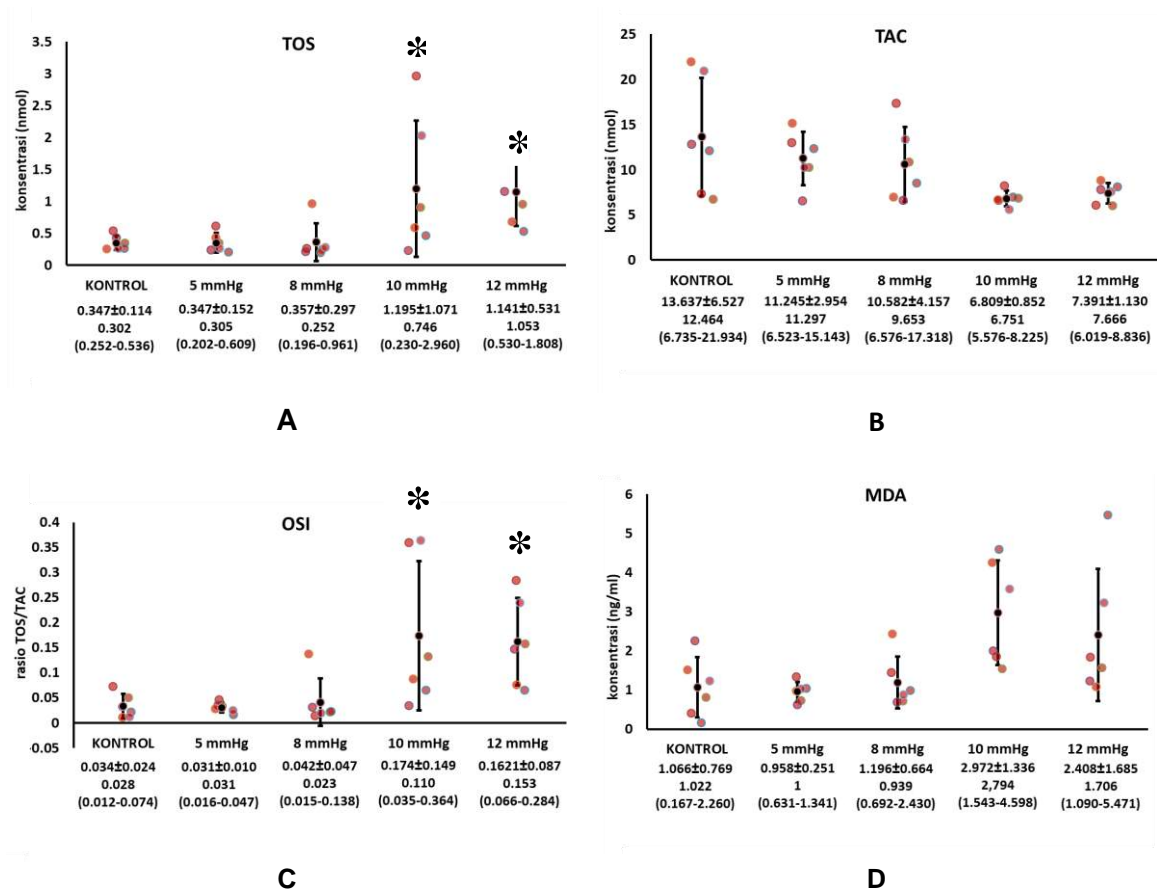
TGF- β merupakan sitokin pencetus fibrosis, sedangkan IL-10 merupakan sitokin yang menekan fibrosis. Peningkatan kadar TGF- β berhubungan dengan

trauma yang signifikan untuk memicu respon inflamasi. Peningkatan kadar IL-10 sebagai penanda adanya respon modulator inflamasi yang menurunkan fibrosis. Bila rasio TGF- β /IL-10 menurun, respon inflamasi yang terjadi mengarah pada penyembuhan jaringan. Bila rasio meningkat respon inflamasi mengarah fibrosis.

Penelitian ini membuktikan terjadi peningkatan rasio TGF- β /IL-10 cairan peritoneal secara bermakna. Hal ini disebabkan karena peningkatan kadar TGF- β sebagai sitokin pencetus adesi dipicu SOR dan respon inflamasi. Peningkatan rasio TGF- β /IL-10 sebagai indikator inflamasi yang mengarah pada adesi dan penebalan MES (Grafik 6.1 C)

6.6.2 Profil stres oksidatif pasca pemberian tekanan

Mendukung penelitian sebelumnya laparoskopi menyebabkan stres oksidatif (Cevrioglu *et al.*, 2004, Baysal *et al.*, 2009, Veekash, *et al.*, 2010). Total Oksidan Status (TOS) sebagai indikator stres oksidatif. Pada penelitian ini terbukti bahwa tekanan 10 mmHg menyebabkan terjadinya stres oksidatif dan peningkatan kadar TOS secara bermakna. Insufiasi menyebabkan penurunan aliran darah dalam rongga abdomen menyebabkan iskemia splannic. Sesuai dengan hukum Hagen-Poiseuille, perengangan rongga abdomen akan menurunkan diameter pembuluh darah. Saat desuflasi akan terjadi aliran oksigen yang menyebabkan pembentukan SOR dan menyebabkan penggunaan modulator stres oksidatif berlebihan. Stres oksidatif menyebabkan kerusakan mesotel, residen dan degranulasi sel mast yang memperberat stres oksidatif (Grafik 6.2A).



Grafik 6.2

C Profil kadar peroksida Total Oksidan Status (TOS) N=6, menggunakan uji ANOVA dan Post Hoc LSD, * p<0.05 vs kontrol (A), Total Modulator stres oksidatif Capacity (TAC) N=6, dengan uji Welch Robust Tests of Equality of Means dan uji Post Hoc Games-Howell, p>0.05 vs kontrol (B), Oksidatif Stres Index (OSI) N=6, dengan uji Welch Robust Tests of Equality of Means dan uji Post Hoc Games-Howell, * p<0.05 vs kontrol cairan peritoneal (C), kadar MDA jaringan peritoneal N=6, dengan uji Welch Robust Tests of Equality of Means dan uji Post Hoc Games-Howell p>0.05 vs kontrol, pada tekanan 5 mmHg, tekanan 8mmHg, tekanan 10 mmHg, dan tekanan 12 mmHg.

Berbeda dengan penelitian sebelumnya (Baysal *et al.*, 2009) tidak didapatkan perbedaan kadar TAC pasca laparoskopi dan mendukung penelitian sebelumnya (Stipancic *et al.*, 2005, Aktimur *et al.*, 2016). Walaupun pada tekanan 10 mmHg sudah terjadi stres oksidatif, tetapi penggunaan modulator stres oksidatif endogen tidak menyebabkan penurunan kadar secara bermakna (Grafik 6.2B). Konsep baru tentang stres oksidatif, bahwa proses yang menghentikan pensinyalan redox dan kerusakan jaringan merupakan stres oksidatif (Raffaelli *et al.*, 2018).

Mendukung penelitian sebelumnya terjadi peningkatan OSI pasca laparoscopi (Baysal *et al.*, 2009). Pada tekanan tersebut, peningkatan stres oksidatif telah menimbulkan kerusakan jaringan. Pada tekanan 10 mmHg menyebabkan kerusakan sel mesotel dan meningkatkan respon inflamasi dengan peningkatan kadar TOS (Grafik 6.2C).

Berbeda dengan penelitian sebelumnya tidak didapatkan perbedaan bermakna MDA pasca laparoscopi.(Aran *et al.*, 2012., Mila-Kierzenkowska *et al.*, 2013). Dan mendukung penelitian lain terjadi peningkatan kadar MDA signifikan pasca laparoscopi. (Ozmen *et al.*, 2002., Kontoulis, 2012). Peningkatan kadar MDA menunjukkan adanya kerusakan sel residen dalam rongga abdomen akibat stres oksidatif. Peningkatan MDA secara tidak bermakna, diduga kerusakan sel juga melalui mekanisme non peroksidasi lipid. Kerusakan sel akibat SOR disebabkan oleh peroksidasi protein dan peroksidasi DNA (Sammour, 2011). Kerusakan sel mesotel menyebabkan lepasnya mesotel dari membrana basalis. Dan kerusakan sel mast menyebabkan peningkatan degranulasi (Grafik 6.2D).

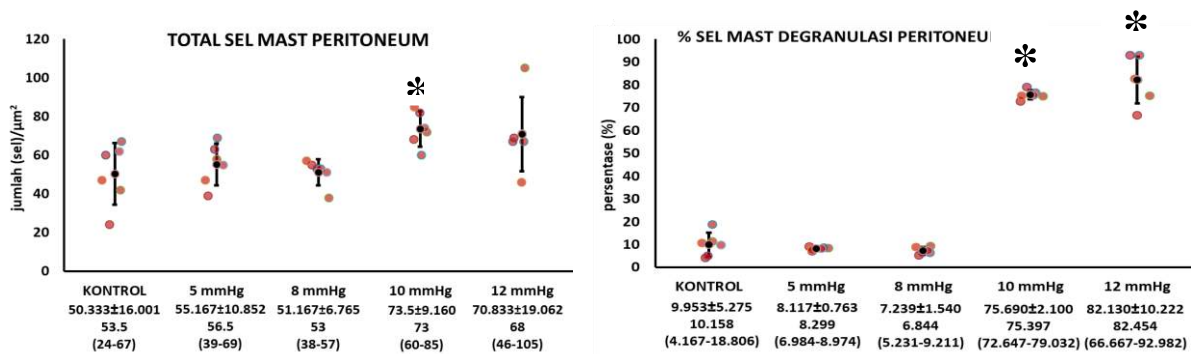
Pembentukan oksidan terjadi dalam rentang waktu 2-5 menit segera setelah cedera reperfusi dan diyakini berasal dari rantai transpor elektron mitokondria dan metabolisme xantin oksidase (XO) (Liu *et al.*, 2004). Superoksida bereaksi dengan efisien sebagai agen pereduksi. Superoxide desmutase (SOD) akan mengkatalisis superoksida ($O_2^{\cdot-}$) selanjutnya membentuk hidrogen peroksida (H_2O_2) radikal hidroksil ($OH\cdot$) melalui reaksi Haber-Weiss sebagai berikut. (Sasaki *and* John, 2007): Apabila produksi SOR melebihi kapasitas modulator stres oksidatif endogen maka terjadi stres oksidatif.

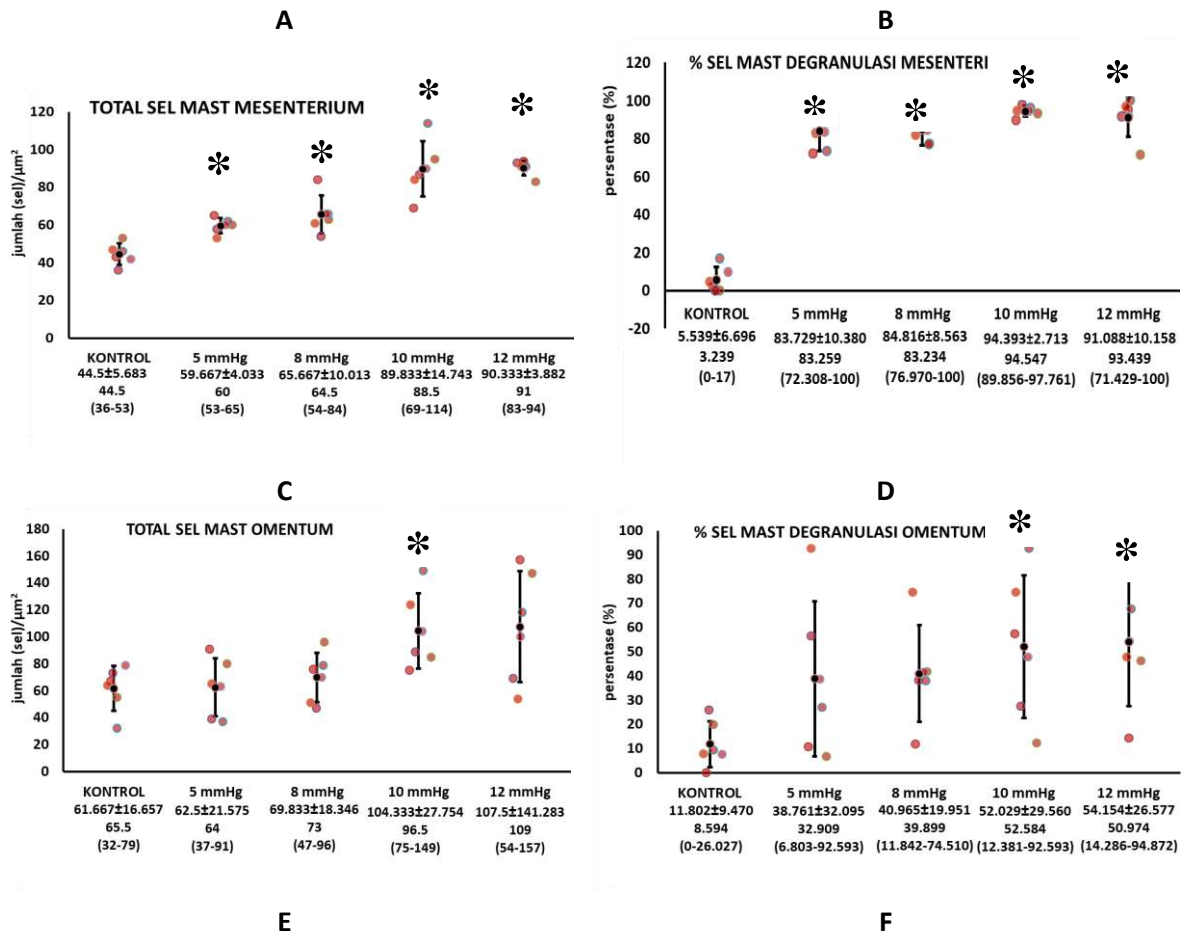
6.6.3a Profil sel mast pasca pemberian tekanan

Pada penelitian ini menguatkan penelitian sebelumnya, terjadi peningkatan jumlah sel mast pasca laparotomi (Hermanowicz *et al*, 2010). Memperdalam temuan penelitian sebelumnya, pada tekanan 10 dan 12 mmHg didapatkan peningkatan jumlah dan degranulasi sel mast pada jaringan omentum dan peritoneum. Didapatkan peningkatan jumlah dan degranulasi sel mast mesenterium mulai tekanan 5 mmHg. Peningkatan degranulasi sel mast disebabkan kerusakan sel akibat stres oksidatif. Oksidan menyebabkan kerusakan dinding sel mast sehingga terjadi degranulasi.

Mastositosis adalah pertumbuhan sel mast yang dipengaruhi oleh lingkungan mikro, ikatan antar sel dan sitokin sebagai *messenger* (Kalesnikoff, 2008, Widjajanto, 2012). Aktivasi sel mast diindikasikan melalui beberapa jalur (Widjajanto, 2012). Terbukti peningkatan jumlah dan degranulasi sel mast pada penelitian ini (Grafik 6.3).

Degranulasi sel mast disebabkan oleh rangsangan imunologis dan non-imunologis. Rangsangan non-imunologis dapat disebabkan beberapa faktor yaitu: SOR, baro-trauma, termo-trauma, inflamasi, dan homeostasis Ca^{2+} . Insufiasi CO_2 mengakibatkan penekanan rongga abdomen dan menyebabkan hipoksia jaringan.



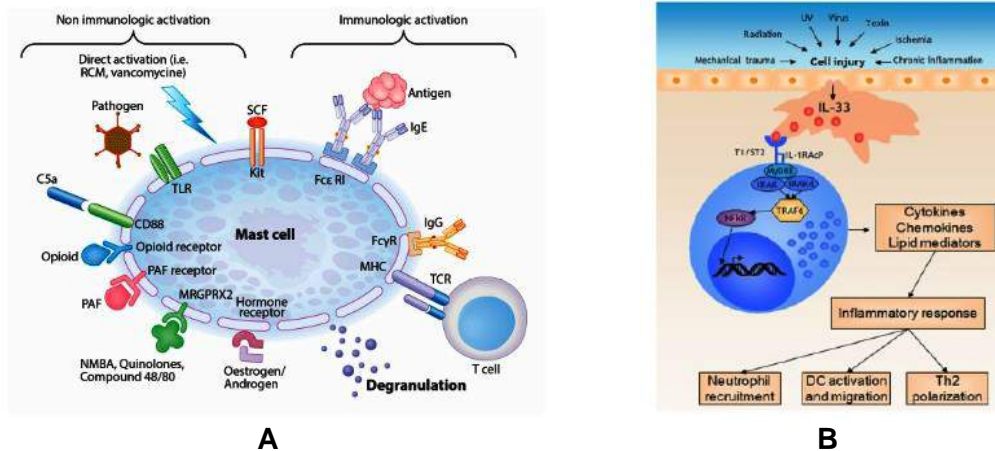


Grafik 6.3 Profil sel mast, Total sel mast jaringan peritoneal N=6, dengan uji Kruskal Wallis dan post Hoc Mann Whitney, * p<0.05 vs kontrol (A), Degranulasi sel mast peritoneum N=6, dengan uji Welch Robust dan Post Hoc Games-Howell, * p<0.05 vs kontrol (B), Total sel mast mesenterium N=6, dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD, * p<0.05 vs kontrol (C), Degranulasi sel mast mesenterium N=6, dengan uji Kruskal Wallis dan post Hoc Mann Whitney, * p<0.05 vs kontrol (D), Total sel mast omentum N=6, dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD, * p<0.05 vs kontrol (E), Degranulasi sel mast omentum N=6, dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD, * p<0.05 vs kontrol (F), kelompok Kontrol, tekanan 5 mmHg tekanan 8mmHg, tekanan 10 mmHg dan tekanan 12 mmHg.

Hipoksia memicu respirasi anaerob sehingga terjadi defisiensi ATP.

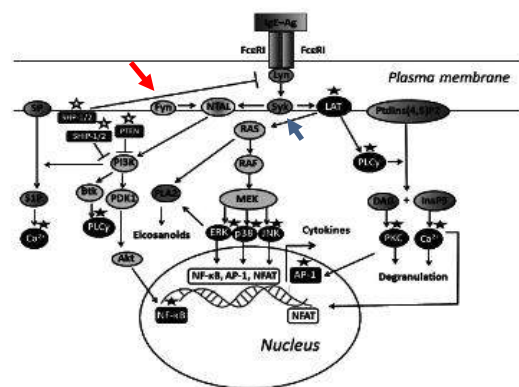
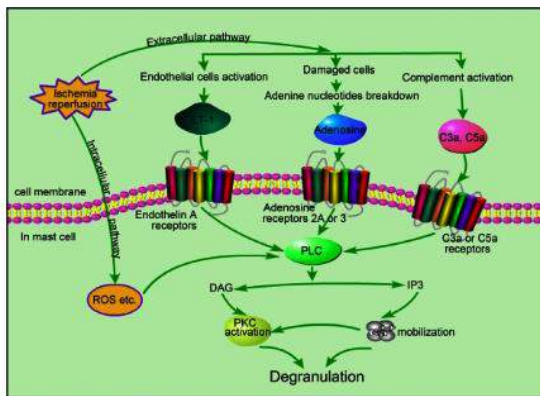
Kekurangan ATP mengakibatkan gangguan pada kanal membran sel yang tergantung pada ATPase. Hal ini menyebabkan gangguan homeostasis air, ion, dan kerusakan sel. Hipoksia menyebabkan aktivasi molekul C3a dan C5a yang mengaktifkan reseptor *G Protein Couple Receptors* (GPCR) sehingga terjadi degranulasi (Gambar 6.4A) (Spoerl *et al.*, 2017, Krystel-Whittemore *et al.*, 2018).

Dengan perantara IL-33 yang disekresi akibat kerusakan sel, memicu degranulasi sel mast setelah terikat dengan reseptor T1/ST2 (Lunderius-Andersson *et al.*, 2012) (Gambar 6.4B).



Gambar 6.4 Aktivasi sel mast akibat rangsangan non imunologis. Degranulasi sel mast terjadi akibat hipoksia jaringan. Melalui aktivasi protein C3a dan C5a pada GPCR (A) (dikutip dari Spoerl *et al.*, 2017). IL-33 yang dihasilkan saat kerusakan sel terikat pada reseptor T1/ST2 dan terjadi aktivitas sel mast (B) (dikutip dari Lunderius-Andersson *et al.*, 2012)

Pembentukan SOR saat desflasi menyebabkan kerusakan sel melalui mekanisme peroksidasi lipid, peroksidasi protein dan peroksidasi DNA (Sammour, 2011). Sel mast sensitif oleh rangsangan fisik tekanan dan dingin. Penggunaan gas CO₂ yang dingin dengan tekanan tertentu pada laparoscopi terbukti mampu mengaktifkan sel mast. Kadar SOR yang tinggi menyebabkan kerusakan sel pada struktur DNA, lipid dan protein sehingga terjadi kerusakan sel. SOR menyebabkan perubahan struktur protein kinase Fyn (↑) dan Syk (↑) dan menyebabkan aktivasi sel mast melalui reseptor FcεRI (Gambar 6.5) (Chelombitko *et al.*, 2016). Pada penelitian ini terbukti terjadi peningkatan jumlah sel mast dan degranulasi sel mast akibat insuflasi gas CO₂.

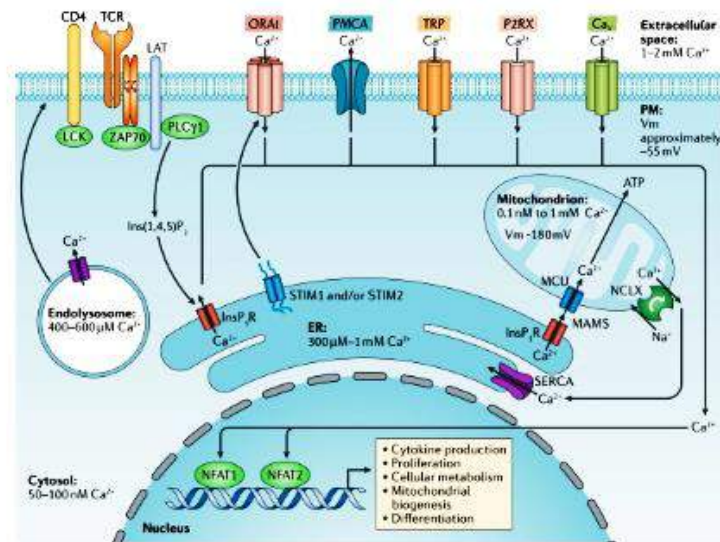


Gambar 6.5 Mekanisme non peroksidasi lipid degranulasi sel mast. Degranulasi sel mast di picu oleh faktor ekstraseluler karena sekresi endothelin-1 (ET-1) dan aktivasi reseptor C3a dan C5a (A) (dikutip dari Yang et al., 2014). Stres oksidatif menyebabkan perubahan protein kinase Fyn (↑) dan Syk (↓) sehingga terjadi gangguan homeostasis Ca^{2+} (B) (dikutip dari Chelombitko et al., 2016)

Degranulasi sel mast terjadi melalui jalur peroksidasi lipid dan non peroksidasi lipid. Kerusakan sel mast akibat cedera reperfusion melalui jalur ekstraseluler dan intraseluler. Jalur ekstraseluler dimediasi oleh reseptor pada permukaan sel mast sedang jalur intraseluler dipicu oleh mediator yang diproduksi sel mast. Jalur ekstraseluler dipicu oleh *breakdown adenine nucleotides* akibat kerusakan sel, Endothelin 1 (ET-1) yang disekresi endotel dan aktivasi reseptor C3a or C5a. Ketiga mekanisme ekstraseluler akan mengaktifkan phospholipase C (PLC). PLC menyebabkan aktivasi protein kinase C (PKC) dan mengakibatkan mobilisasi Ca^{2+} sehingga terjadi degranulasi. Jalur intra sel SOR secara langsung mengaktifkan PLC dan selanjutnya terjadi degranulasi (Yang et al., 2014).

Beberapa bahan aktif mampu menyebabkan degranulasi sel mast melalui jalur non imunologi. Substance P, sitokin, fragmen complement 3a, 5a dan calcium inophores menyebabkan degranulasi sel mast. Metabolisme Ca^{2+} berperan pada mekanisme degranulasi. Peningkatan kadar Ca^{2+} sitosol menyebabkan degranulasi.

Peningkatan Ca^{2+} sitosol berasal dari ekstraseluler dan intra seluler. Peningkatan Ca^{2+} dari ekstraseluler karena aktivasi kanal Ca^{2+} membran sel. Aktivasi kanal STIM1, ORAI1, CRAC, Fyn kinase, TRPM dan TRPV menyebabkan masuknya Ca^{2+} ekstraseluler kedalam sitosol sehingga terjadi degranulasi (Gambar 6.6). Peningkatan Ca^{2+} dari intra sel berasal dari penyimpanan Ca^{2+} intra sel, reticulum endoplasmic dan mitokondria.

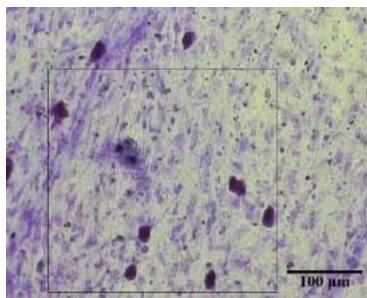


Gambar 6.6 Kanal Ca^{2+} pada sel imun sebagai non eksitabel sel. Sel imun mempunyai distribusi dan pola kanal Ca^{2+} yang sama (dikutip dari Trebak and Kinnet, 2019)

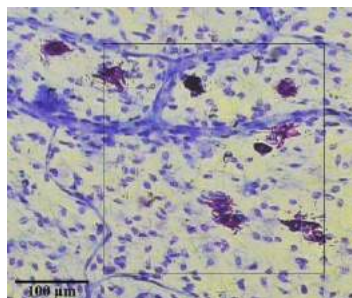
Peningkatan jumlah sel mast berhubungan dengan respon inflamasi akibat kerusakan sel mesotel. Respon inflamasi mencetuskan peningkatan jumlah sel mast, dalam rangka eliminasi sel yang mengalami kerusakan. Peningkatan degranulasi sel mast diduga akibat terganggunya mekanisme homeostasis Ca^{2+} pasca laparoskopi. Sel mast merupakan sel imunologis non eksitabel yang peka terhadap trauma fisik (Bischoff, 2007., Stokes *et al*, 2016). TRPC merupakan kanal Ca^{2+} yang peka terhadap perubahan suhu. CRAC (Yao *et al*, 2014) dan TRPV4 (Shi *et al*, 2008)

merupakan *Mechanosensitive (MS) Channel* yang peka terhadap perubahan tekanan pada laparoscopi.

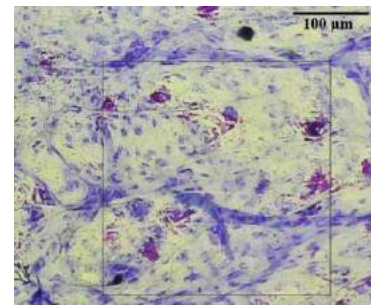
Respon inflamasi sel mast yang berlebihan mengakibatkan kondisi patologis. Saat degranulasi sel mast mengeluarkan mediator inflamasi yaitu: *histamine* dan *tryptase* dan *chymase*. Degranulasi sel mast memicu respon inflamasi dan mengakibatkan pembentukan MES berlebihan. *Tryptase* mengakibatkan degradasi kolagen tipe 4 dan *chymase* mengakibatkan degradasi vitronektin dan fibronectin, enzim yang memicu penebalan MES. Chymase merubah pro-MMP9 menjadi bentuk aktif dan memodulasi penebalan MES (Pejler *et al.*, 2010). Tryptase dan chymase mengaktifkan reseptor PAR2 menyebabkan degradasi komponen cell junction yang menyebabkan lepasnya mesotel dari membrana basalis. *Tryptase* menghambat enzim fibrinolysis (tPA dan uPA) sehingga terjadi peningkatan fibrin. Histamine menyebabkan vasodilatasi vascular dan meningkatkan cell adhesion molekul, sehingga memodulasi migrasi dan proliferasi fibroblas (de Souza Jr *et al.*, 2015).



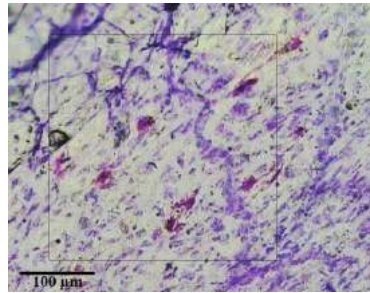
Kontrol



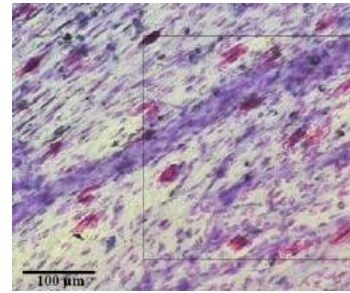
Tekanan 5 mmHg



Tekanan 8 mmHg



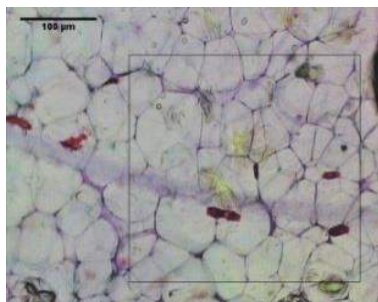
Tekanan 10 mmHg



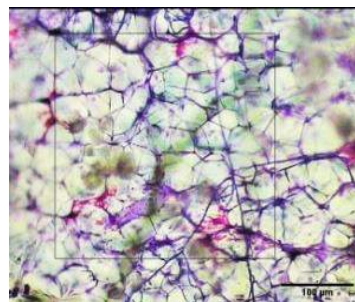
Tekanan 12 mmHg

Gambar 6.7 Profil sel mast mesenterium pada pemberian tekanan. Terdapat peningkatan jumlah dan degranulasi sel mast mesenterium pasca pemberian tekanan.

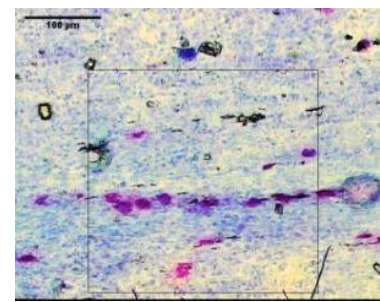
Degranulasi sel mast dan lepasnya mesotel menghambat proses fibrinolisis dan memicu pembentukan fibrin (Hermanowick *et al.*, 2010, Bi *et al.*, 2017). Mediator sel mast memicu adesi intra abdominal melalui beberapa mekanisme. Degranulasi sel mast menghasilkan SOR yang menyebabkan peningkatan permeabilitas vaskuler dan memicu respon inflamasi. Tryptase dan chymase menghambat proses fibrinolisis dan TGF- β meningkatkan ketebalan MES (Bi *et al.*, 2017).



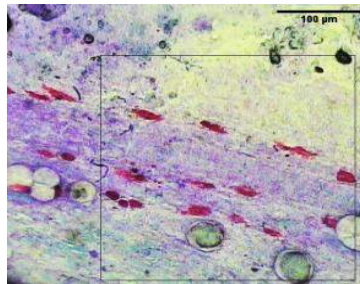
Kontrol



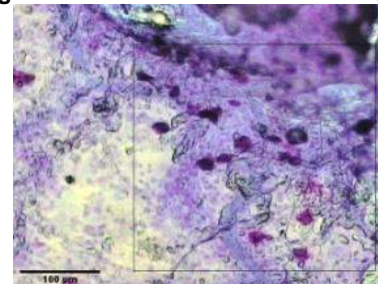
Tekanan 5 mmHg



Tekanan 8 mmHg



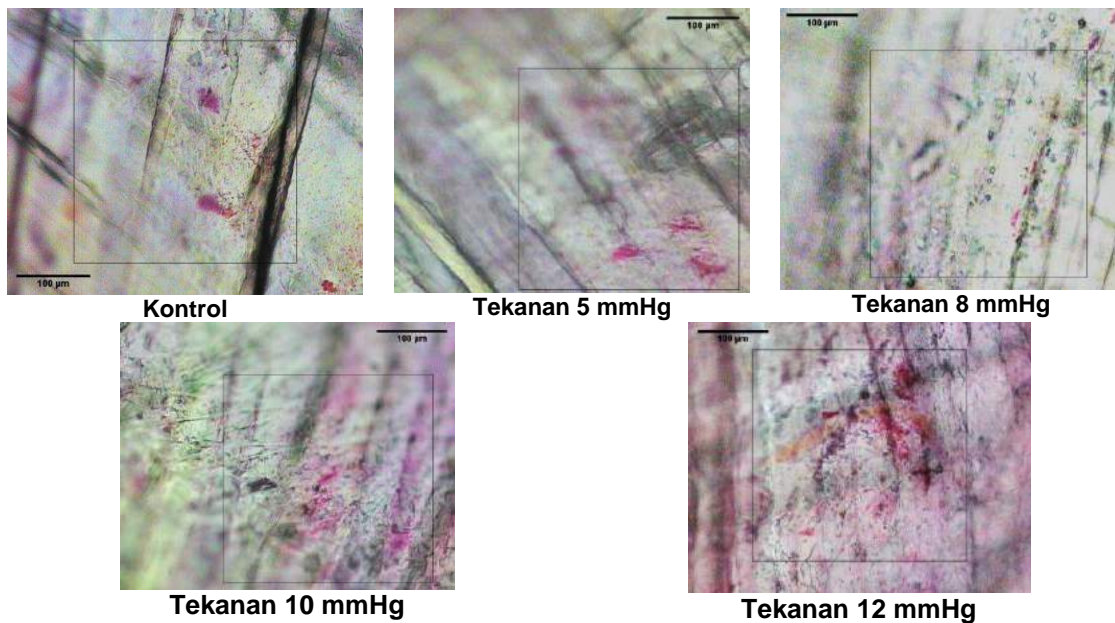
Tekanan 10 mmHg



Tekanan 12 mmHg

Gambar 6.8 Profil sel mast omentum pada pemberian tekanan. Terdapat peningkatan jumlah dan degranulasi sel mast omentum pasca pemberian tekanan.

Respon inflamasi terjadi vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah, mekanisme ini menyebabkan kemotaksis sel mast ke area trauma (Hermanowicz *et al.*, 2010). Mekanisme kemotaksis menyebabkan adanya sel mast pada cairan peritoneal. Mediator inflamasi yang dilepaskan memicu aktivasi sel mast (Berdun *et al.*, 2015). Mesenterium adalah jaringan yang lebih banyak vaskuler, faktor ini diduga menjadi penyebab peningkatan sel mast mesenterium mulai tekanan 5 mmHg.



Gambar 6.9 Profil sel mast peritoneum dengan pemberian tekanan. Terjadi peningkatan jumlah dan degranulasi sel mast peritoneum pasca pemberian tekanan.

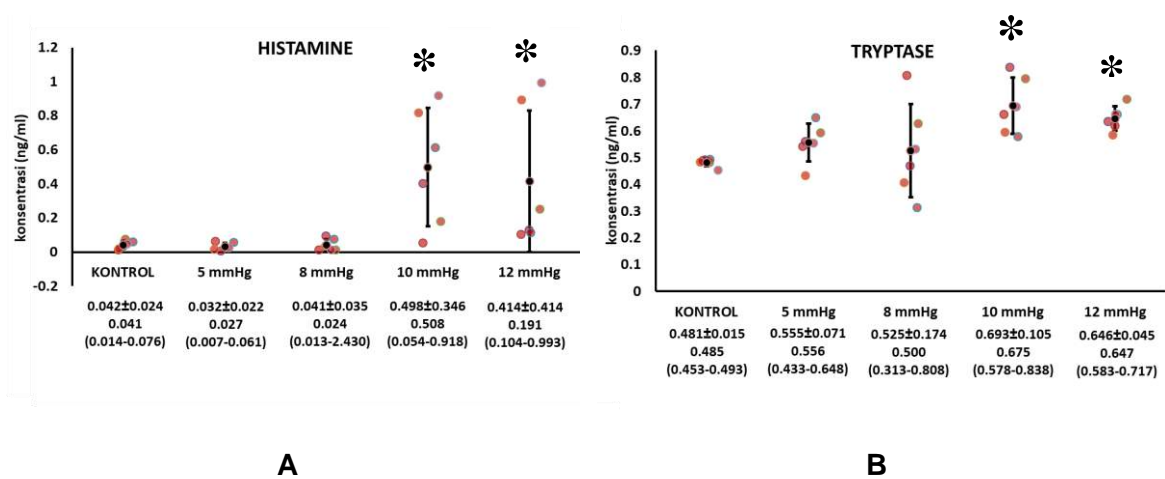
Omentum memiliki keistimewaan karena memiliki *milky-spot*. Merupakan struktur *peculiar adipose-lymphomyeloid-mastocytic* terdiri atas jaringan lemak, limfomioid dan sel mast. Jaringan omentum menjadi saat aktif pada respon inflamasi sehingga dijumpai sel limfoblas dan imunoblas. *Milky spot* omentum merupakan organ imunologi utama rongga abdomen. Omentum merupakan sirkulasi sel radang dan *non-self scavenging* (Panasco *et al.*, 2010). Fungsi yang spesifik ini

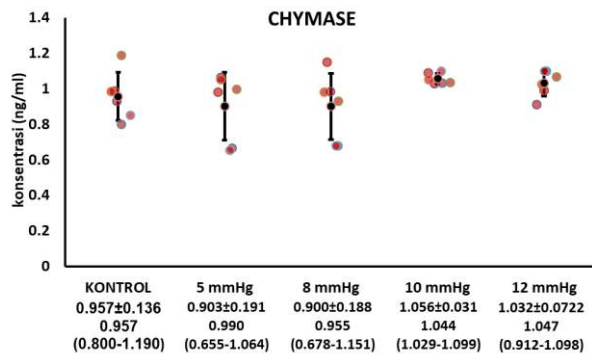
menyebabkan jumlah degranulasi sel mast masih tetap tinggi selama non-self masih belum tereliminasi sempurna.

6.4.3b Profil kadar *histamine*, *tryptase* dan *chymase* cairan peritoneal

Mendukung dan memperluas penelitian sebelumnya (Pados *et al*, 2012., Panula *et al*, 2015) terbukti terjadi peningkatan kadar *histamine* cairan peritoneal pasca laparoskopi pada tekanan 10 dan 12 mmHg. Sesuai dengan terjadinya degranulasi sel mast pada tekanan 10 dan 12 mmHg. *Histamine* merupakan mediator utama pada sel mast (Grafik 6.4A).

Mendukung dan memperluas penelitian sebelumnya (Berdun *et al.*, 2015), pada penelitian ini terbukti peningkatan *tryptase* cairan peritoneal. *Tryptase* jaringan ikat merupakan *serine protease* yang banyak dihasilkan pada sel mast jaringan ikat. Peningkatan *tryptase* sesuai dengan peningkatan degranulasi sel mast jaringan ikat pada omentum, mesenterium dan peritoneum yang mengandung sel mast jaringan ikat (Grafik 6.4B).





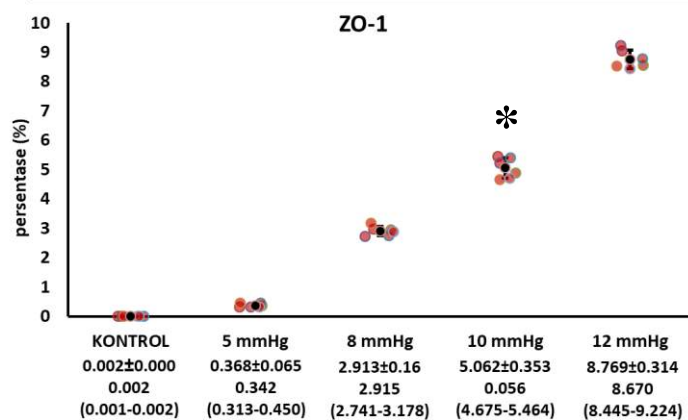
C

Grafik 6.4 Profil kadar *histamine* N=6, dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD, * p<0.05 vs kontrol (A), *tryptase* N=6, dengan uji Welch Robust Tests of Equality of Means dan Post Hoc Games-Howell, * p<0.05 vs kontrol (B) dan *chymase* N=6, dengan uji Kruskal Wallis dan Uji post Hoc Mann Whitney, p>0.05 vs kontrol (C) cairan peritoneal kelompok Kontrol, tekanan 5 mmHg, tekanan 8mHg, tekanan 10 mmHg, dan tekanan 12 mmHg.

Berbeda pada penelitian sebelumnya yang dijumpai peningkatan kadar *chymase* pasca laparoscopi (Berdun *et al*, 2015). Pada penelitian ini tidak didapatkan peningkatan bermakna kadar *chymase*. Diduga populasi sel mast *chymase* tidak sebanyak sel mast *tryptase*. Perbedaan populasi sel mast *chymase* dan *tryptase* diduga berhubungan dengan trauma yang dihasilkan pada operasi (Grafik 6.4C).

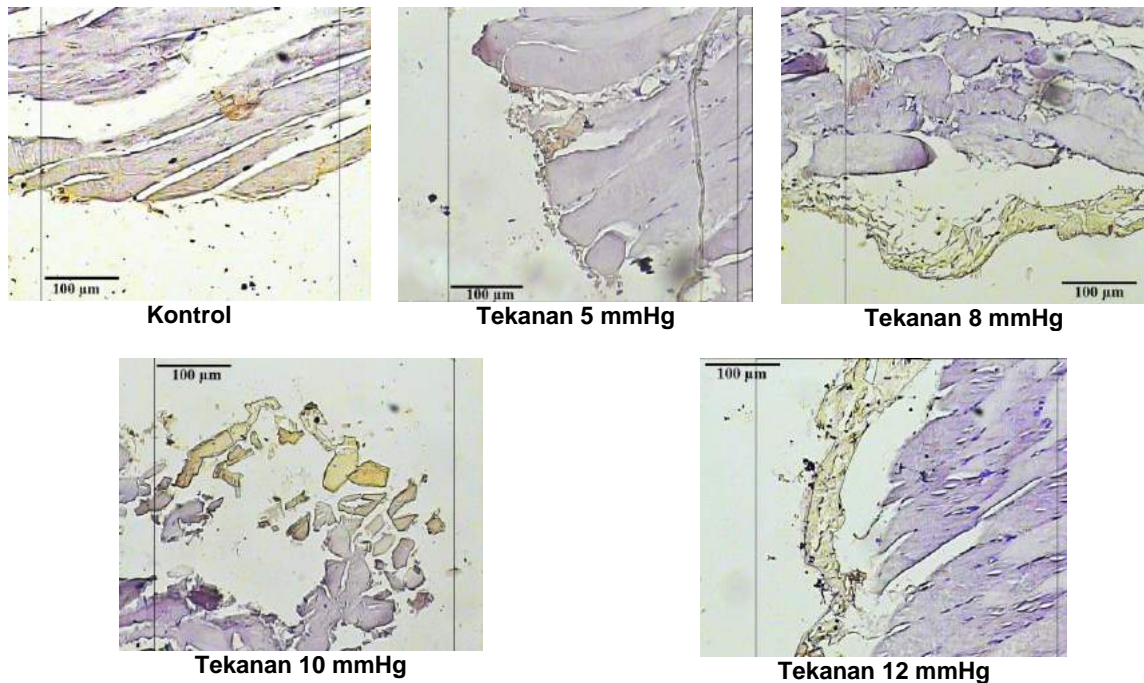
6.6.4 Profil ekspresi ZO-1 pasca pemberian tekanan

*



Grafik 6.5 Profil ekspresi ZO-1 jaringan peritoneal kelompok Kontrol, tekanan 5 mmHg, tekanan 8mmHg, tekanan 10 mmHg dan tekanan 12 mmHg. N=6, dengan uji Kruskal Wallis dan post Hoc Mann Whitney, * $p < 0.05$ vs kontrol

Mesotelial merupakan kesatuan sel mesotel terikat pada membrana-basalis. Sisi apex bebas, sisi lateral membentuk ikatan sel dan bagian basal terikat pada membrana basalis. Protein *Zone-Occludin-1* (ZO-1) menyusun di ketiga *tight junction*, *desmosome*, *gap junction* dan *adherent junction*. Perubahan struktur ZO-1 akan mengakibatkan lepasnya ikatan antar sel (Giepmans, 2004). Cedera reperfusi dan oksidan yang dihasilkan akan merubah susunan *cell junction* sehingga terjadi lepasnya ikatan antar sel. Stres oksidatif menyebabkan kerusakan sel, sehingga ZO-1 terekspresi ekstra seluler. Semakin banyak sel yang rusak, ekspresi ZO-1 ekstra sel akan meningkat. Terjadi peningkatan ekspresi ZO-1 pada tekanan 10 mmHg secara bermakna (Grafik 6.5 dan Gambar 6.10).

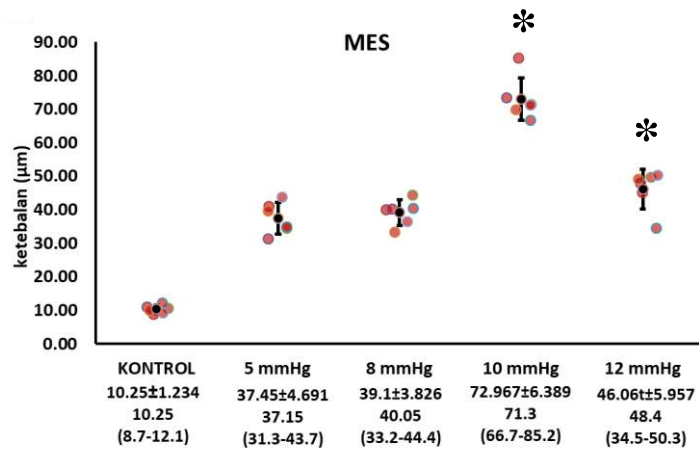


Gambar 6.10 Ekspresi ZO-1 pada pemberian tekanan. Semakin tinggi tekanan insuflasi menyebabkan peningkatan ekspresi ZO-1. Terjadi peningkatan lepasnya ikatan antar sel mesotel

Pada penelitian ini terbukti terjadi peningkatan ekspresi ZO-1 sesuai dengan tekanan dan semakin tinggi tekanan pneumoperitoneumnya semakin luas juga persentase area yang terwarnai ZO-1 sebanding dengan peningkatan mediator inflamasi yaitu: TGF- β , *histamine*, *tryptase*, *chymase*, dan penanda stres oksidatif.

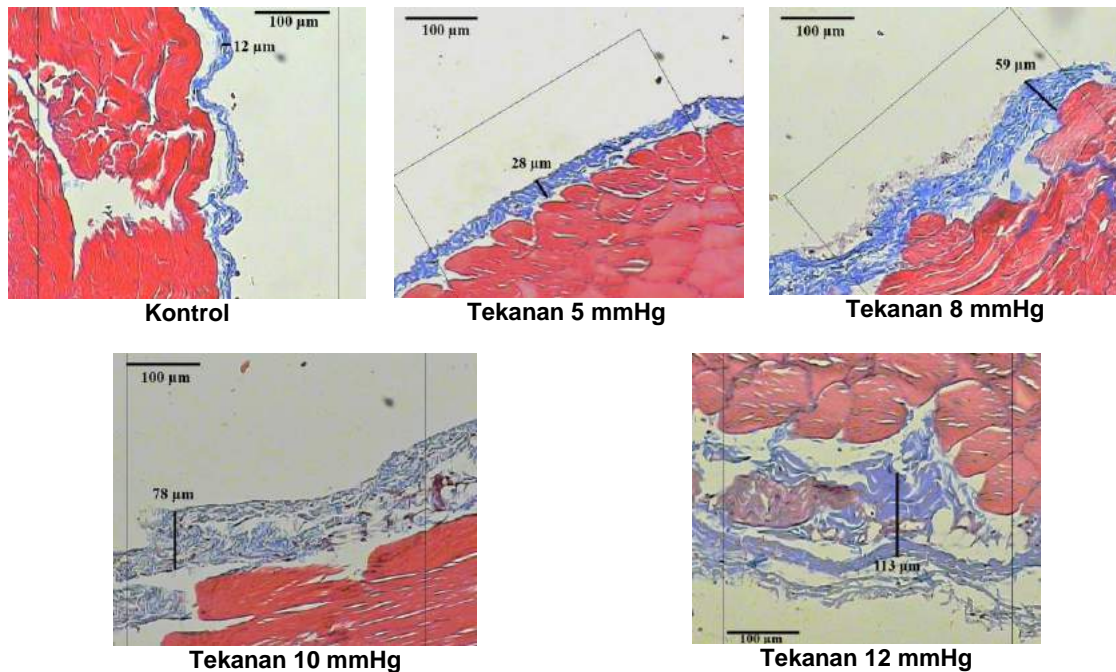
6.6.5 Profil ketebalan MES pasca pemberian tekanan

Peritoneum visceral terdiri dari satu lapis mesotelium dan terdapat jaringan ikat longgar yang terdiri dari fibroblas, serat kolagen, leukosit, mikrovaskular dan limfatik (Di Paolo, 1990., Krediet, 2004). Permukaan peritoneum meminimalisasi gesekan pada permukaan organ (Fortin *et al.*, 2014).



Grafik 6.6 Profil ketebalan MES jaringan peritoneal N=6, dengan uji Kruskal Wallis dan post Hoc Mann Whitney, * $p < 0.05$ vs kontrol, kelompok Kontrol, tekanan 5 mmHg, tekanan 8mmHg, tekanan 10 mmHg dan tekanan 12 mmHg.

Mendukung dan memperluas peneliti sebelumnya (Molinas *et al.*, 2010, Wilson, 2018) bahwa laparoscopi menyebabkan perubahan pada MES. Penelitian ini membuktikan pada tekanan 10 dan 12 mmHg telah terjadi penebalan MES secara bermakna (Grafik 6.6). Stres oksidatif yang terjadi pada laparoscopi menyebabkan kerusakan jaringan mesotelial, sehingga terpapar membrana basalis yang memicu perubahan MES. Gas CO₂ yang kering dan dingin menyebabkan penguapan MES dan diduga menyebabkan perubahan gen yang memicu penebalan MES. Kerusakan jaringan mesotelial memicu respon inflamasi dengan terjadi peningkatan kadar TGF- β . Peningkatan kadar TGF- β mempunyai peranan pada pembentukan dan ketebalan MES. TGF- β menghambat enzim fibrinolitik yang menyebabkan penebalan MES. Stres oksidatif dan TGF- β memicu peningkatan fibroblas sehingga terjadi penebalan MES (Gambar 6.11 dan Grafik 6.6)



Gambar 6.11 Pengaruh pemberian tekanan pada ketebalan MES. Peningkatan tekanan insuflasi menyebabkan peningkatan ketebalan MES

Berbeda dengan penelitian sebelumnya (Saed *and* Diamond, 2009., Arung *et al.*, 2011), pada penelitian ini tidak dijumpai peningkatan secara bermakna jumlah fibroblast, walaupun didapatkan penongkatan TGF- β dan penebalan MES. Peningkatan fibroblas ditentukan oleh *growth factor* dan gen. TGF- β memicu terjadinya fibrosis melalui jalur pensinyalan SMAD sehingga terbentuk gen target yang memicu transformasi fibroblas dan menyebabkan penebalan MES. SOR berperan pada gangguan gen jalur pensinyalan ini. TGF- β juga mengaktifkan transkripsi NRF2 sebagai efek proteksi bila proses transformasi berlebihan. Pembentukan MES ditentukan banyak faktor dan merupakan struktur yang dinamis. Struktur MES Bersifat spesifik sesuai dengan organnya. MES merupakan struktur 3 dimensi terdiri dari kolagen, enzim, glikoprotein (proteoglikan) dan vesikel ekstraseluler (DNA, RNA dan *Matrix-bound nanovesicles/MBVs*). Fibroblas

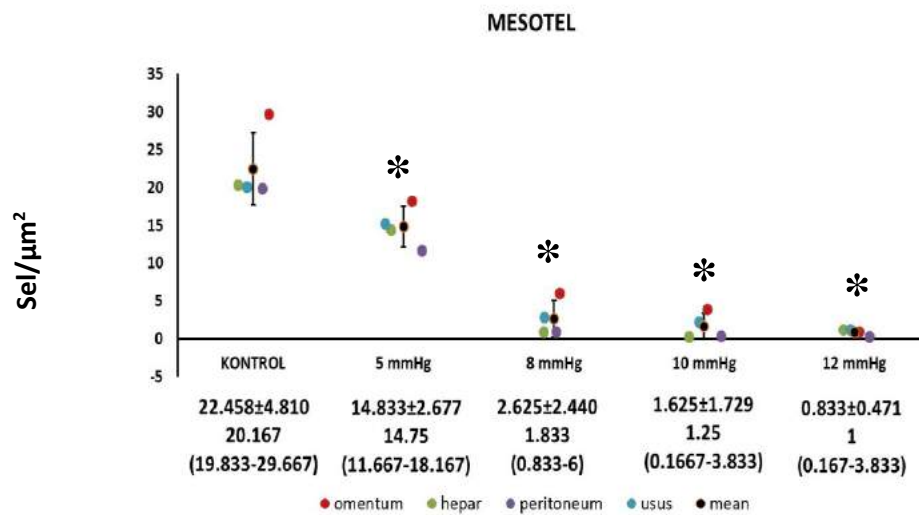
merupakan sel pada MES yang memproduksi kolagen (Cole *et al.*, 2018). Trauma laparoskopi mengakibatkan resultan efek terjadi peningkatan kerusakan mesotel dan penebalan MES, tetapi tidak menyebabkan peningkatan fibroblas.

Struktur jaringan peritoneum disusun oleh satu lapis sel mesotelial yang melekat pada membrana basalis. Struktur pendukung dibawahnya terdiri dari MES, jaringan ikat, fibroblas, pembuluh darah dan limfatik. Pada permukaan terdapat struktur lubrikan untuk melindungi dari gesekan antar organ. Jaringan mesotelial bertanggung jawab pada proses homeostasis dengan mensekresi sitokin modulator inflamasi, kemokin, *growth factor* dan pembentukan MES. Proses penyembuhan ditentukan oleh keseimbangan proses koagulasi dan fibrinolisis. Laparoskopi menyebabkan lepasnya sel mesotel dari membrana basalis dan memicu gangguan proses fibrinolisis. Area denudasi mengakibatkan sekresi tPA dan uPA menurun sehingga peran PAI lebih dominan. Gangguan sekresi PA menyebabkan pembentukan fibrin secara berlebihan. Lepasnya mesotel memicu respon inflamasi sehingga sekresi *growth factor*, *adhesion molecule*, sitokin dan TGF- β lebih tinggi. Dengan meningkatnya respon inflamasi akan memicu pembentukan MES. TGF- β memicu proliferasi, diferensiasi, migrasi dan pembentukan MES kearah fibrosis (Mutsear *et al.*, 2004). Dapat disimpulkan peningkatan TGF- β penelitian ini lebih dominan pada gangguan proses fibrinolisis dibanding transformasi mesotel menjadi fibroblas. Peran kerusakan mesotel lebih dominan dibanding peran fibroblas pada pembentukan MES pada proses penyembuhan cedera rongga abdomen (Yung *and* Chang, 2011, Mutsear *et al.*, 2015).

Jaringan mesotelial mempunyai peranan penting pada eksistensi peritoneum. Jaringan mesotelial memproduksi *growth factor*, sitokin, protease, dan matrik protein untuk mempertahankan fungsinya. Agar regenerasi berjalan dengan baik, jaringan mesotelial mempertahankan keseimbangan proses koagulasi dan fibrinolysis agar tidak terjadi fibrosis. Jaringan mesotelial memproduksi Plasminogen Activator (PA) agar mekanisme proses fibronolisis berjalan dengan baik. Laparoskopi menyebabkan lepasnya sel mesotel dari membrana basalis, sehingga proses fibrinolisis akan terganggu. Hal ini akan memicu penebalan MES dan mengarah pada fibrosis (Yung and Chang, 2012).

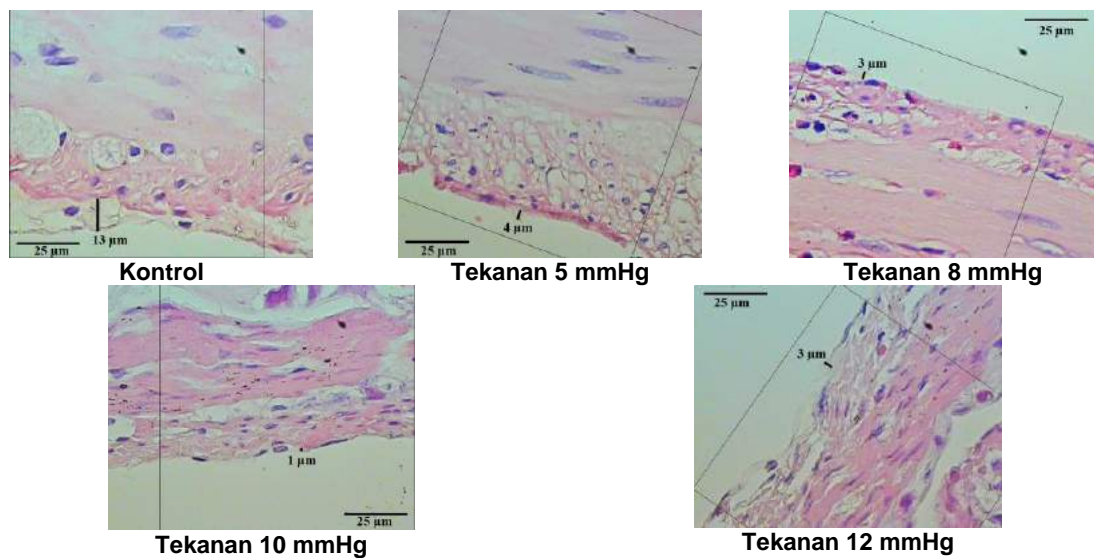
6.6.6 Perbedaan Mikroskopis kelompok Kontrol, Laparoskopi dengan tekanan 5 mmHg, tekanan 8 mmHg, tekanan 10 mmHg dan tekanan 12 mmHg.

Mendukung penelitian sebelumnya, laparoskopi menyebabkan lepasnya sel mesotel dari membrana basalis (Peng *et al.*, 2009). Tekanan insuflasi menyebabkan cedera reperfusi dan stres oksidatif. Keadaan ini memicu lepasnya sel mesotel dari membrana basalis dan kerusakan sel mesotel. Pada penelitian ini terbukti secara bermakna terjadi penurunan jumlah mesotel yang intak pada membrana basalis.



Grafik 6.7 Profil sel mesotel $N=6$, dengan uji Kruskal Wallis dan post Hoc Mann Whitney, * $p < 0.05$ vs kontrol, kelompok Kontrol, tekanan 5 mmHg, tekanan 8 mmHg, tekanan 10 mmHg dan tekanan 12 mmHg.

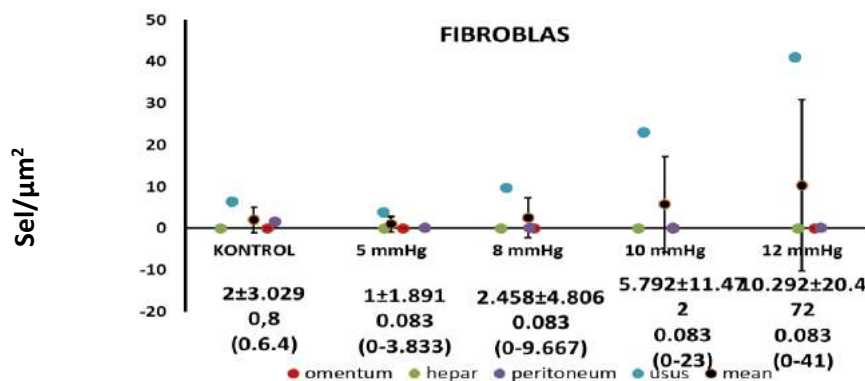
Evaluasi pada peritoneum parietal dan visceral dijumpai penurunan jumlah mesotel yang intact secara bermakna pada omentum, hepar, peritoneum dan usus. Dampak cedera akibat tekanan pada jaringan mesotelial, meluas hingga seluruh rongga abdomen.



Gambar 6.12 Perubahan mikroskopis Usus setelah pemberian tekanan. Terjadi peningkatan fibroblas, PMN, vaskuler dan penurunan mesotel dan ketebalan glikokalik pasca pemberian tekanan.

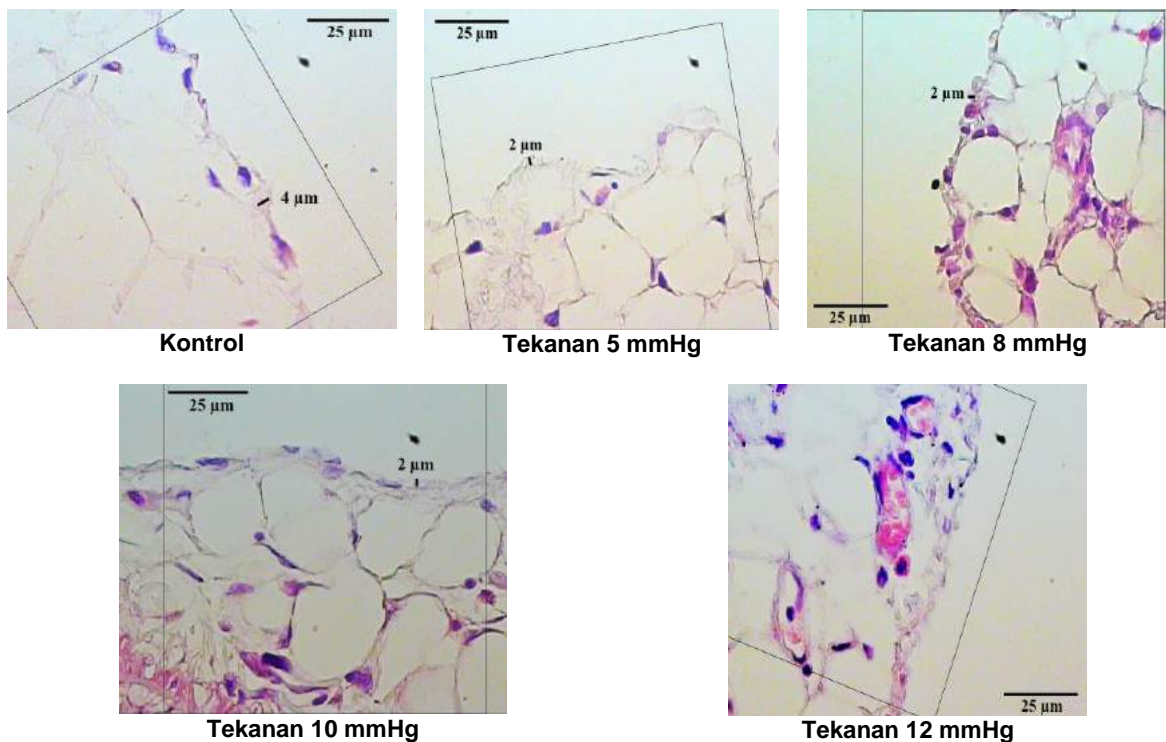
Berbeda dengan penelitian sebelumnya (Saed *and* Diamond, 2009., Arung *et al.*, 2011), pada penelitian ini tidak dijumpai peningkatan secara bermakna jumlah fibroblas. Peningkatan fibroblas ditentukan oleh *growth factor* dan gen. Walaupun pada penelitian ini didapatkan peningkatan TGF- β dan penebalan MES secara bermakna tetapi tidak didapatkan peningkatan sel fibroblas. Diduga stress oksidatif menyebabkan gangguan pada gen pemicu fibroblas.

Kerusakan sel pasca laparotomi diindikasikan melalui mekanisme langsung dan tidak langsung. Secara langsung stres mekanis menyebabkan gangguan bioenergi mitokondria dan calcium homeostasis yang memicu apoptosis atau nekrosis sel. Secara tidak langsung akibat pembentukan SOR yang berlebihan. SOR memicu kerusakan sel dan terjadi kerusakan DNA sehingga terjadi pelepasan gen nekrosis atau apoptosis, kerusakan membran sel melalui peroksidase lipid dan kerusakan protein melalui *protein carbonylation* (Sack *et al.*, 2017, Singh *et al.*, 2019). Kerusakan sel mesotel dibuktikan dengan menurunnya jumlah sel mesotel yang intak pada membrana basalis. Luruhnya sel mesotel menyebabkan terpaparnya membrana basalis dan memicu respon inflamasi pada proses penyembuhan.



Grafik 6.8 Profil sel fibroblas, N=6, dengan uji Kruskal Wallis dan post Hoc Mann Whitney, $p > 0.05$ vs kontrol, kelompok Kontrol, tekanan 5 mmHg, tekanan 8mmHg, tekanan 10 mmHg dan tekanan 12 mmHg.

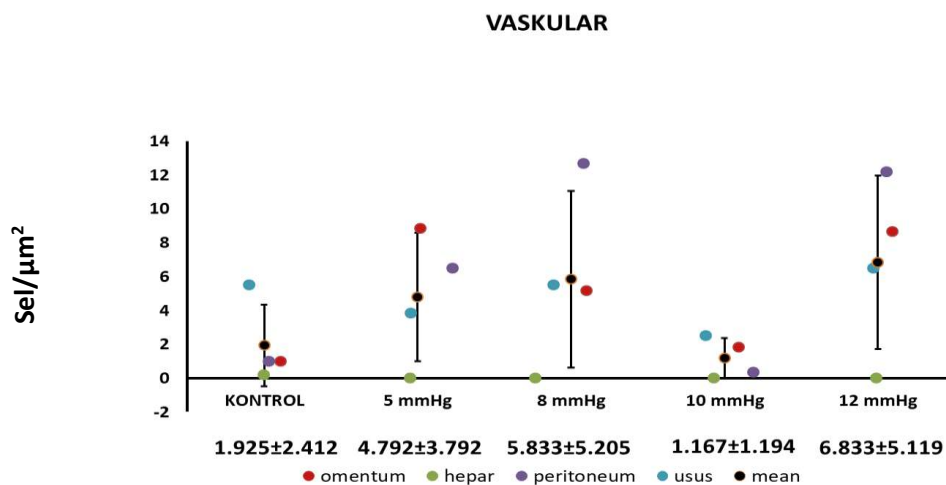
Pada penelitian ini didapatkan peningkatan jumlah fibroblas lebih tinggi pada usus. Penemuan ini diduga berhubungan dengan perbedaan kecepatan pertumbuhan mesotel tiap organ pasca trauma. Kecepatan pembentukan mesotel di usus paling lambat (Rafferty, 1973). Pembentukan fibroblas merupakan mekanisme homeostasis peritoneum. Fibroblas berasal dari transformasi jaringan mesotel dan makrofage, dan fibroblas akan bertransformasi kembali menjadi mesotel (Liu *et al.*, 2015, Lua *and* Asahina, 2016). Diduga transformasi fibroblas ke mesotel pada usus terjadi paling lambat diantara ke 4 jaringan.



Gambar 6.13 Perubahan mikroskopis Omentum setelah pemberian tekanan. Terjadi penurunan mesotel omentum, peningkatan PMN dan vaskuler pasca pemberian tekanan.

Tekanan 5-8 mmHg pada tikus menyebabkan perubahan fisiologis yang setara pada tekanan 10-15 mmHg pada manusia (Avital *et al.*, 2006). Intra Abdominal

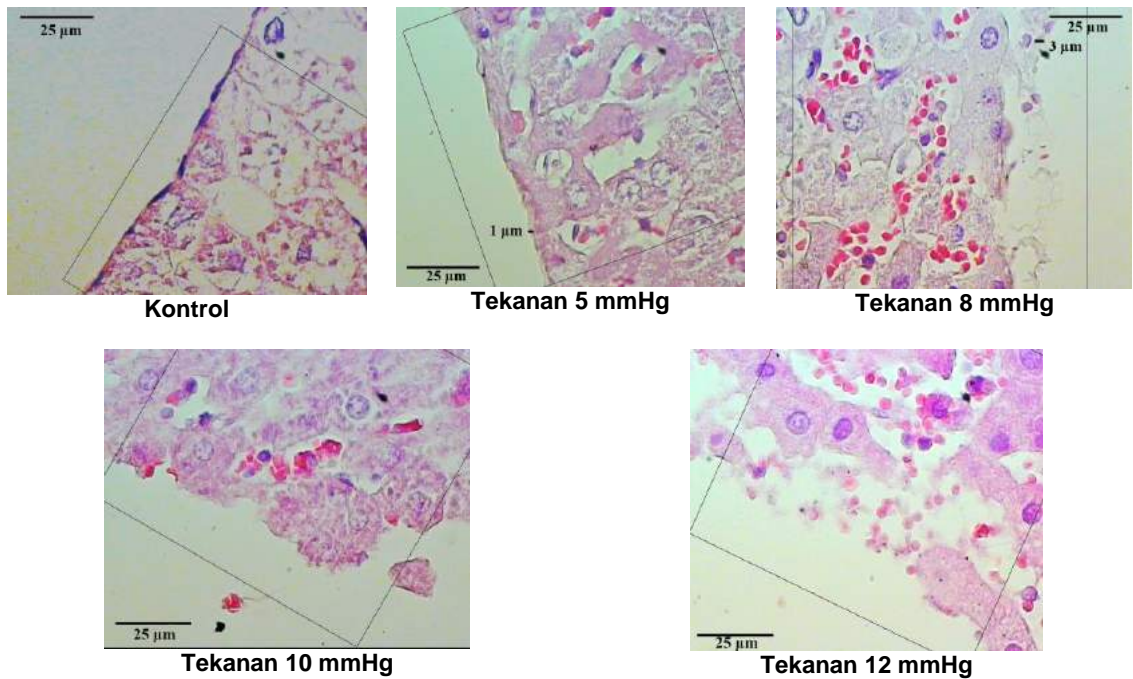
Hypertensi (IAH) pada manusia bila tekanan >12 mmHg. *Abdominal Compartment Syndrome (ACS)* bila tekanan >20 mmHg berpotensi kegagalan/disfungsi organ (Shah *et al.*, 2010, Tharayil *et al.*, 2017) atau perubahan mikroskopis (Kirkpatrick *et al.*, 2017, Lima *et al.*, 2017). Penurunan sirkulasi akibat insuflasi disebabkan peningkatan retensi vaskuler (keseimbangan Hagen-Poiseuille) dan mencetuskan sekresi *catekolamin*. Hal ini menyebabkan vasokonstriksi vaskular (Sodha *et al.*, 2015). Insuflasi berkepanjangan menyebabkan vasodilatasi akibat efek hiperkarbia (Neuhaus *et al.*, 2001, Sodha *et al.*, 2015).



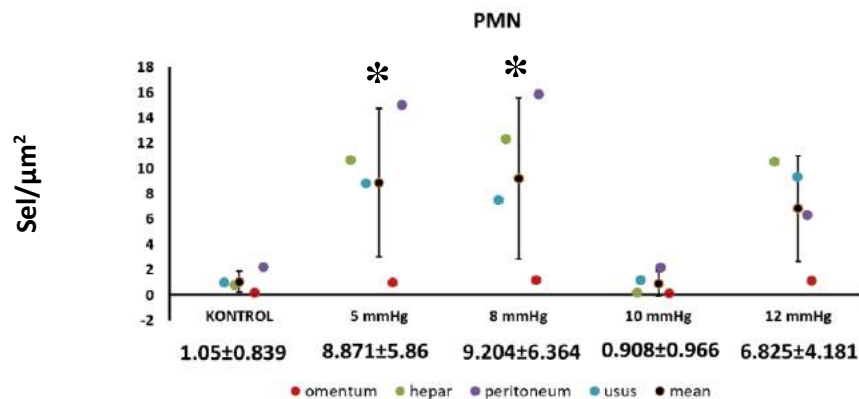
Grafik 6.9 Profil vascular, N=6, dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD, $p>0.05$ vs kontrol, kelompok Kontrol, tekanan 5 mmHg, tekanan 8mmHg, tekanan 10 mmHg dan tekanan 12 mmHg.

Pada penelitian ini tidak didapatkan perbedaan bermakna jumlah vaskuler pasca laparoscopi. Terjadi peningkatan jumlah vaskuler pada tekanan 5, 8 dan 12 mmHg. Terjadi penurunan jumlah vaskuler pada tekanan 10 mmHg. Pada tekanan 10 mmHg atau lebih menyebabkan vasokonstriksi pembuluh darah, diduga efek *catekolamine* lebih dominan dari efek *histamine*. Vasodilatasi vaskuler pada tekanan 12 mmHg diduga disebabkan efek histamine dan hypercarbia berkepanjangan akibat

paparan CO₂ lebih dominan dari efek *katekolamine*, sehingga terjadi vasodilatasi kembali pada tekanan 12 mmHg.

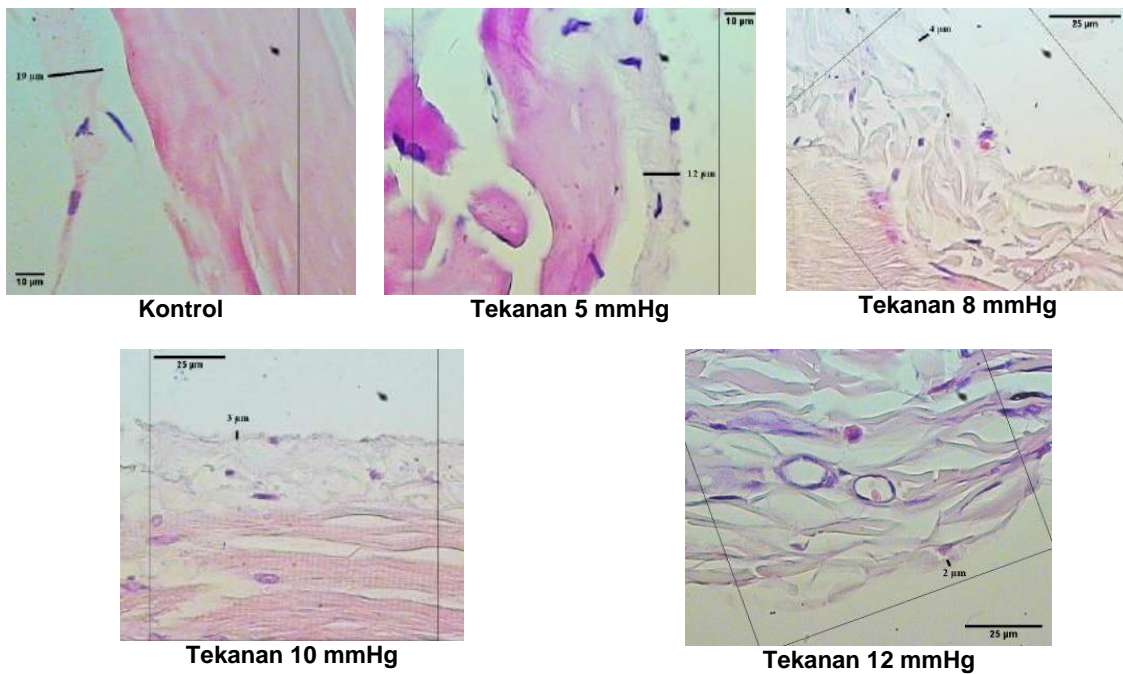


Gambar 6.14 Perubahan mikroskopis Hepar setelah pemberian tekanan. Terjadi penurunan mesotel dan ketebalan glikokalik, peningkatan PMN dan vaskuler pasca pemberian tekanan



Grafik 6.10 Profil sel PMN, N=6, dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD, * p<0.05 vs kontrol. kelompok Kontrol, tekanan 5 mmHg, tekanan 8mHg, tekanan 10 mmHg dan tekanan 12 mmHg.

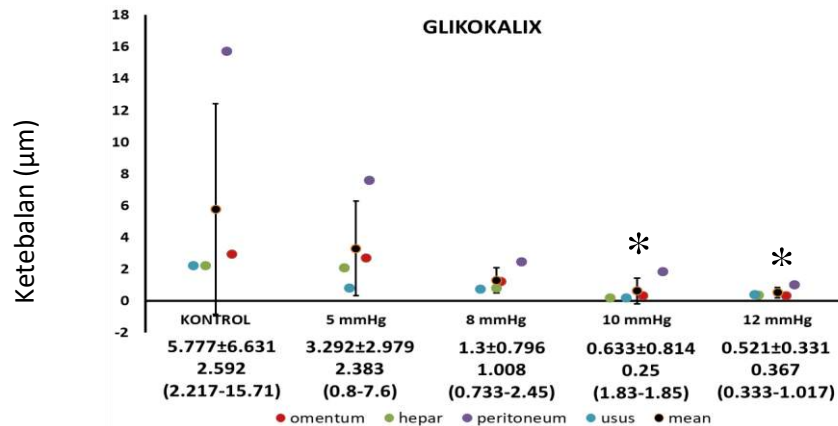
Didapatkan temuan peningkatan jumlah PMN secara bermakna pada tekanan 5 dan 8 mmHg, menunjukkan bahwa tekanan 5 mmHg sudah menyebabkan kerusakan sel mesotel yang memicu respon inflamasi. Respon inflamasi ditandai dengan peningkatan jumlah PMN pada intra vaskuler. Penurunan jumlah PMN disebabkan terjadinya vasokonstriksi pada tekanan 10 mmHg, sehingga jumlah PMN menurun mengikuti vaskuler.



Gambar 6.15 Perubahan mikroskopis Peritoneum setelah pemberian tekanan. Terjadi penurunan mesotel dan penebalan glikoklaik, peningkatan vaskuler, fibroblas dan PMN pasca pemberian tekanan.

Glikokalik merupakan lapisan di atas permukaan mesotel, merupakan pelindung dan melindungi gesekan antar organ dalam rongga intra abdominal. Glikokalik dihasilkan oleh sel mesotel. Pada penelitian ini didapat penurunan ketebalan glikokalik pada tekanan 10 dan 12 mmHg. Stres oksidatif akibat tekanan

memicu kerusakan sel mesotel, menyebabkan penurunan ketebalan glikokalik secara signifikan.



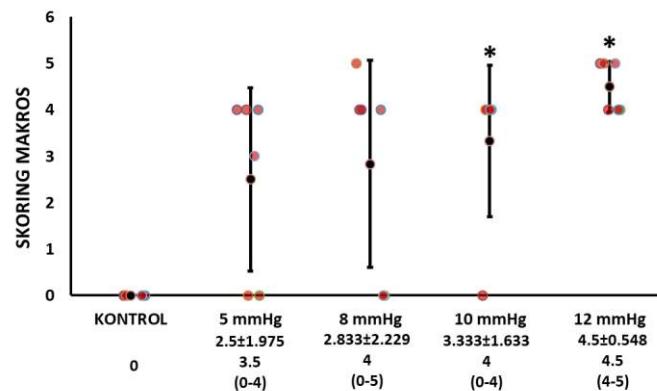
Garfik 6.11 Profil ketebalan Glikokalik, N=6, dengan uji Kruskal Wallis dan post Hoc Mann Whitney, * $p < 0.05$ vs kontrol, kelompok Kontrol, tekanan 5 mmHg, tekanan 8 mmHg, tekanan 10 mmHg dan tekanan 12 mmHg.

6.6.7 Profil skoring adesi makroskopis pasca pemberian tekanan.

Mendukung dan memperdalam penelitian sebelumnya laparoskopi menyebabkan adesi intra-abdominal (Molinas *et al.*, 2000). Penelitian ini terbukti terdapat perbedaan bermakna pada tekanan 10 mmHg (Grafik 6.12).

Iskemia, trauma termal akibat penggunaan gas CO₂ (dingin dan kelembaban rendah) dan trauma mekanik (tekanan insuflasi) memicu kerusakan sel mesotel dan residen sel termasuk sel mast (Yilmaz *et al.*, 2005). Kerusakan mesotel memicu respon inflamasi dan mengakibatkan perubahan struktur MES yang memicu fibrosis. Perubahan struktur MES juga memicu respon inflamasi, sehingga terjadi vasodilatasi vaskuler dan meningkatkan molekul adesi. TGF- β meningkatkan aktivitas PAI dan menurunkan aktivitas tPA dan uPA menyebabkan gangguan proses fibrinolisis (Molinas and Koninckx, 2000). Peningkatan skoring adesi intra abdominal terjadi

pada tekanan 10 mmHg membuktikan bahwa penyebab adesi intra abdominal pasca laparoskopi merupakan resultan multi-faktor. Tekanan 10 mmHg merupakan tekanan yang menyebabkan cedera reperfusi dan terjadi stres oksidatif. Kerusakan jaringan mesotelial akibat stres oksidatif memicu respon inflamasi dan degranulasi sel mast. Mediator inflamasi yang dikeluarkan oleh sel mast, khususnya *histamine* dan *tryptase*, memicu terjadinya adesi intra abdominal. Kerusakan jaringan mesotelial dibuktikan dengan meningkatnya sel mesotel yang lepas dari membrana basalis dan ekspresi ZO-1. Peningkatan TGF- β pada laparoskopi menyebabkan penebalan MES yang menyebabkan adesi.

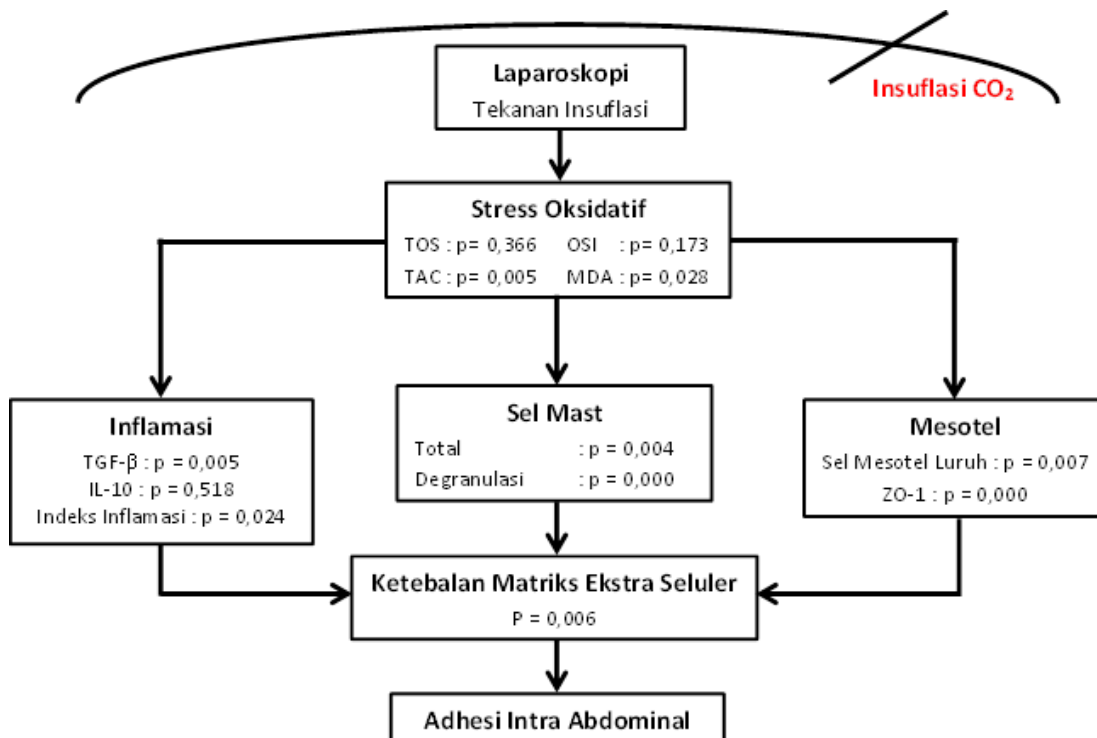


Grafik 6.12 Profil Skoring makrokopis adesi intra abdominal kelompok Kontrol, tekanan 5 mmHg, tekanan 8mmHg, tekanan 10 mmHg dan tekanan 12 mmHg. N=6, dengan uji Kruskal Wallis dan post Hoc Mann Whitney, * p<0.05 vs kontrol

Pengaruh tekanan gas CO₂ pada 10 mmHg berpotensi menyebabkan iskemia rongga, cedera reperfusi, stres osidatif, inflamasi dan degranulasi sel mast. Faktor tersebut merupakan patomekanisme terjadinya adesi pasca laparoskopi (Molinas and Koninckx, 2000., Arung et al., 2011., Coccolini et al., 2013).

ANALISIS REGRESI LINIER BIVARIAT

Untuk menilai pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat, dilakukan uji regresi linier bivariat menggunakan nilai signifikansi $p < 0,05$. Variabel bebas adalah stres oksidatif (TOS, TAC, OSI dan MDA), inflamasi (TGF- β , IL-10 dan indeks inflamasi), sel mast (total sel mast dan degranulasi sel mast), mesotel (sel mesotel luruh, ZO-1) dan ketebalan matriks ekstra seluler terhadap variabel terikat adhesi intra abdominal.



Berdasarkan hasil analisis menunjukkan, nilai total sel mast ($p=0,004$), degranulasi sel mast ($p=0,000$), sel mesotel luruh ($p=0,007$), ZO-1 ($p=0,000$), ketebalan matriks ekstraseluler ($p=0,006$), TGF- β ($0,005$), indeks inflamasi ($p=0,024$), TAC ($p=0,005$), MDA ($p=0,028$) memiliki pengaruh terhadap adhesi intra abdomen.

Sedangkan nilai IL-10 ($p=0,518$), TOS ($p=0,366$) dan OSI ($p=0,173$) tidak memiliki pengaruh terhadap adhesi intra abdomen. Disimpulkan bahwa sel mast, mesotel dan ketebalan matriks ekstra seluler memiliki pengaruh paling besar terhadap adhesi intra abdominal.

PENELITIAN TAHAP 3

7.1 Pendahuluan

Laparoskopi menggantikan laparotomi karena memiliki banyak keuntungan (Cekik *et al.*, 2014). Insuflasi CO₂ pada tekanan tertentu menyebabkan cedera reperfusi dan mencetuskan stres oksidatif (Baysal *et al.*, 2009). Insuflasi menyebabkan lepasnya sel mesotel dan terpaparnya membrana basalis sehingga mencetuskan respon inflamasi (Davey *et al.*, 2013).

Sel mast merupakan residen sel rongga abdomen (Sammour *et al.*, 2010) dengan sifat khususnya diduga mempunyai peranan penting pada mekanisme adesi (de Souza Junior *et al.*, 2015). Cedera reperfusi dan stres oksidatif menyebabkan degranulasi sel mast dan diduga memicu adesi intra-abdominal.

Ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak (*Eleutherine americana* L. Merr) terbukti mempunyai kemampuan modulator stres oksidatif (Pratiwi and Isnindar, 2013., Kuntorini, 2014) dan modulator inflamasi yang poten (Han *et al.*, 2008, Song *et al.*, 2009).

Berdasarkan penelitian sebelumnya menarik untuk dilakukan penelitian potensi bawang Dayak menurunkan skoring adesi intra abdominal melalui modulasi stres oksidatif, modulasi inflamasi dan mencegah peningkatan jumlah dan degranulasi sel mast.

7.2 Perumusan masalah penelitian tahap 3

7.2.1 Masalah Penelitian Tahap 3

Apakah terdapat perbedaan derajat adesi intra abdominal kelompok kontrol (dilakukan laparoskopi dengan tekanan insuflasi 10 mmHg) dan kelompok perlakuan yang dilakukan laparoskopi dengan tekanan insuflasi pada 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, pemberian ekstrak bulbus (umbi) bawang dayak dengan dosis 30 mg/kgBB, 60 mg/kgBB dan 90 mg/kgBB.

7.2.1 Sub Masalah Penelitian tahap 3

1. Apakah terdapat perbedaan kadar TGF β , IL-10 dan rasio TGF- β /IL-10 cairan pertoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dilakukan laparoskopi dengan tekanan insuflasi pada 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, pemberian ekstrak bulbus (umbi) bawang dayak dengan dosis 30 mg/kgBB, 60 mg/kgBB dan 90 mg/kgBB?
2. Apakah terdapat perbedaan kadar Hidrogen peroksida/ *Total Oxidant Status* (TOS), *Total Antioxidant Capacity* (TAC), Oksidatif Stres Indeks (OSI) cairan peritoneal dan kadar MDA jaringan peritoneum pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dilakukan laparoskopi dengan tekanan insuflasi pada 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, pemberian ekstrak bulbus (umbi) bawang dayak dengan dosis 30 mg/kgBB, 60 mg/kgBB dan 90 mg/kgBB?

3. Apakah terdapat perbedaan jumlah sel mast dan persentase degranulasi sel mast, kadar *histamine*, *tryptase* dan *chymase* cairan peritoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dilakukan laparoscopi dengan tekanan insuflasi pada 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, pemberian ekstrak bulbus (umbi) bawang dayak dengan dosis 30 mg/kgBB, 60 mg/kgBB dan 90 mg/kgBB?
4. Apakah terdapat perbedaan ekspresi *zone occludin 1* (ZO-1) jaringan peritoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dilakukan laparoscopi dengan tekanan insuflasi pada 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, pemberian ekstrak bulbus (umbi) bawang dayak dengan dosis 30 mg/kgBB, 60 mg/kgBB dan 90 mg/kgBB?
5. Apakah terdapat perbedaan ketebalan matrik ekstra seluler (MES) pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dilakukan laparoscopi dengan tekanan insuflasi pada 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, pemberian ekstrak bulbus (umbi) bawang dayak dengan dosis 30 mg/kgBB, 60 mg/kgBB dan 90 mg/kgBB?
6. Apakah terdapat perbedaan skoring adesi intra-abdominal dan perubahan mikroskopis kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dilakukan laparoscopi dengan tekanan insuflasi pada 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, pemberian ekstrak bulbus (umbi)

bawang dayak dengan dosis 30 mg/kgBB, 60 mg/kgBB dan 90 mg/kgBB?

7.3 Tujuan Penelitian tahap 3

73.1 Tujuan Umum Penelitian tahap 3

Secara umum penelitian tahap bertujuan memperoleh bukti:

Apakah terdapat perbedaan derajat adesi intra abdominal kelompok kontrol (dilakukan laparoskopi dengan tekanan insuflasi 10 mmHg) dan kelompok perlakuan yang dilakukan laparoskopi dengan tekanan insuflasi pada 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, pemberian ekstrak bulbus (umbi) bawang dayak dengan dosis 30 mg/kgBB, 60 mg/kgBB dan 90 mg/kgBB?

7.3.1 Tujuan Khusus Penelitian tahap 3

1. Memperoleh bukti ada perbedaan kadar TGF β , IL-10 dan rasio TGF- β /IL-10 cairan peritoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dilakukan laparoskopi dengan tekanan insuflasi pada 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, pemberian ekstrak bulbus (umbi) bawang dayak dengan dosis 30 mg/kgBB, 60 mg/kgBB dan 90 mg/kgBB
2. Memperoleh bukti ada perbedaan kadar *Total Oxidant Status* (TOS), *Total Antioxidant Capacity* (TAC), Oksidatif Stres Index (OSI) cairan peritoneal dan kadar MDA jaringan peritoneum pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dilakukan laparoskopi dengan tekanan insuflasi pada 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal,

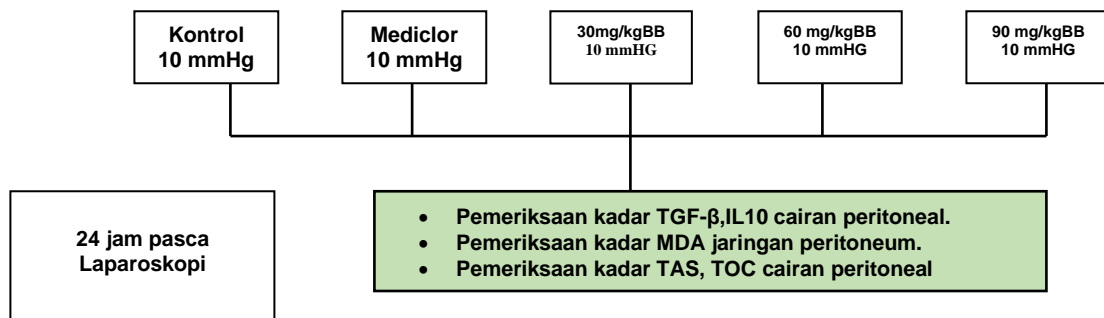
pemberian ekstrak bulbus (umbi) bawang dayak dengan dosis 30 mg/kgBB, 60 mg/kgBB dan 90 mg/kgBB

3. Memperoleh bukti ada perbedaan jumlah sel mast dan persentase degranulasi sel mast, kadar *histamine*, *tryptase* dan *chymase* cairan peritoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dilakukan laparoskopi dengan tekanan insuflasi pada 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, pemberian ekstrak bulbus (umbi) bawang dayak dengan dosis 30 mg/kgBB, 60 mg/kgBB dan 90 mg/kgBB.
4. Memperoleh bukti ada perbedaan ekspresi *zone occludin 1* (ZO-1) jaringan peritoneal pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dilakukan laparoskopi dengan tekanan insuflasi pada 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, pemberian ekstrak bulbus (umbi) bawang dayak dengan dosis 30 mg/kgBB, 60 mg/kgBB dan 90 mg/kgBB
5. Memperoleh bukti ada perbedaan ketebalan matrik ekstra seluler (MES) pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dilakukan laparoskopi dengan tekanan insuflasi pada 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, pemberian ekstrak bulbus (umbi) bawang dayak dengan dosis 30 mg/kgBB, 60 mg/kgBB dan 90 mg/kgBB.
6. Memperoleh bukti ada perbedaan skoring adesi intra-abdominal dan perubahan mikroskopis kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dilakukan laparoskopi dengan tekanan insuflasi pada 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, pemberian ekstrak bulbus (umbi) bawang dayak dengan dosis 30 mg/kgBB, 60 mg/kgBB dan 90 mg/kgBB.

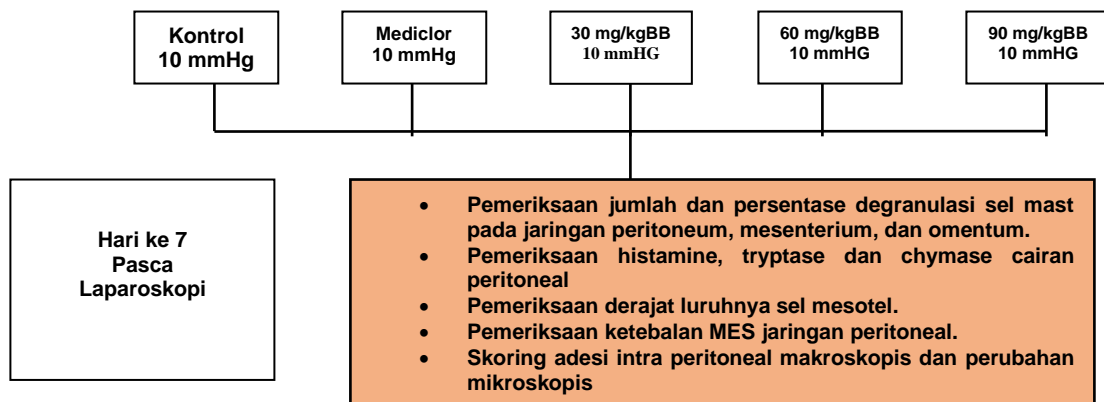
7.4 Manfaat Penelitian dan Alur penelitian tahap 3

Memperoleh bukti dosis ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak yang efektif untuk mencegah adesi intra-abdominal pasca laparoskopi

Berdasarkan perhitungan jumlah sampel, maka jumlah sampel tiap kelompok adalah 6



Keterangan : Kelompok control: kelompok laparoskopi dengan tekanan 10 mmHg, **Mediclor** : kelompok laparoskopi dengan tekanan 10 mmHg+pemberian Mediclor intra peritoneal, Kelompok laparoskopi dengan tekanan 10 mmHg + ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak 30 mg/kgBB, Kelompok laparoskopi dengan tekanan 10 mmHg + ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak 60 mg/kgBB, Kelompok laparoskopi dengan tekanan 10 mmHg + ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak 90 mg/kgBB



Keterangan : Kelompok control: kelompok laparoskopi dengan tekanan 10 mmHg, **Mediclor** : kelompok laparoskopi dengan tekanan 10 mmHg+pemberian Mediclor intra peritoneal, Kelompok laparoskopi dengan tekanan 10 mmHg + ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak 30 mg/kgBB, Kelompok laparoskopi dengan tekanan 10mmHg + ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak 60 mg/kgBB, Kelompok laparoskopi dengan tekanan 10 mmHg + ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak 90 mg/kgBB

7.5 Hipotesis penelitian

Berdasarkan latar belakang, rumusan masalah, kerangka teori dan kerangka penelitian diajukan hipotesis penelitian sebagai berikut:

Ada penurunan jumlah dan degranulasi sel mast, serta skoring adesi intra abdominal kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi dibanding kelompok kontrol.

7.5.1 Sub-hipotesis penelitian

1. Ada penurunan kadar TGF- β , IL-10 dan rasio TGF- β / IL-10 cairan peritoneal pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi dibanding kelompok kontrol.
2. Ada penurunan kadar *Total Oxidant Status* (TOS), *Total Antioxidant Capacity* (TAC) cairan peritoneal, Oksidatif Stres Indek (OSI) dan kadar MDA jaringan peritoneum pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi dibanding kelompok kontrol.
3. Ada penurunan jumlah sel mast dan persentase degranulasi sel mast, kadar *histamine*, *tryptase* dan *chymase* cairan peritoneal pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi dibanding kelompok kontrol.
4. Ada penurunan ekspresi *zone-occludin 1* (ZO-1) jaringan peritoneal pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi dibanding kelompok kontrol.

5. Ada penurunan ketebalan matrik ekstra seluler (MES) jaringan peritoneal pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi dibanding kelompok kontrol.
6. Ada penurunan skoring adesi intra-abdominal dan perubahan mikrokopis pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak bulbus (umbi) bawang Dayak pasca laparoskopi dibanding kelompok kontrol.

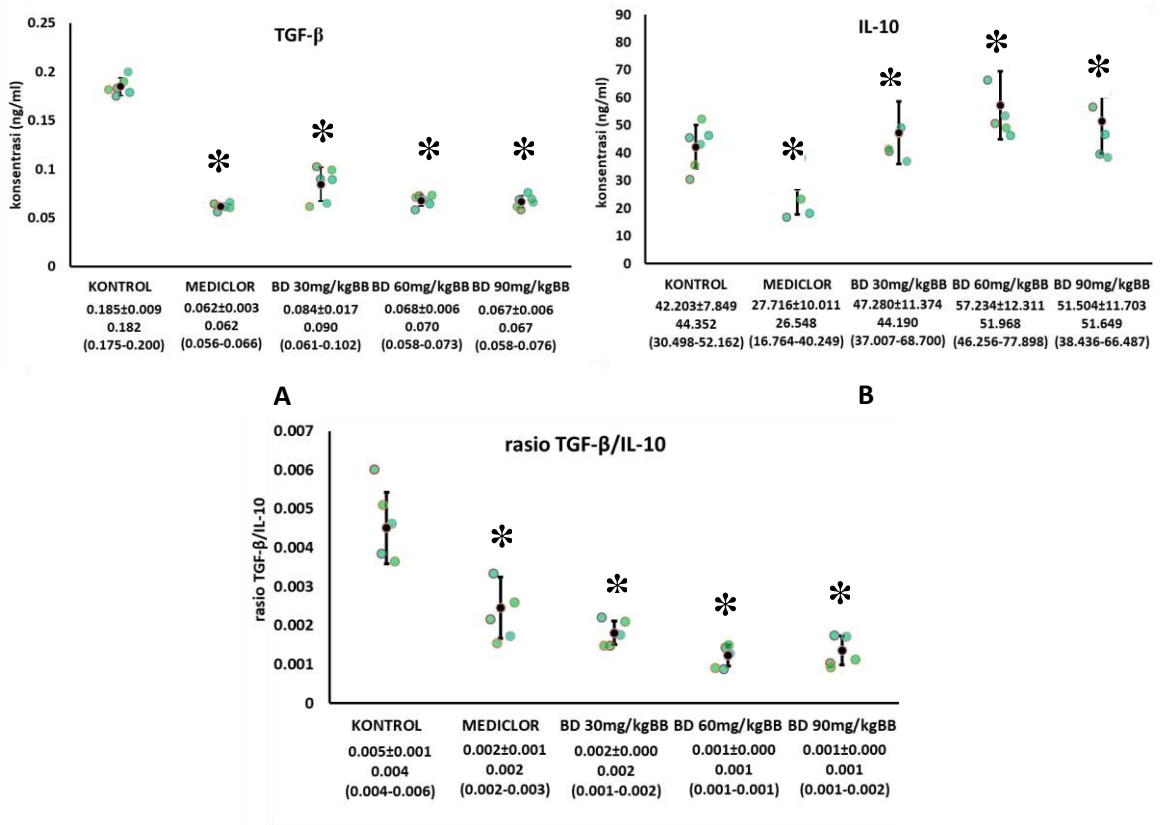
7.6 Hasil, Analisis dan Pembahasan penelitian tahap 3

7.6.1 Profil inflamasi pasca pemberian bawang Dayak.

Penelitian sebelumnya membuktikan senyawa *Anthraquinones* mampu menghambat sekresi TGF- β 1 (Locatelli, 2011), naphthoquinones dan naphthalene mampu menurunkan fibrosis (Napsiah *et al.*, 2014., Chen *et al.*, 2019). Pada penelitian ini bawang Dayak yang digunakan mengandung komposisi tinggi isoeleutherol, eleutherol dan eleutherine. Pada analisis insiliko, secara komputasi senyawa anthraquinone dan elecanacine berpotensi sebagai menghambat protein target TGF- β , tetapi kedua senyawa tersebut tidak mampu berikatan dengan TGF- β . Sebagai kesatuan ekstrak bawang Dayak mampu menurunkan kadar TGF- β cairan peritoneal. Diduga, terdapat protein perantara dalam ekstrak bawang Dayak yang menguatkan ikatan isoeleutherol, eleutherol, eleutherine, anthraquinone dan elecanacine dengan TGF- β . Penurunan TGF- β diprediksi melalui hambatan pada jalur NF κ B oleh eleutherol dan iso-eleutherine. Penurunan kadar TGF- β pasca pemberian bawang Dayak merupakan modulasi respon inflamasi pada reaksi fosforilasi sisi aktif I κ B jalur NF κ B (Morgan *and* Liu, 2011). Penurunan stres oksidatif pasca pemberian bawang Dayak mampu menurunkan aktivasi I κ B jalur NF κ B

(Gambhir *et al*, 2015) sehingga respon inflamasi menurun pasca pemberian bawang

Dayak



Grafik 7.1

Kadar TGF- β , N=6, dengan uji Welch Robust Tests of Equality of Means dan Post Hoc Games-Howell, * $p < 0.05$ vs kontrol (A); IL-10 Kadar IL-10 cairan peritoneal N=6, dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD, * $p < 0.05$ vs kontrol (B); cairan peritoneal dan rasio TGF- β /IL-10 N=6. Dengan uji Welch Robust Tests of Equality of Means dan Post Hoc Games-Howell, * $p < 0.05$ vs kontrol (C); kelompok tekanan 10 mmHg/Kontrol; tekanan 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 30 mg/KgBB, Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 60 mg/KgBB dan Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 90 mg/KgBB.

Pada penelitian ini bawang Dayak dan Mediclor mampu menurunkan kadar TGF- β secara bermakna (Grafik 7.1A). Peningkatan TGF- β merupakan respon inflamasi akibat kerusakan mesotel yang dipicu oleh stres oksidatif. Perbedaannya

Mediclor memberikan proteksi lokal pada sel mesotel dan ekstrak bawang Dayak memberikan proteksi melalui jalur sistemik.

Mediclor (Hyaluron) merupakan material yang mampu mempertahankan integritas mesotelial, keseimbangan cairan struktur mesotelial. Sehingga secara tidak langsung mempunyai kemampuan sebagai modulator inflamasi dan scavenging radikal bebas (Yung *and* Chang, 2011).

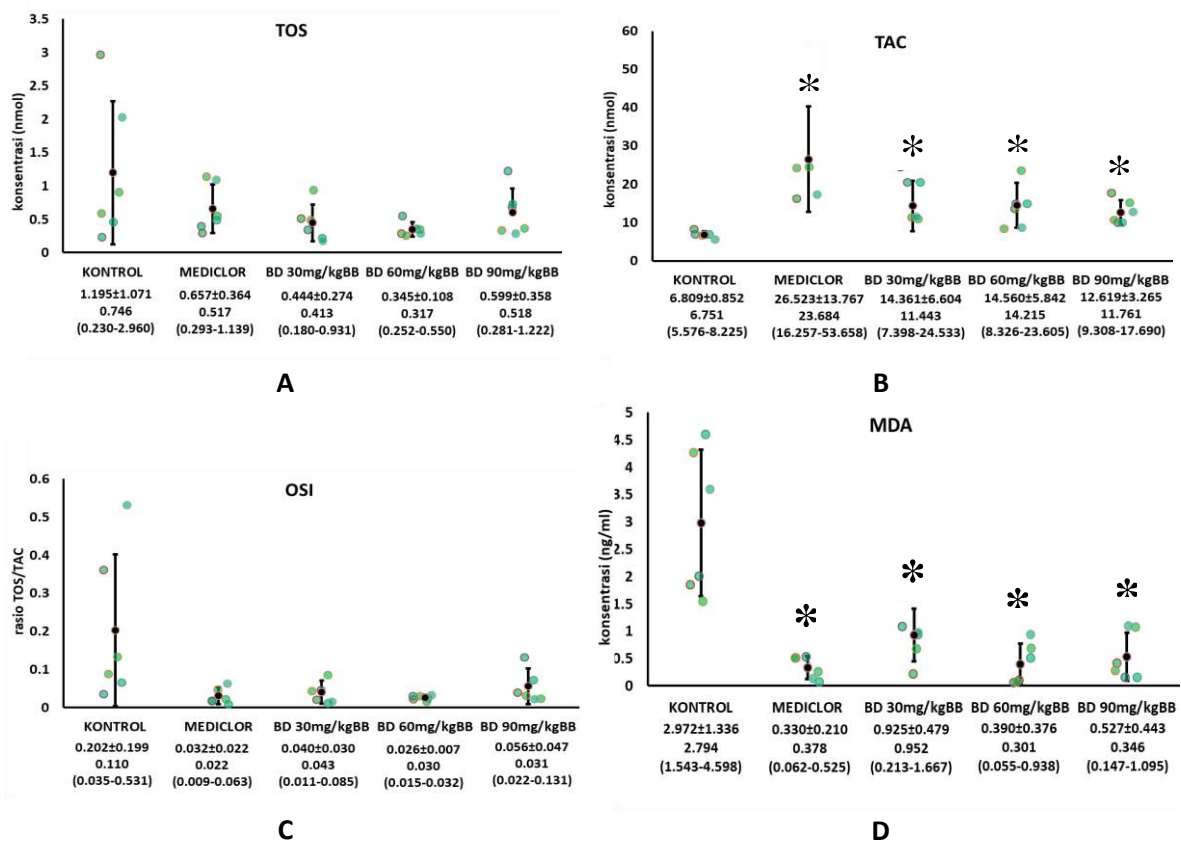
Berbeda dengan penelitian sebelumnya, pemberian bawang Dayak mampu menghambat produksi sitokin IL-10, (Napsiah *et al.*, 2014., Hanh *et al.*,2018). Pada penelitian ini didapatkan peningkatan bermakna IL-10 setelah pemberian ekstrak bawang Dayak (Grafik 7.1B). Ekstrak bawang Dayak mampu menurunkan SOR dan mencegah kerusakan sel mesotel, dan peningkatan kadar IL-10 menunjukkan proses mengarah pada penyembuhan.

Pada penelitian didapatkan rasio TGF- β /IL-10 menurun secara bermakna pada pemberian Mediclor dan ekstrak bawang Dayak dengan dosis 30, 60 dan 90 mg/KgBB. Penurunan rasio disebabkan penurunan kadar TGF- β dan peningkatan kadar IL-10 secara bermakna. Penurunan kadar TGF- β berhubungan penurunan kerusakan sel mesotel.

7.6.2 Profil stres oksidatif pasca pemberian bawang Dayak.

Berbeda dengan penelitian sebelumnya yang membuktikan kemampuan ekstrak bawang Dayak sebagai modulator stres inflamasi (Pratiwi *and* Isnindar, 2013, Martantiningtyas *et al.*, 2015, Shi *et al.*, 2019), walaupun terjadi penurunan rerata, penelitian ini tidak didapatkan perbedaan bermakna kadar TOS pada pemberian Mediclor dan ekstrak bawang Dayak. Ekstrak bawang Dayak mengandung

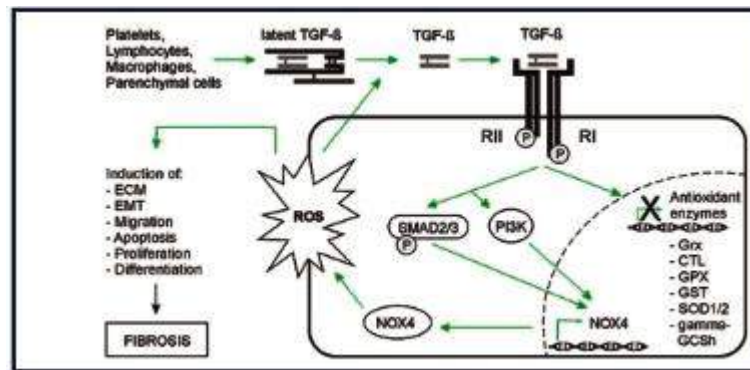
isoeletherol, eletherol dan eletherine dalam kadar tinggi, tetapi tidak mampu berikatan dengan baik dengan protein target *xanthine-oxidase*. Penurunan rerata membuktikan, ekstrak bawang Dayak mempunyai aktifitas modulator stres inflamasi walaupun tidak kuat pasca laparotomi. Diduga bahan aktif bawang Dayak tidak bekerja melalui enzim *xanthine-oxidase* sebagai jalur stres oksidatif dan melalui jalur lain.



Grafik 7.2

Profil kadar peroksida Total Oksidan Status (TOS) N=6, dengan uji Welch Robust Tests of Equality of Means dan Post Hoc Games-Howell, $p > 0.05$ vs kontrol (A), Total Modulator stres oksidatif Capacity (TAC) N=6, dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD, * $p < 0.05$ vs kontrol (B), Oksidatif Stress Index (OSI) N=6, dengan uji Welch Robust Tests of Equality of Means dan Post Hoc Games-Howell, $p > 0.05$ vs kontrol (C), kadar MDA jaringan peritoneal N=6, dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD, * $p < 0.05$ vs kontrol (D), kelompok tekanan 10 mmHg/Kontrol; tekanan 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 30 mg/KgBB, Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 60 mg/KgBB dan Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 90 mg/KgBB.

Modulasi stres oksidatif terjadi akibat aktivasi jalur Keap1/Nrf2. Diduga bahan aktif bawang Dayak memudahkan degradasi Keap1-Nrf2 kompleks, sehingga terjadi migrasi Nrf2 ke dalam nukleus dan terjadi pembentukan gen enzim detoksifikasi oksidan dan modulator stres oksidatif (Babu *et al.*, 2017, Sznarkowska *et al.*, 2017). Pada umumnya bahan alam mengaktifkan jalur Keap1/Nrf2.



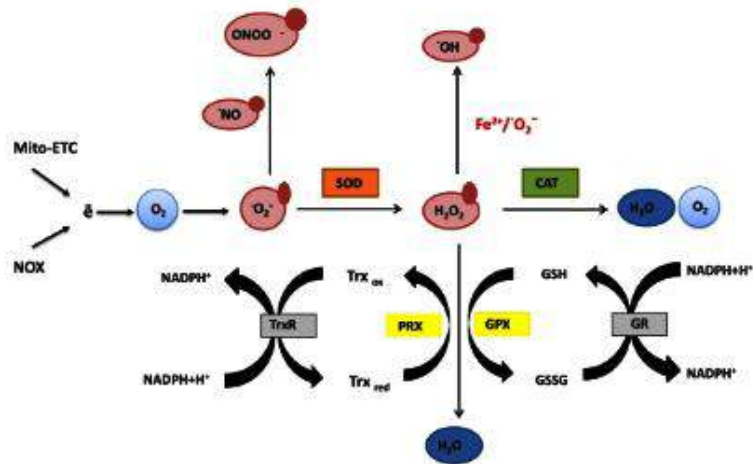
Gambar 7.1 Peranan TGF-β pada pembentukan SOR. TGF-β dan SOR saling menguatkan pada pembentukan modulator stres oksidatif (dikutip dari Richter *et al.*, 2015)

TGF-β berperan pada pembentukan SOR. Setelah TGF-β terikat pada reseptornya, maka akan memicu beberapa gen yang berperan pada pembentukan SOR, MES, transformasi mesotel menjadi fibroblas. Proses ini juga menyebabkan penurunan gen yang memicu produksi modulator stres oksidatif. SOR juga memicu aktivasi TGF-β laten menjadi TGF-β aktif, sehingga SOR dan TGF-β menyebabkan stres oksidatif semakin berat. Dapat disimpulkan TGF-β berperan pada terjadinya stres oksidatif. Dengan peran bawang Dayak sebagai modulator inflamasi dan modulator stres oksidatif, maka menurunkan hambatan pada pembentukan gen modulator stres oksidatif dan pembentukan modulator stres oksidatif meningkat.

Terbukti pemberian bawang Dayak mampu meningkatkan kadar TAC (gambar 7.2B). Pemberian ekstrak bawang Dayak mempunyai kemampuan

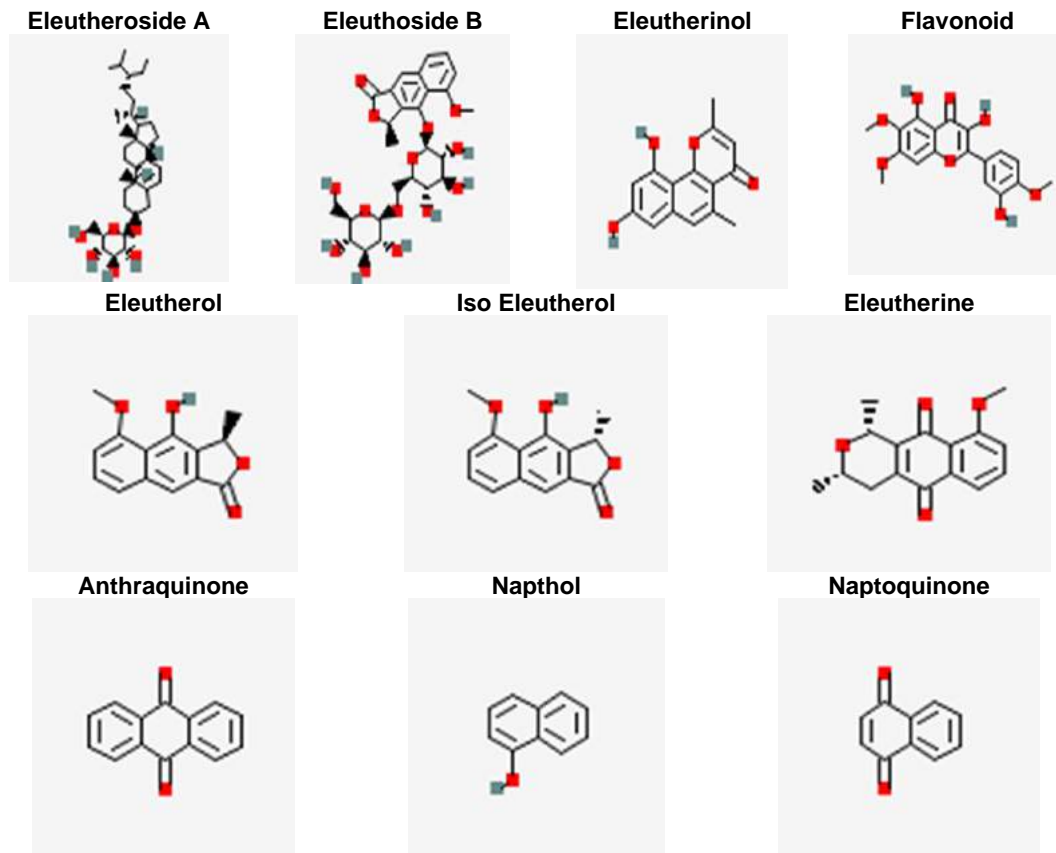
modulator stres oksidatif sehingga mencegah kerusakan sel dalam rongga peritoneal. Meningkatnya jumlah sel mesotel yang intak pada membrana basalis, terbukti terjadi penurunan stres oksidatif setelah pemberian bawang Dayak. Pemberian bawang Dayak mampu mengatasi stres sehingga pemakai kadar modulator stres inflamasi endogen menjadi rendah, dan kadarnya tetap tinggi. Pembentukan oksidan pasca laparoskopi akan direspon senyawa modulator stres oksidatif endogen (SOD, CAT, GPX). Pemberian bawang Dayak dan Mediolor mampu menurunkan stres oksidatif, sehingga kadar modulator stres oksidatif endogen meningkat. Peningkatan kadar TAC disebabkan penurunan kadar TGF- β dan memicu jalur pembentukan modulator stres oksidatif.

Berbeda dengan penelitian sebelumnya (Han *et al.*, 2008, Yoshida *et al.*, 2014, Han *et al.*, 2019), pada penelitian ini ekstrak bawang Dayak yang diberikan tidak menurunkan OSI secara bermakna walaupun didapatkan penurunan rerata. Ekstrak bawang Dayak mengandung naphthoquinone dan anthraquinone yang mempunyai kemampuan modulator stres oksidatif tetapi kadarnya rendah. Juga mengandung isoeleutherol, eleutherol dan eleutherine dalam kadar tinggi, tetapi tidak mampu berikatan dengan protein target *xanthine oxidase*.



Gambar 7.2 Mekanisme pembentukan oksidan dan scavenging SOR modulator stres oksidatif endogen. (Sznarkowska *et al.*, 2017)

Kemampuan ekstrak bawang Dayak sebagai modulator stres oksidatif bekerja melalui mekanisme akseptor elektron (Kuntorini, 2013) dan donor Hidrogen pada gugus hidroksil (OH) (Sandhar *et al.*, 2011). Bahan aktif eleutheroside A (0,907), eleuthoside B (0,748) dan eleutherinol (0,603) mempunyai aktivitas scavenging oxidant yang baik, tetapi kadar dalam ekstrak tidak tinggi. Isoeleutherol, eleutherol dan eleutherin tidak mempunyai gugus hidroksil sehingga tidak mempunyai kemampuan donor hidrogen (*scavenging* SOR) tetapi mempunyai kemampuan akseptor elektron karena mempunyai gugus oksigen



Gambar 7.1 Kemampuan *scavenging oxidant* oleh karena posisi dan gugus hidroksil. Kemampuan modulator stres oksidatif karena kemampuan donor hydrogen gugus hidroksil. Kemampuan akseptor elektron karena gugus oksigen. (Sumber PUBCHEM)

Berdasarkan skema diatas dapat disimpulkan ekstrak bawang Dayak mempunyai kemampuan modulasi stres oksidatif tetapi tidak terlalu kuat.

Mendukung dan memperluas penelitian sebelumnya, pemberian ekstrak bawang Dayak menurunkan kadar MDA sebagai produk akhir peroksidasi lipid (Windari, 2017, Sugiharto, 2018). Kemampuan ekstrak bawang Dayak menurunkan kadar MDA setara pemberian Mediclor. Pembentukan SOR menurun, akibat meningkatnya modulator stres oksidatif eksogen pasca pemberian bawang Dayak.

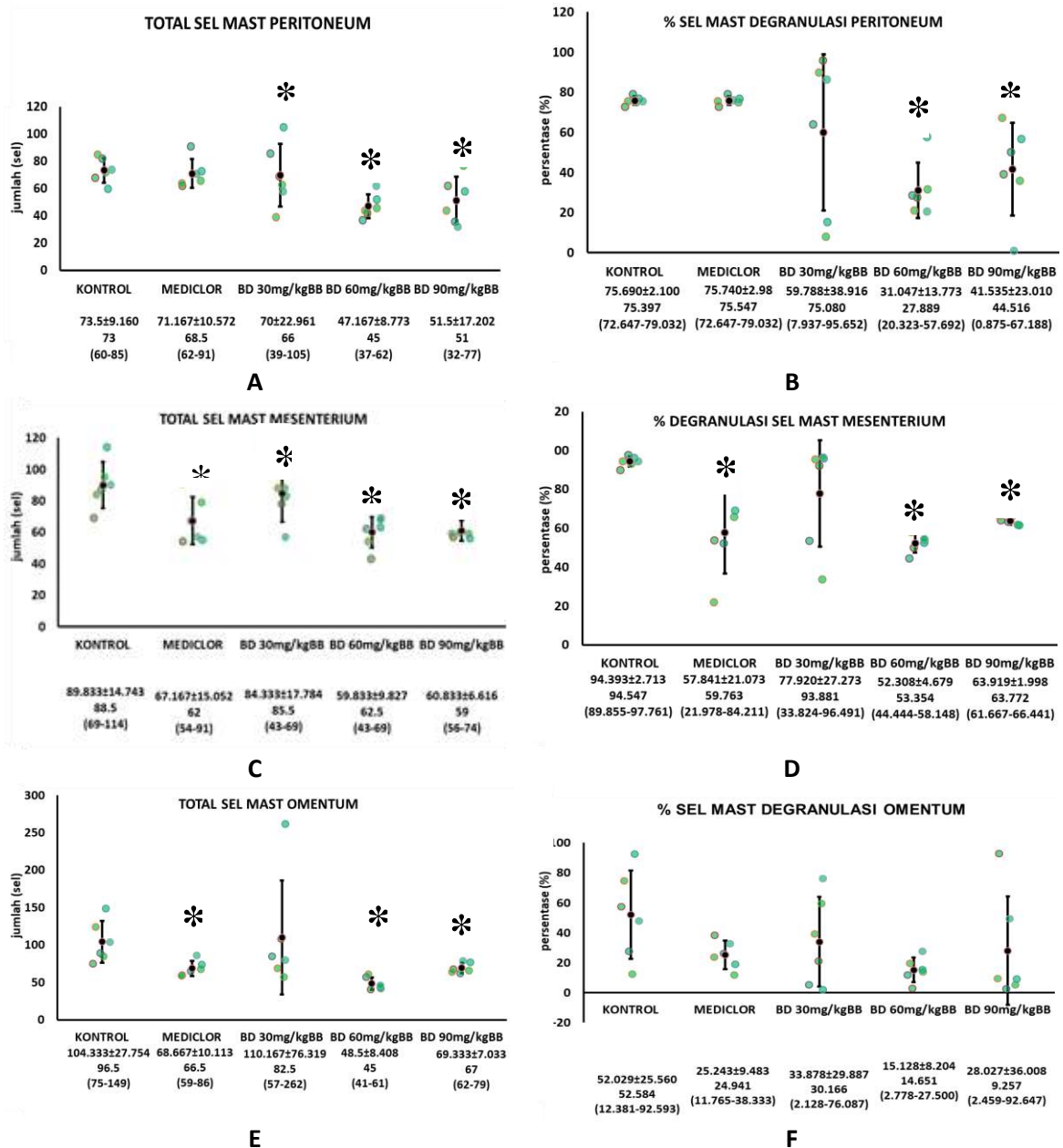
Berkurangnya SOR, menyebabkan penurunan kerusakan sel melalui jalur peroksidasi lipid dan non peroksidasi lipid. Pada penelitian ini terjadi penurunan kadar MDA membuktikan bahwa kerusakan sel juga melalui jalur peroksidasi lipid berkurang pasca pemberian bawang Dayak.

7.6.3a Profil sel mast pasca pemberian bawang Dayak.

Terbukti penurunan jumlah sel mast mesenterium pada pemberian ekstrak bawang Dayak. Kemampuan bawang Dayak meningkatkan kadar modulator stres oksidatif menyebabkan kerusakan sel. Penurunan respon inflamasi mengakibatkan penurunan jumlah sel mast mesenterium. Dosis 30 mg/KgBB sudah menurunkan jumlah sel mast mesenterium, diduga karena mesenterium mempunyai lebih banyak vaskuler. Kemampuan proteksi mediclor menurunkan kerusakan sel mesotel sehingga terjadi penurunan respon inflamasi dan jumlah sel mast.

Didapatkan penurunan degranulasi sel mast mesenterium pada pemberian ekstrak bawang Dayak 60 dan 90 mg/KgBB. Kemampuan ekstrak bawang Dayak meningkatkan kadar modulator stres oksidatif. Menurunkan stres oksidatif menyebabkan penurunan kerusakan/degranulasi sel mast secara bermakna.

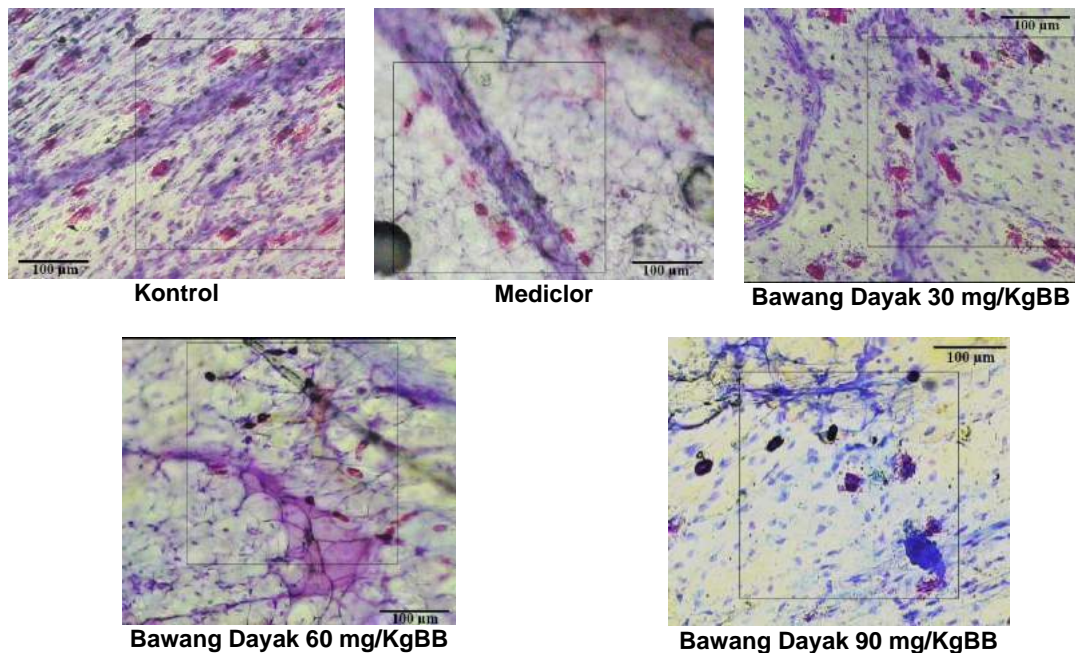
Mediclor mampu menurunkan degranulasi sel mast akibat proteksi lokal pada permukaan sel mast mesenterium dari trauma.



Grafik 7.3

Profil sel mast, Total sel mast jaringan peritoneal N=6, dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD, * p<0.05 vs kontrol (A), Degranulasi sel mast peritoneum N=6, dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD, * p<0.05 vs kontrol (B), Total sel mast mesenterium N=6, dengan uji Kruskal Wallis dan post Hoc Mann Whitney, * p<0.05 vs kontrol (C), Degranulasi sel mast mesenterium N=6, dengan uji Kruskal Wallis dan post Hoc Mann Whitney, * p<0.05 vs kontrol (D), Total sel mast omentum N=6, dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD, * p<0.05 vs kontrol (E), Degranulasi sel mast omentum N=6, dengan uji Welch Robust Tests of Equality of Means dan Post Hoc Games-Howell, p>0.05 vs kontrol (F), kelompok tekanan 10 mmHg/Kontrol; tekanan 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 30 mg/KgBB, Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 60 mg/KgBB dan Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 90 mg/KgBB.

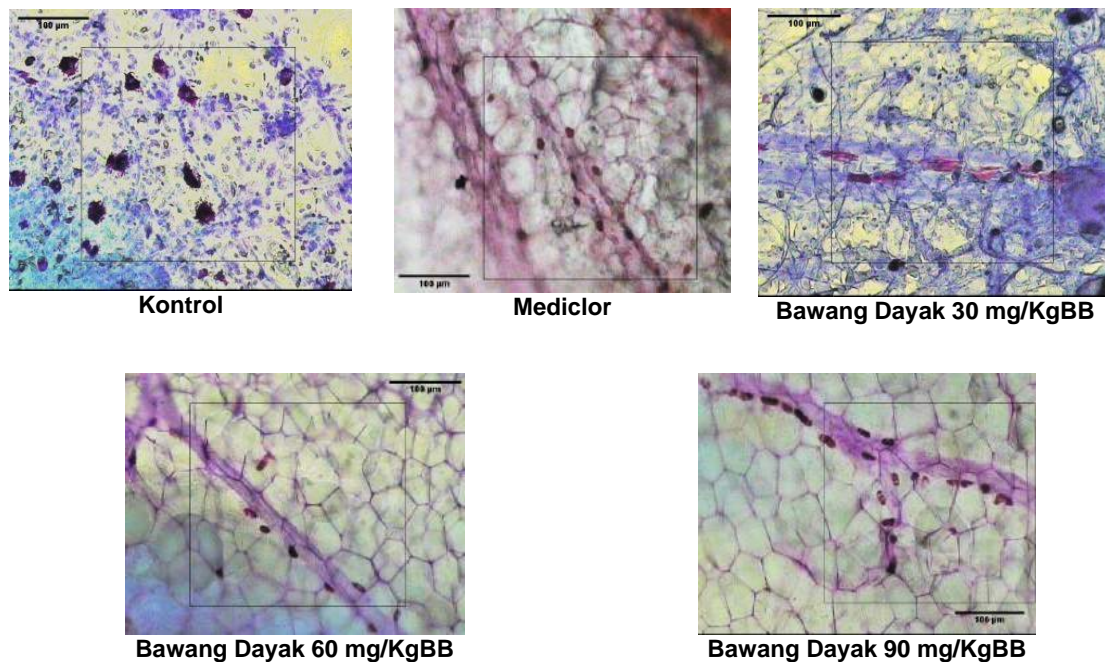
Pada penelitian ini terbukti pemberian ekstrak bawang Dayak 60 dan 90 mg/KgBB menurunkan kadar total sel mast omentum. Kemampuan modulator stres oksidatif bawang Dayak mencegah kerusakan sel mesotel dan residen sel intra-abdominal, menurunkan modulasi inflamasi sehingga jumlah sel mast pada omentum akan meningkat (Grafik 7.3F). Omentum merupakan organ proteksi pada rongga abdomen dan berperan penting pada penyembuhan luka.



Gambar 7.3 Profil sel mast mesenterium setelah pemberian bawang Dayak. Terjadi penurunan jumlah dan degranulasi sel mast pasca pemberian bawang Dayak 60 mg/KgBB

Tidak didapatkan perbedaan bermakna degranulasi sel mast omentum pasca pemberian mediclor dan bawang Dayak. Dan didapatkan perbedaan bermakna pada mesenterium dan peritoneum. Omentum merupakan organ limfoid yang berperan pada mekanisme pertahanan intra-abdominal. Omentum mengandung banyak stem sel limfoid (Michailova and Usunoff., 2004, Liu *et al.*, 2015) dan

merupakan pertahanan mekanik organ intra-abdominal (Sammour *et al.*, 2010). Diduga oleh karena fungsi omentum, maka degranulasi sel tetap tinggi pada omentum. Sebagai organ pertahanan yang mobil, omentum bertanggung jawab pada respon inflamasi.

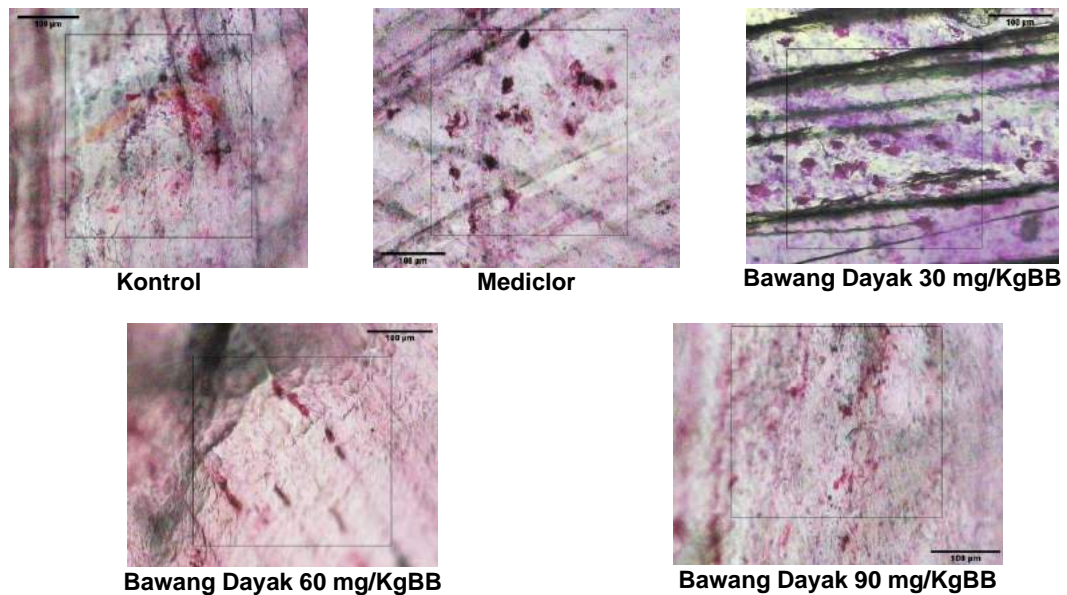


Gambar 7.4 Profil sel mast omentum setelah pemberian bawang Dayak. Terjadi penurunan degranulasi sel mast pasca pemberian bawang Dayak.

Terbukti pemberian ekstrak bawang Dayak 30, 60 dan 90 mg/KgBB menurunkan total sel mast peritoneum. Kemampuan modulator stres inflamasi bawang Dayak menyebabkan kerusakan sel intra-abdominal berkurang, sehingga respon inflamasi dan terjadi penurunan jumlah sel mast pada peritoneum.

Mendukung dan memberikan detail pada penelitian sebelumnya (Lu *et al.*, 2011, Choi *et al.*, 2013), pemberian ekstrak bawang Dayak 60 dan 90 mg/KgBB mampu menurunkan jumlah dan degranulasi sel mast pada mesenterium, omentum dan peritoneum. Kemampuan ekstrak bawang Dayak 60 dan 90 mg/KgBB

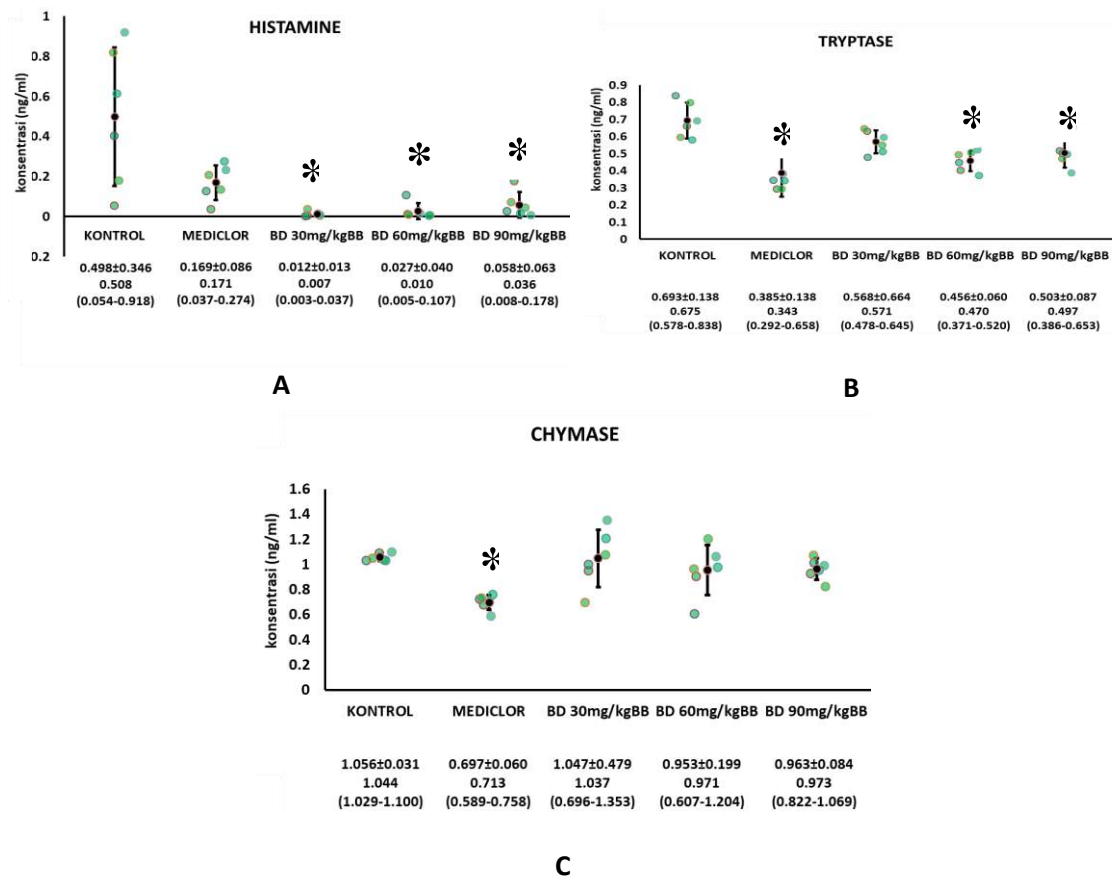
menurunkan derajat stres oksidatif, menurunkan kerusakan sel mast akibat oksidan. Menurunnya jumlah dan degranulasi sel mast akan menurunkan modulasi inflamasi dan degranulasi sel mast. Penurunan total sel mast mesenterium pada pemberian dosis ekstrak bawang Dayak 30 mg/KgBB diduga karena mesenterium lebih banyak mengandung vaskuler. Pada analisis insiliko ekstrak bawang Dayak menunjukkan eleutherine mampu meregulasi ion kalsium untuk stabilisasi sel mast. Bawang Dayak mampu menghambat kanal TRPC, TRPV4 dan CRAC (calcium inhibitor) pada membran sel yang aktif karena dingin dan bertekanan tinggi. Bawang Dayak mengaktifkan kanal VDAC1, MCU dan MARCKS mitokondria (*calcium activator*), untuk menjaga kadar Ca^{2+} dalam kondisi fisiologis. (Poerwosusanta, 2019). Peran bawang Dayak menghambat SOR menyebabkan hambatan jalur aktivasi degranulasi melalui phospholipase C (PLC), peroksidasi lipid, peroksidasi protein dan oksidasi DNA. Hambatan pada SOR juga menghambat degranulasi melalui jalur Fyn-Syk.



Gambar 7.5 Profil sel mast peritoneum setelah pemberian bawang Dayak. Terjadi penurunan jumlah dan degranulasi sel mast peritoneum pasca pemberian bawang Dayak

7.6.3b Profil kadar histamine, tryptase dan chymase pasca pemberian bawang Dayak.

Didapatkan temuan pemberian ekstrak bawang Dayak 30, 60 dan 90 mg/KgBB mampu menurunkan kadar *histamine* cairan peritoneal. Penurunan kadar *histamine* sesuai dengan penurunan degranulasi sel mast setelah pemberian ekstrak bawang Dayak.



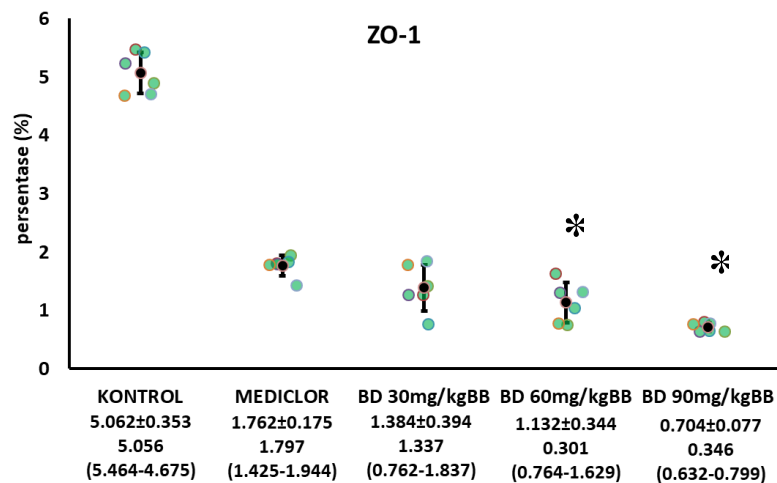
Grafik 7.4

Profil mediator sel mast, Kadar histamine N=6, dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD,* p<0.05 vs kontrol (A), kadar tryptase N=6, dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD,* p<0,05 vs kontrol (B), kadar chymase N=6, dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD, * p<0.05 vs kontrol (C), cairan peritoneal kelompok tekanan 10 mmHg/Kontrol; tekanan 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 30 mg/KgBB, Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 60 mg/KgBB dan Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 90 mg/KgBB.

Terbukti pemberian ekstrak bawang Dayak 60 dan 90 mg/KgBB mampu menurunkan kadar tryptase. Penurunan kadar *tryptase* sesuai dengan penurunan degranulasi sel mast setelah pemberian ekstrak bawang Dayak. Pemberian mediclor intra peritoneal mampu memberikan pertahanan lokal pada sel mast terhadap trauma tekanan.

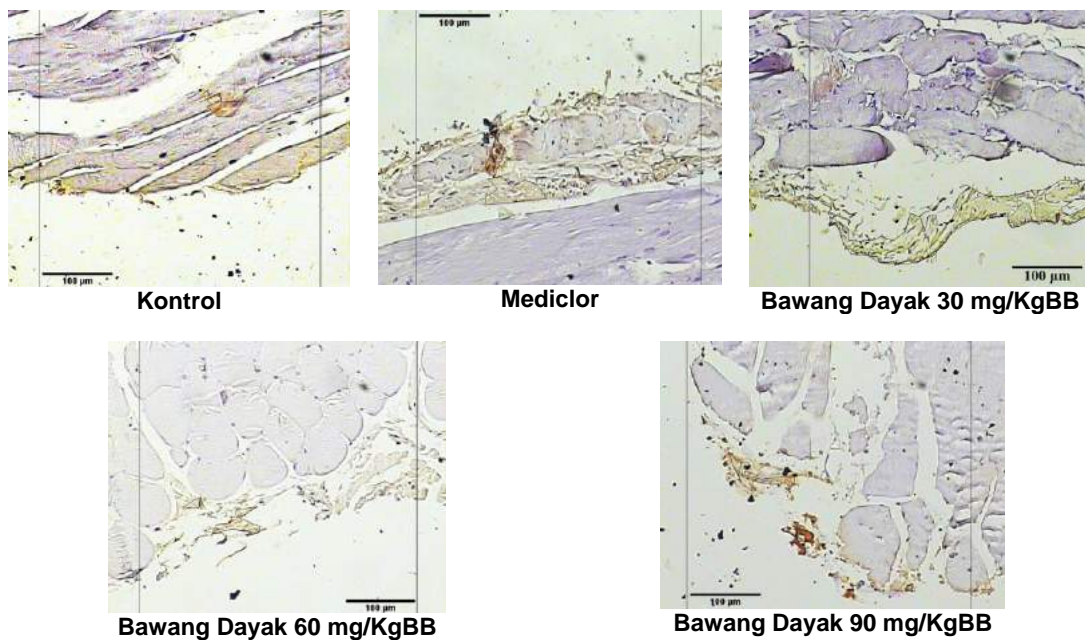
Pada penelitian tidak terjadi penurunan kadar *chymase* setelah pemberian ekstrak bawang Dayak. Diduga bioaktif bawang Dayak tidak mampu berikatan dengan protein target *chymase*. Proteksi lokal Mediclor dan efek bawang Dayak mencegah degranulasi sel mast sehingga kadar *chymase* rendah sebelum pemberian bawang Dayak.

7.6.4. Profil ekspresi ZO-1 pasca pemberian bawang Dayak.



Grafik 7.5 Profil ekspresi ZO-1 jaringan peritoneal N=6, dengan uji Welch Robust Tests of Equality of Means dan Post Hoc Games-Howell, * p<0.05 vs kontrol, kelompok tekanan 10 mmHg/Kontrol; tekanan 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 30 mg/KgBB, Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 60 mg/KgBB dan Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 90 mg/KgBB.

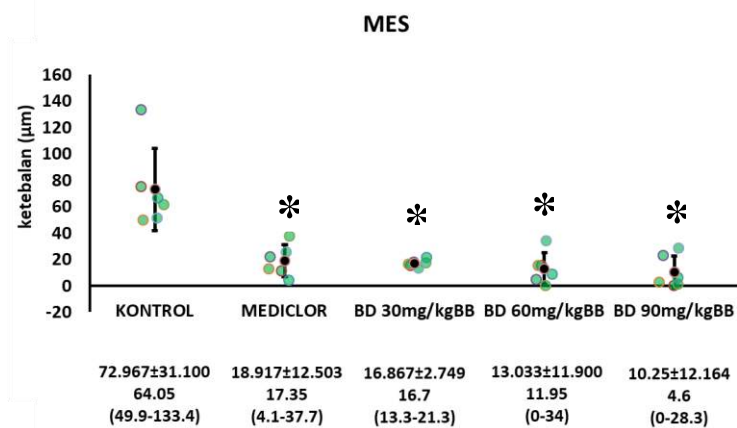
Mendukung penelitian penelitian sebelumnya, pemberian anthraquinone mampu menurunkan ekspresi ZO-1 (Mei *et al.*, 2015, Chen *et al.*, 2019). Penurunan rerata ZO-1 secara bermakna, berhubungan dengan penurunan kerusakan sel mesotel pasca pemberian bawang Dayak sebagai komponen sel terbanyak pada rongga abdomen.



Gambar 7.6 Ekspresi ZO-1 pasca pemberian bawang Dayak. Ekstrak bawang Dayak 60 mg/KgBB mampu menurunkan ekspresi ZO-1. Ekstrak bawang Dayak mampu mempertahankan ikatan antar sel mesotel.

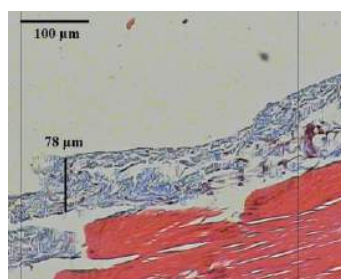
7.6.5. Profil ketebalan MES pasca pemberian bawang Dayak.

Mendukung penelitian sebelumnya, bahwa kegagalan regenerasi mesotelium menyebabkan penebalan MES (Yung *and* Chan, 2001, Saed *et al.*, 2002). Dan konsep peningkatan sel fibroblas menyebabkan penebalan MES (Rojo *and* Conget, 2018, Tian *et al.*, 2018).

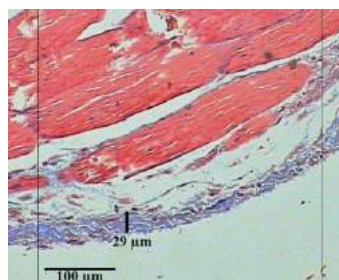


Grafik 7.6 Profil ketebalan MES, N=6, dengan uji ANOVA dan post Hoc LSD, * $p < 0.05$ vs kontrol. kelompok tekanan 10 mmHg/Kontrol; tekanan 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal, Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 30 mg/KgBB, Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 60 mg/KgBB dan Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 90 mg/KgBB.

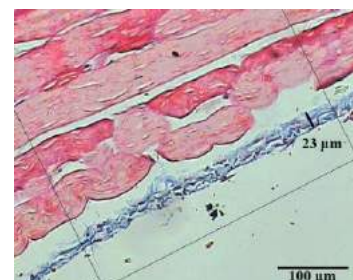
Penelitian ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak bawang Dayak 30, 60, 90 mg/KgBB mampu menurunkan ketebalan MES pasca laparoscopi. Penurunan ketebalan MES disebabkan pemberian bawang Dayak mengurangi kerusakan mesotel. Sel mesotel intak menurunkan respon inflamasi dan menurunkan sekresi TGF- β . Penurunan TGF- β menyebabkan penurunan jumlah fibroblas dan ketebalan MES menurun. Efek proteksi lokal Mediclor mengurangi kerusakan mesotel sehingga ketebalan MES menurun.



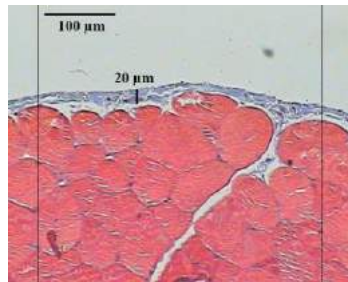
Kontrol



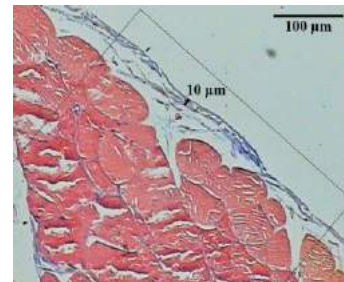
Mediclor



Bawang Dayak 30 mg/KgBB



Bawang Dayak 60 mg/KgBB

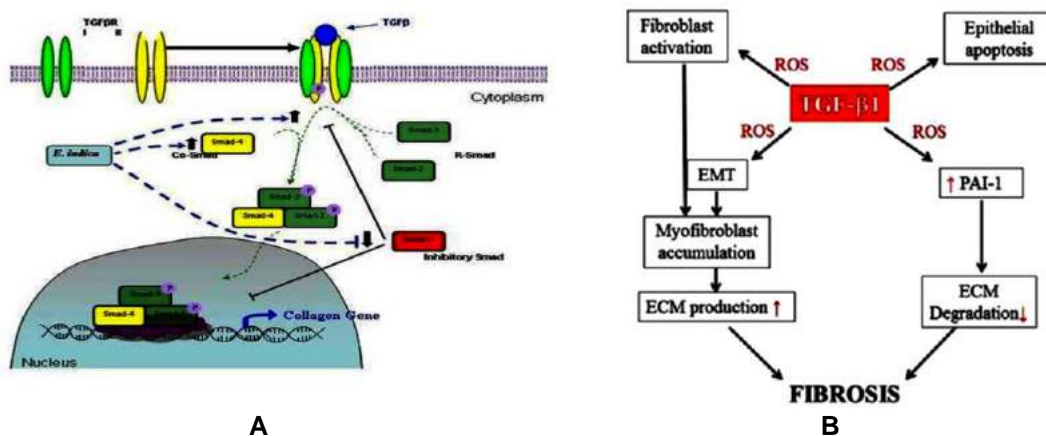


Bawang Dayak 90 mg/KgBB

Gambar 7.7 Pengaruh pemberian ekstrak bawang Dayak pada ketebalan MES. Pemberian bawang Dayak mulai dosis 60 mg/KgBB menyebabkan penurunan ketebalan MES.

Setelah TGF- β terikat pada reseptornya dan terjadi aktivasi jalur smad dan menyebabkan migrasi smad4 dalam nukleus. Migrasi smad4 dalam nukleus akan memicu gen pembentuk kolagen (Upadhyay *et al.*, 2013).

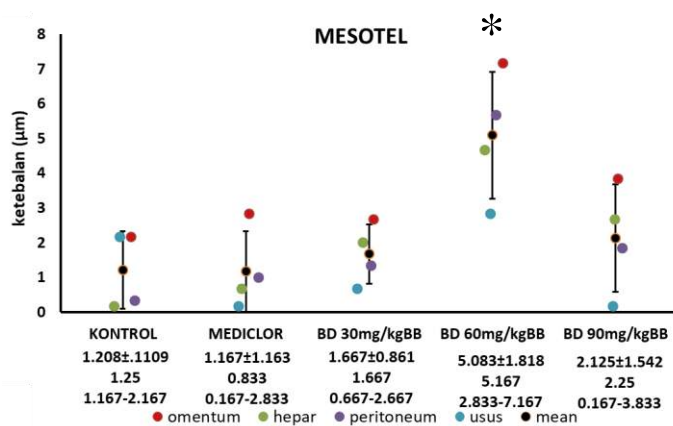
Pemberian bawang Dayak menghambat migrasi smad4 dan memicu migrasi smad7 dalam nukleus, sehingga pembentukan MES akan menurun. Pemberian bawang Dayak menghambat pembentuk TGF- β , sehingga pembentukan MES akan menurun dan proses degradasi fibrin akan berjalan normal.



Gambar 7.8 Peran TGF- β pada pembentukan MES. Setelah TGF- β terikat pada reseptornya maka akan mengaktifkan jalur pembentukan MES (A) (dikutip dari Ppadhyay *et al.*, 2013). TGF- β akan memicu produksi MES dan menghambat degradasi MES (B) Mekanisme degradasi MES lebih dominan dibanding produksi MES (dikutip dari Liu and Desai, 2015)

7.6.6 Profil perubahan mikroskopis pasca pemberian bawang Dayak.

Pada penelitian ini didapatkan peningkatan bermakna sel mesotel yang intak pada membrana basalis. Pemberian bawang Dayak mampu meningkatkan kadar modulator stres inflamasi dan mencegah kerusakan sel mesotel akibat stres oksidatif. Dengan berkurangnya kerusakan mesotel, respon inflamasi akan menurun sehingga dampak pada sel mesotel akan lebih baik.

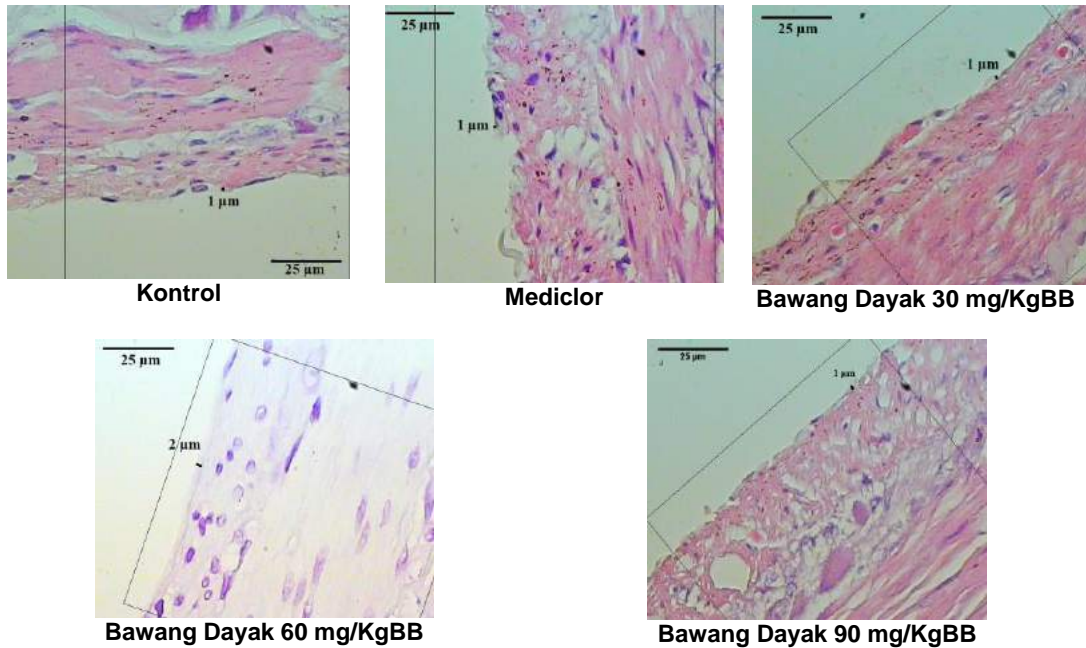


Grafik 7.7 Profil distribusi sel mesotel kelompok tekanan 10 mmHg/Kontrol; tekanan 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal; Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 30 mg/KgBB; Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 60 mg/KgBB dan Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 90 mg/KgBB, N=6, dengan uji ANOVA dan Pos Hoc LSD, * p<0.05 vs kontrol

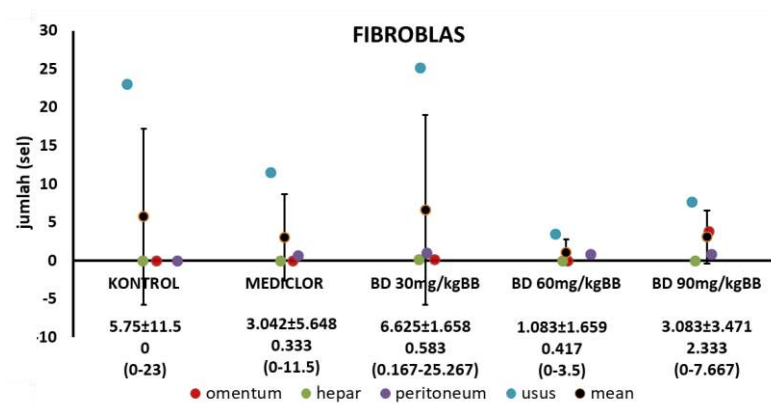
Peningkatan juga sel mesotel yang intak terjadi merata pada jaringan peritoneum viseral (omentum, hepar, usus) dan peritoneum parietal. Pada penelitian ini terbukti pemberian sistemik memberikan efek ketahanan mesotel yang lebih baik dibanding pemberian lokal (Mediclor).

Pada penelitian ini terjadi penurunan kadar rerata sel fibroblas walaupun tidak bermakna secara statistik. Penurunan sel fibroblas disebabkan penurunan stres oksidatif sehingga kerusakan sel mesotel menurun. Sel mesotel yang intak dan penurunan kadar TGF-β, diduga menyebabkan penurunan transformasi sel mesotel

menjadi fibroblas. Penurunan jumlah dan degranulasi sel mast, serta histamine dan tryptase adalah mekanisme lain penyebab turunnya fibroblas.



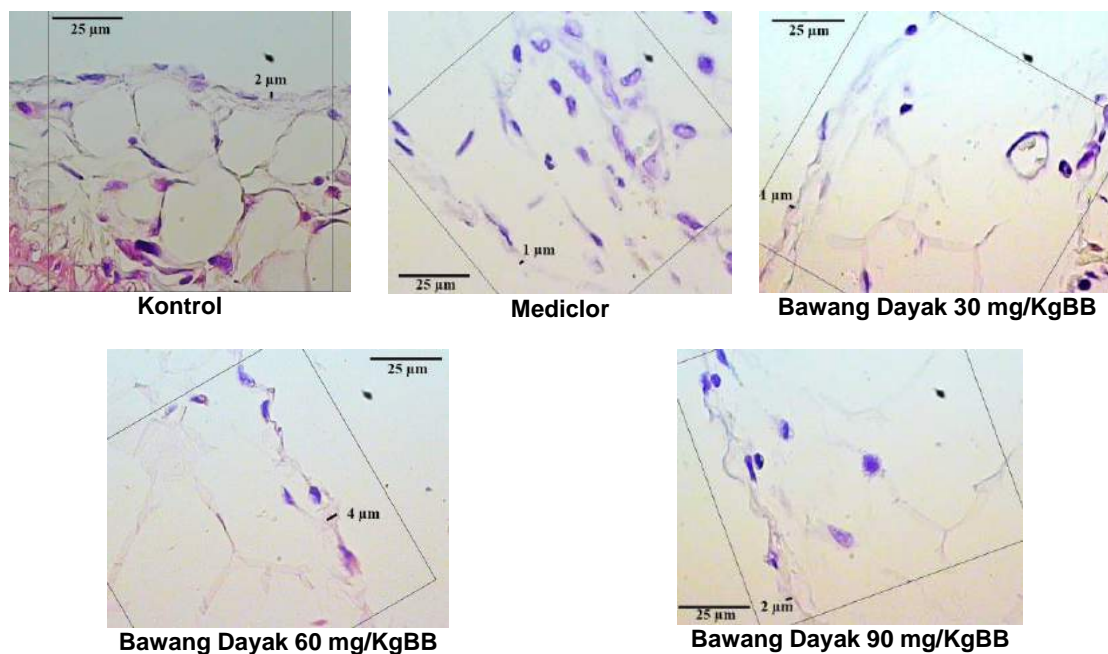
Gambar 7.9 Perubahan mikroskopis Usus setelah pemberian bawang Dayak. Terjadi peningkatan mesotel dan ketebalan glikokalik, penurunan vaskuler dan PMN pasca pemberian bawang Dayak.



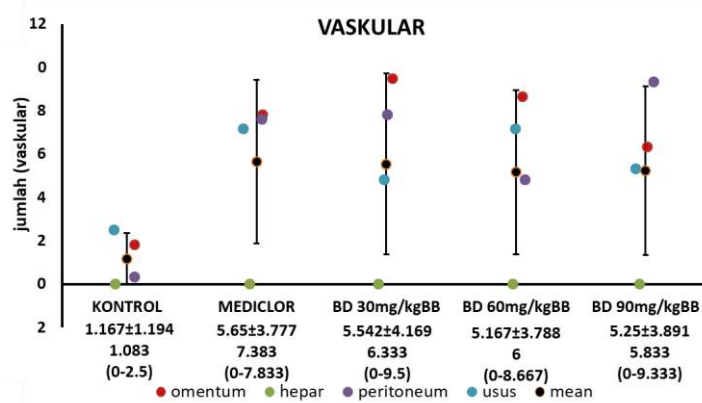
Grafik 7.8 Profil distribusi fibroblas kelompok tekanan 10 mmHg/Kontrol; tekanan 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal; Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 30 mg/KgBB; Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 60 mg/KgBB dan Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 90 mg/KgBB, N=6, dengan uji Kruskal Wallis dan post Hoc Mann Whitney, $p > 0.05$ vs kontrol

Penurunan sel fibroblas terjadi pada jaringan usus, mekanisme ini diduga karena pemberian sistemik bawang Dayak terjadi pada usus yang kaya vaskular berhubungan mesenterium. Mesotelium hepar dan omentum adalah jaringan yang mengandung sedikit sel fibroblas, sehingga terjadi penurunan yang tidak bermakna setelah pemberian bawang Dayak maupun Mediclor.

Pemberian bawang Dayak meningkatkan jumlah vaskular walaupun secara statistik tidak bermakna. Laproskopi pada tekanan 10 mmHg merupakan tekanan tinggi yang memicu IAH (Avital *et al.*, 2008) dan terjadi vaskonstriksi. Penurunan vasokonstriksi jaringan mesotelium pada pemberian bawang Dayak akibat resultan efek *histamine*, dan *katekolamine*.



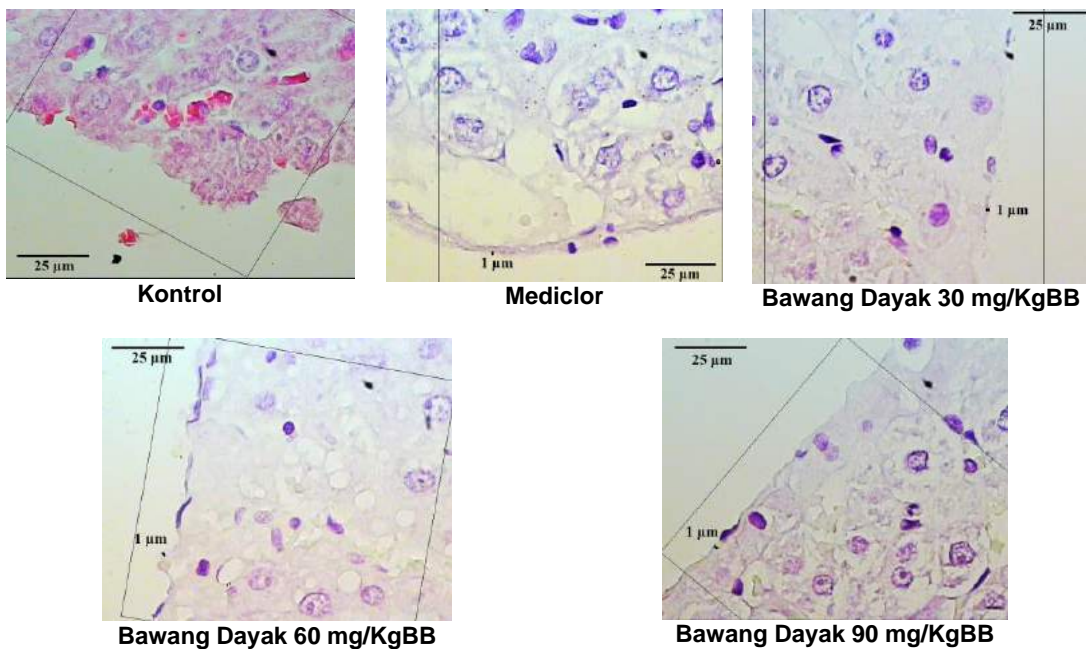
Gambar 7.10 Perubahan mikroskopis Omentum setelah pemberian bawang Dayak. Terjadi peningkatan mesotel dan penurunan vaskuler pasca pemberian bawang Dayak.



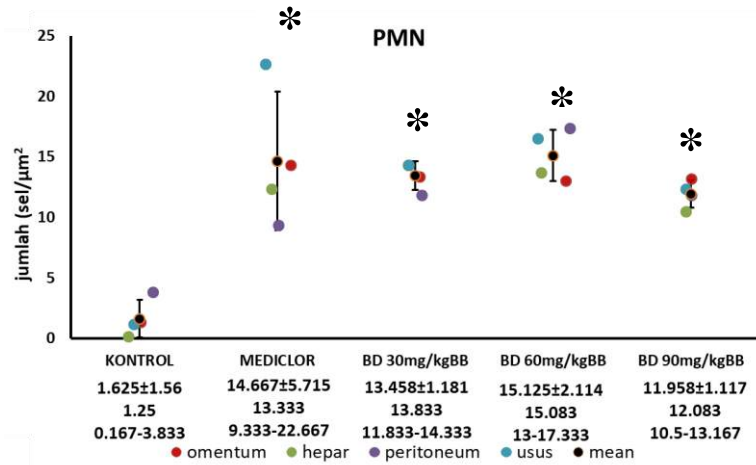
Grafik 7.9 Profil distribusi vaskular kelompok tekanan 10 mmHg/Kontrol; tekanan 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal; Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 30 mg/KgBB; Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 60 mg/KgBB dan Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 90 mg/KgBB, N=6, dengan uji Kruskal Wallis dan post Hoc Mann Whitney, $p > 0.05$ vs kontrol

Peningkatan vaskular terjadi pada jaringan mesotelium usus dan omentum.

Mesotelium hepar merupakan jaringan dengan sedikit vaskuler.

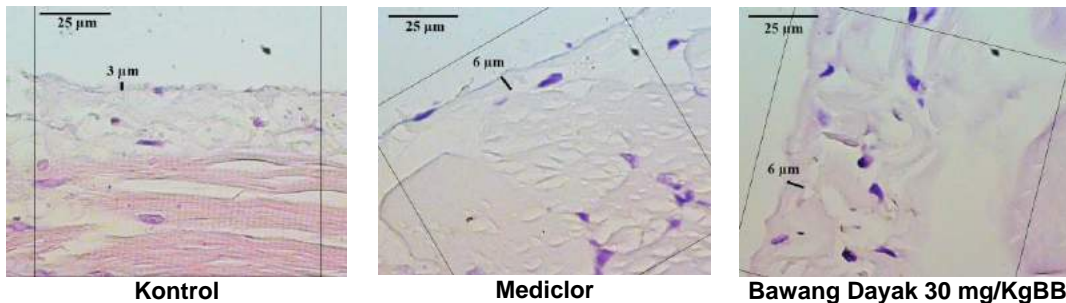


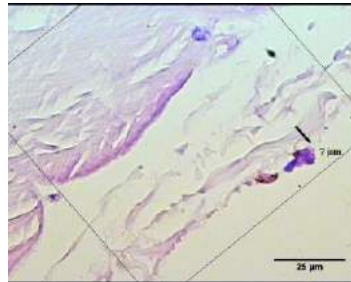
Gambar 7.11 Perubahan mikroskopis Hepar setelah pemberian bawang Dayak. Terjadi peningkatan mesotel dan ketebalan glikokalik pasca pemberian bawang Dayak.



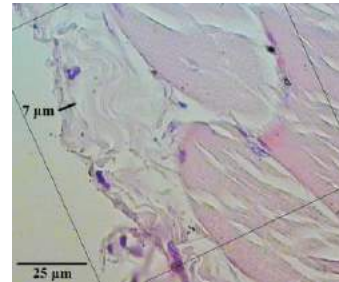
Grafik 7.10 Profil distribusi PMN kelompok tekanan 10 mmHg/Kontrol; tekanan 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal; Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 30 mg/KgBB; Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 60 mg/KgBB dan Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 90 mg/KgBB, N=6, dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD, * p<0.05 vs kontrol

Pada penelitian ini dibuktikan peningkatan bermakna sel PMN pada pemberian bawang Dayak. Efek vasodilatasi pemberian bawang Dayak meningkatkan jumlah sel PMN. Pemberian Mediclor meningkatkan sel PMN, diduga proteksi lokal pada sel rongga abdomen, sehingga sekresi katekolamine menurun.





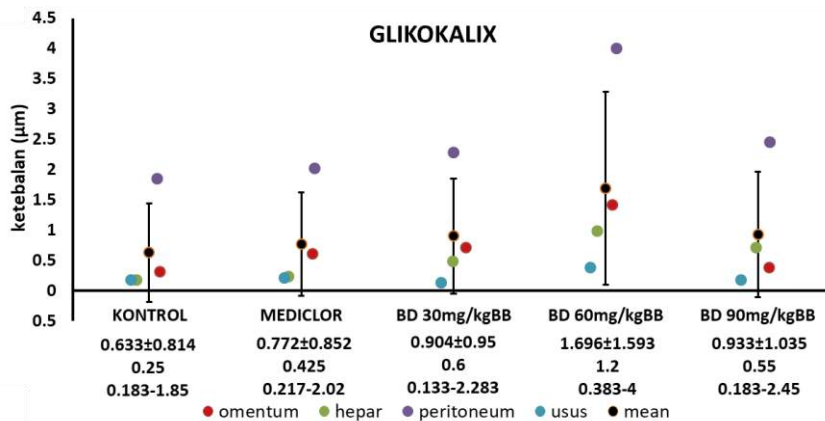
Bawang Dayak 60 mg/KgBB



Bawang Dayak 90 mg/KgBB

Gambar 7.12 Perubahan mikroskopis Peritoneum setelah pemberian bawang Dayak. Terjadi peningkatan mesotel dan ketebalan glikokaliks, penurunan vaskuler pasca pemberian bawang Dayak.

Pemberian bawang Dayak menyebabkan peningkatan ketebalan glikokaliks walaupun tidak bermakna secara statistik. Pemberian bawang Dayak mampu mencegah kerusakan mesotel karena peningkatan modulator stres inflamasi. Sel mesotel yang mengalami trauma diduga belum mampu memproduksi glikokaliks dengan baik.

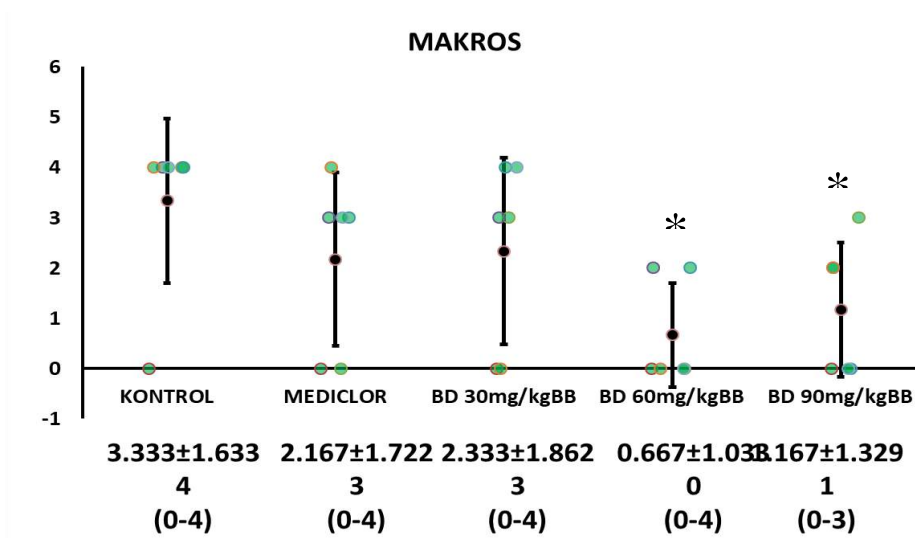


Grafik 7.11 Profil ketebalan glikokaliks kelompok tekanan 10 mmHg/Kontrol; tekanan 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal; Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 30 mg/KgBB; Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 60 mg/KgBB dan Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 90 mg/KgBB, N=6 , dengan uji ANOVA dan Post Hoc LSD, $p > 0.05$ vs kontrol

Peningkatan ketebalan glikokalix terjadi pada peritoneum visceral (omentum, hepar) dan peritoneum parietal. Tipe sel mesotel peritoneum parietal diduga memproduksi glikokalix paling cepat setelah trauma.

7.6.7 Profil skoring adesi makroskopis pasca pemberian bawang Dayak.

Penelitian ini membuktikan pemberian ekstrak bawang Dayak 60 dan 90 mg/KgBB mampu menurunkan skoring adesi intra-abdominal pasca laparoscopi. Cedera reperfusi dan stres oksidatif menyebabkan lepasnya sel mesotel dari membrana basalis. Terpaparnya membrana basalis menyebabkan penebalan MES sehingga memicu adesi intra-abdominal. Kemampuan bawang Dayak sebagai modulator inflamasi mampu menurunkan kadar TGF- β yang terbukti menurunkan adesi intra-abdominal. Kemampuan bawang Dayak meningkatkan kadar modulator stres inflamasi meningkatkan ketahanan sel mesotel sehingga mencegah terpaparnya membrana basalis sehingga menurunkan adesi. Efek modulator stres inflamasi bawang Dayak menurunkan jumlah dan degranulasi sel mast, sehingga terjadi penurunan *histamine* dan *tryptase*. Sel mesotel yang intak mencegah penebalan MES.



Grafik 7.12 Profil skoring makroskopis adesi intra abdominal kelompok tekanan 10 mmHg/Kontrol; tekanan 10 mmHg dengan pemberian Mediclor intra peritoneal; Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 30 mg/KgBB; Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 60 mg/KgBB dan Tekanan 10 mmHg dengan pemberian Bawang Dayak 90 mg/KgBB, N=6, dengan uji Kruskal Wallis dan post Hoc Mann Whitney, * p<0.05 vs kontrol.

BAB 6

PEMBAHASAN UMUM

PENELITIAN INSILIKO BAWANG DAYAK

Analisa insiliko didapatkan 14 bahan aktif yang terkandung pada ekstrak bawang Dayak (*Eleutherine Americana L. merr*): triterpenoid, naphthol, anthraquinone, eleuthoside B, eleutheroside A, eleutherol, isoeleutherine, elecanacin, eleutherine, dihydroeleutherinol, eleutherinol/eleutherinone, hongconin, naphthoquinone dan isoeleutherol Menggunakan metode LCMS (Liquid Chromatography Mass Spectrometry) diidentifikasi 3 bahan aktif dalam kadar tinggi yaitu: isoeleutherol, eleutherol dan eleutherine.

Tidak didapatkan bahan aktif yang mampu berikatan dengan baik dengan protein target TGF- β . Pada penelitian didapatkan temuan bahwa senyawa eleutherol mampu berikatan dengan protein target NF κ B dan berpotensi sebagai modulator inflamasi. Eleutheroside A dan elecanacine yang berpotensi sebagai modulator stres oksidatif, tetapi tidak mampu berikatan dengan baik dengan protein target *xanthine oxidase*. Berdasarkan analisa insiliko ekstrak bawang Dayak kurang berpotensi sebagai modulator inflamasi, modulator stres oksidatif dan penstabil sel, karena 3 bahan aktif isoeleutherol, eleutherol dan eleutherine dalam kadar tinggi tidak mampu berikatan dengan protein targetnya. Temuan penelitian in-vivo potensi bawang Dayak sebagai modulator inflamasi dan modulator stres oksidatif, diduga karena adanya protein perantara dalam ekstrak bawang Dayak yang menyebabkan isoeleutherol dan eleutherine mampu berikatan dengan protein target TGF- β , NF κ B dan *xanthine oxidase*. Eleutherol mampu berikatan dengan protein target NF κ B dan berpotensi

sebagai modulator inflamasi. Potensi modulator stres oksidatif ekstrak bawang Dayak, didukung kemampuan eleutheroside A dan eleuthoside B yang kaya dengan gugus hidroksil sebagai pendonor hidrogen. Kemampuan flavonoid yang kaya gugus oksigen berkemampuan sebagai ekseptor elektron. Perlu dikembangkan penelitian lanjut untuk menggali potensi sebagai modulator stres oksidatif pada senyawa: isoeleutherol, eleutherol, eleutherine, eleutheroside A, eleuthoside B dan flavonoid.

Temuan penelitian insiliko tentang: naphthoquinone dan anthraquinone berpotensi sebagai penstabil sel melalui homeostasis ion Ca^{2+} , menarik untuk dilakukan pada penelitian lanjutan preklinik maupun klinik. Kemampuan bahan aktif ekstrak bawang Dayak sebagai stabilisator sel melalui homeostasis Ca^{2+} , merupakan metode yang perlu ditindaklanjuti. Khususnya stabilisator sel mast dan mesotel karena peran besar pada kejadian adesi intra abdominal.

Kemampuan ekstrak bawang Dayak sebagai: modulator inflamasi, modulator stres oksidatif dan stabilisator sel mast diharapkan mampu menurunkan adesi intra-abdominal pasca laparoskopi.

PENGARUH TEKANAN pada LAPAROSKOPI

Insufiasi CO_2 dengan tekanan 10 mmHg (manusia: 15 mmHg) menyebabkan iskemia jaringan karena melebihi toleransi tekanan fisiologis rongga abdomen pada laparoskopi. Pada saat desufiasi terjadi aliran O_2 . Melalui xanthine-oxidase, O_2 akan dirubah menjadi oksidan dan terjadi stres oksidatif.

Stres oksidatif terjadi karena gangguan keseimbangan oksidan-modulator stres oksidatif dan berhentinya reaksi redox. Mekanisme ini menyebabkan kerusakan

sel dan jaringan dalam rongga abdomen. Stres oksidatif dibuktikan dengan peningkatan TOS dan OSI sebagai indikator. Stres oksidatif memicu kerusakan sel, khususnya mesotel dan sel mast. Kerusakan sel memicu peningkatan DAMPs dan terjadi respon inflamasi. Didapatkan temuan peningkatan tidak bermakna MDA membuktikan terdapat jalur selain peroksidasi lipid yang menyebabkan kerusakan sel. Kerusakan non peroksidasi lipid akibat SOR, diduga melalui peroksidasi protein dan DNA. Iskemia jaringan mengakibatkan gangguan sel oleh karena defisiensi ATP. Hipoksia menyebabkan aktivasi jalur komplemen C3a dan C5a. Baro-trauma, termo-trauma dan inflamasi menyebabkan gangguan homeostasis Ca^{2+} sel dan terjadi kerusakan sel.

Respon inflamasi bertujuan mengeliminasi non self dengan baik akibat kerusakan jaringan. Vasodilatasi akibat histamine bertujuan mempermudah rekrumen sel fagosit. Produksi kemokin mempermudah sel fagosit menuju DAMPs sehingga bekerja dengan baik. Peningkatan jumlah, degranulasi sel mast dan respon inflamasi ditujukan untuk mengeliminasi non self dengan sempurna. Respon inflamasi yang berlebihan menyebabkan mekanisme mengarah pada proses patologis. Vasodilatasi yang berlebihan, diduga berpotensi meningkatkan molekul adesi dan meningkatkan kejadian adesi.

Pada laparoskopi degranulasi sel mast dominan terjadi melalui jalur non peroksidasi lipid. Jalur ekstra seluler dipicu oleh breakdown adenine nucleotides, endothelin 1(ET-1) dan aktivasi C3a-C5a reseptor membran sel. Aktivasi membran sel menyebabkan mobilisasi Ca^{2+} dan terjadi degranulasi. Jalur intra seluler terjadi karena aktivasi protein kinase C (PKC) dan phospholipase C (PLC). Hipoksia sel

menyebabkan gangguan kanal membran sel yang tergantung pada ATP dan aktivasi C3a-C5a. Kerusakan sel memicu IL-33 pada reseptor sel mast sehingga terjadi degranulasi. Perubahan struktur protein kinase Fyn dan Syk oleh SOR, menyebabkan aktivasi sel mast. Sel mast bersifat termo dan baro sensitif. TRPC aktif oleh suhu dingin, CRAC dan TRPV4 diaktifkan oleh tekanan. Aktivasi kanal Ca^{2+} menyebabkan masuknya Ca^{2+} dalam sitosol dan memicu degranulasi. Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang temuan degranulasi sel mast melalui mekanisme non peroksidasi lipid. Dan potensi ekstrak bawang Dayak yang mampu meregulasi kanal Ca^{2+} .

Degranulasi sel mast saling memicu peningkatan kadar TGF- β dan SOR. TGF- β dan SOR saling memicu meningkatkan kadarnya. SOR akan meningkatkan kerusakan sel mesotel, sedang TGF- β meningkatkan transformasi mesotel ke fibroblas dan mengganggu mekanisme fibrinolisis.

Kerusakan sel mesotel mengakibatkan lepasnya sel mesotel dari membrana basalis. Didapatkan temuan peningkatan TGF- β yang tidak selaras dengan peningkatan jumlah fibroblas. Hal ini membuktikan peningkatan ketebalan MES dan adesi intra abdominal terjadi akibat gangguan proses fibrinolisis lebih dominan dibanding transformasi fibroblas.

Terlepasnya sel mesotel menyebabkan hilangnya proteksi glikokalik dan terpaparnya membrana basalis. Indikator lepasnya sel mesotel dibuktikan dengan peningkatan kadar ZO-1 secara bermakna. Proses ini menyebabkan peningkatan ketebalan MES yang memicu adesi intra-abdominal. Penipisan glikokalik berhubungan dengan lepasnya sel mesotel, oleh karena glikokalik diproduksi oleh

mesotel. Terpaparnya MES oleh gas CO₂ menyebabkan perubahan struktur MES. Perubahan struktur MES memicu perubahan lingkungan mikro, growth factor dan gen yang memicu adesi. Menarik dilakukan penelitian lanjutan tentang perubahan struktur MES yang multifaktorial dan kompleks akibat laparoskopi.

Peningkatan skoring adesi intra abdominal, merupakan resultan dari proses yang multifaktor. Tekanan intra abdominal melebihi 10 mmHg (manusia 15 mmHg) menyebabkan kerusakan sel mast, mesotel dan penebalan MES sebagai faktor utama terjadinya adesi. Iskemia jaringan dan stres oksidatif akibat insuflasi, memicu respon inflamasi yang berpotensi meningkatkan adesi.

Pengaruh pemberian bawang Dayak pada laparoskopi.

Penurunan respon inflamasi ditandai dengan menurunnya kadar TGF- β , jumlah dan degranulasi sel mast. Penurunan TGF- β diprediksi melalui hambatan reaksi fosforilasi sisi aktif I κ B jalur NF κ B. Mekanisme scavenging SOR sebagai modulator stres oksidatif, dibuktikan dengan peningkatan TAC dan penurunan MDA. Berkurangnya oksidan dan kerusakan sel, menurunkan respon inflamasi pasca laparoskopi. Secara komputasi banyak bahan aktif bawang Dayak tidak dapat berikatan langsung dengan protein target. Diduga terdapat protein perantara yang membuat bahan aktif dapat berikatan dengan protein targetnya. Perlu dilakukan penelitian lanjut untuk mendeteksi dan mekanisme kerja protein perantara tersebut. Pemberian mediclor sebagai proteksi local, dipertimbangkan untuk dilakukan penelitian dengan kombinasi bawang Dayak secara intra peritoneal.

Pemberian bawang Dayak menurunkan stres oksidatif dibuktikan dengan penurunan pemakaian modulator stres oksidatif endogen, sehingga modulator stres oksidatif endogen (TAC) tetap tinggi. Penurunan MDA membuktikan bahwa terjadi penurunan kerusakan sel pasca laparoskopi. Kemampuan modulator stres oksidatif bawang Dayak, lebih banyak dipengaruhi oleh berkurangnya respon inflamasi. Penurunan respon inflamasi menyebabkan berkurangnya TGF- β , rasio TGF- β /IL-10 dan peningkatan IL-10. Resultan mekanisme ini mengarah kepada proses homeostasis. Stres oksidatif berkurang dengan menurunnya TGF- β . Dengan meningkatnya sel mesotel dan sel mast yang intak, menyebabkan penurunan ketebalan MES dan skoring adesi intra-abdominal. Hubungan antara inflamasi dan stres oksidatif pasca laparoskopi, menarik untuk dilakukan penelitian sebagai jalur pencegahan adesi intra-abdominal.

Secara *invivo* pemberian ekstrak bawang Dayak menurunkan stres oksidatif. Peningkatan kadar TAC dan menurunnya MDA membuktikan kemampuan bawang Dayak sebagai *scavenging* SOR. Menurunnya stres oksidatif menyebabkan berkurangnya kerusakan jaringan mesotelial, sehingga respon inflamasi menurun. Penurunan respon inflamasi ditandai dengan menurunnya kadar TGF- β , jumlah dan degranulasi sel mast.

Pemberian bawang Dayak terbukti menurunkan jumlah sel mast pada peritoneum, omentum dan mesenterium. Kemampuan modulator inflamasi berdampak pada penurunan jumlah sel mast rongga abdomen. Kemampuan modulator stres oksidatif bawang Dayak mencegah degranulasi sel mast pada peritoneum dan omentum. Diduga penurunan degranulasi sel mast melalui jalur

inflamasi dan homeostasis Ca^{2+} . Temuan ini perlu dilakukan penelitian lanjut, agar bawang Dayak dimanfaatkan sebagai terapi melalui stabilisator sel mast dan mencegah adesi intra abdominal. Tidak didapatkan penurunan degranulasi sel mast pada omentum. Diduga peran omentum yang mengandung banyak stem sel limfoid. Sel mast dipertahankan tidak terjadi degranulasi karena perannya sebagai organ pertahanan yang bertanggungjawab pada respon inflamasi. Proteksi local mediclor, mampu mempertahankan sel mast untuk tidak terjadi degranulasi. Penurunan *histamine* dan *tryptase* bukan karena efek langsung bahan aktif bawang Dayak pada *histamine* dan *tryptase*. Tetapi karena efeknya sebagai stabilisator sel mast. Tidak terjadi penurunan *chymase* secara bermakna diduga berhubungan dengan populasi tipe sel mast jaringan ikat pada rongga abdomen.

Penurunan ekspresi ZO-1 pasca pemberian bawang Dayak, membuktikan terjadi penurunan kerusakan sel mesotel. Efek modulator inflamasi dan modulator stres oksidatif, mampu mencegah kerusakan sel mesotel.

Matrik Ekstra Seluler (MES) merupakan struktur 3 dimensi yang sangat kompleks. Terdiri dari terdiri dari kolagen, enzim, glikoprotein (proteoglikan) dan vesikel ekstraseluler (DNA, RNA dan Matrix-bound nanovesicles/MBVs) dan fibroblast. Efek resultannya menentukan kualitas penyembuhan. Paparan gas CO_2 , respon inflamasi dan stres oksidatif mempengaruhi ketebalan MES. Kemampuan modulator stres oksidatif, modulator inflamasi, stabilisator sel mast dan mesotel, mampu menurunkan ketebalan MES kearah fisiologis secara bermakna. Penurunan kadar TGF- β , diduga menghambat gen fibrosis smad4 dan memicu gen smad7

kedalam nukleus sehingga mekanisme fibrinolysis kearah fisiologis. Temuan ini perlu ditindak lanjuti untuk meneliti peran bawang Dayak pada gen smad4 dan smad7.

Peningkatan bermakna jumlah mesotel yang intak pasca pemberian bawang Dayak, membuktikan potensi bawang Dayak sebagai modulator inflamasi dan modulator stres oksidatif dalam mencegah kerusakan mesotel. Didapatkan bukti pemberian sistemik bawang Dayak memberikan efek yang lebih baik dibanding pemberian mediclor intra peritoneal. Tidak terjadi penurunan sel fibroblas, membuktikan penurunan TGF- β pasca pemberian bawang Dayak lebih dominan pada mekanisme fibrinolisis. Peningkatan jumlah vaskuler akibat berkurangnya vasokonstriksi. Diduga akibat resultan efek antara histamine dan katekolamine. Dampak vasodilatasi menyebabkan aliran PMN meningkat dalam vaskuler dan meningkatkan jumlah PMN dalam jaringan. Walaupun terdapat peningkatan jumlah mesotel yang intak, tetapi tidak disertai dengan penebalan glikokalik. Diduga sel mesotel masih belum mampu memproduksi glikokalik pasca trauma. Perubahan mikroskopis perlu dilakukan penelitian lanjut. Sebagai komponen MES faktor mikroskopis berperan penting pada fase penyembuhan. Perlu diciptakan skoring mikroskopis untuk memprediksi kejadian adesi.

Terbukti pemberian bawang Dayak menurunkan skoring adesi pasca laparokopi. Penurunan skoring adesi terjadi melalui beberapa jalur. Kemampuan modulator inflamasi menurunkan kadar TGF- β sebagai pencetus adesi. Kemampuan modulator stres oksidatif mampu mencegah degranulasi sel mast dan kerusakan mesotel sebagai faktor terjadinya adesi. Dampak positif pemberian bawang Dayak menurunkan ketebalan MES dan menurunkan skoring adesi. Dapat disimpulkan

bawang Dayak mampu mencegah adesi dan perlu dilakukan fase penelitian lanjutan agar dapat dimanfaatkan pada manusia.

Peranan sel mast dan mesotel dalam mekanisme adesi intra abdominal pasca laparoscopi

Beberapa faktor berpengaruh pada mekanisme adesi intra abdominal pasca laparoscopi. Tetapi belum diketahui faktor yang paling berpengaruh pada kejadian adesi. Dari hasil regresi linier bivariate, faktor mesotel ($p=0.000$) dan sel mast ($p=0.000$) merupakan faktor yang paling berpengaruh pada kejadian adesi. Mesotel merupakan sel paling banyak dan tersusun pada permukaan peritoneum dengan luas setara dengan luas permukaan tubuh (2 m^2). Lepasnya mesotel pasca laparoscopi menyebabkan perubahan dan fungsi peritoneum. Dipengaruhi oleh perubahan sel mast pasca laparoscopi menyebabkan peningkatan adesi pasca laparoscopi pada tekanan 10 mmHg atau lebih.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Ekstrak bawang Dayak menurunkan jumlah dan degranulasi sel mast serta skoring adesi intra abdominal pasca laparoskopi

1. Ekstrak bawang Dayak menurunkan skoring adesi intra abdominal melalui penurunan TGF- β dan rasio TGF- β /IL-10
2. Ekstrak bawang Dayak menurunkan skoring adesi intra abdominal melalui peningkatan Total Antioxidant Capacity (TAC) dan penurunan Malondealdehyde (MDA)
3. Ekstrak bawang Dayak menurunkan skoring adesi intra abdominal melalui penurunan jumlah dan degranulasi sel mast, histamine dan tryptase
4. Ekstrak bawang Dayak menurunkan skoring adesi intra abdominal melalui penurunan kerusakan sel mesotel
5. Ekstrak bawang Dayak menurunkan skoring adesi intra abdominal melalui penurunan ketebalan MES
6. Ekstrak bawang Dayak menurunkan skoring adesi intra abdominal

SARAN

1. Dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi protein perantara yang mampu berikatan dengan protein target TGF- β dan xanthine oxidase sebagai anti adesi.
2. Dilakukan penelitian pada laparoscopi untuk meneliti lebih lanjut, kerusakan sel mast akibat iskemia dan indikator nekrosis/apoptosis sel mast sebagai pencetus adesi
3. Dilakukan penelitian lanjutan pada bioaktif isoeluetherol, eleutherol dan eleutherine agar berpotensi sebagai fitofarmaka anti adesi dan pemberian intra peritoneal.