

EKSTRAK METANOL TERIPANG (*Holothuria scabra*) MENURUNKAN EKSPRESI GEN COX-2 PADA HEPAR MENCIT (*Mus musculus*) BETINA GALUR C57BL YANG DIINDUKSI DMBA DAN HIGH FAT DIET

Raden Ghita Sariwidyantury^{1*}, Demes Chornelia Maratantiningtyas², Hana Ratnawati³, Teresa Liliana⁴, Ardo Sanjaya⁵

^{1,2}Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Maranatha Christian University

³Department of Histology, Faculty of Medicine, Maranatha Christian University

⁴Department of Pathology Anatomy, Faculty of Medicine, Maranatha Christian University

⁵Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Maranatha Christian University

[Email: ghita.sariwidyantury@med.maranatha.edu]

Abstract: Methanol Extract of Tucumber (*Holothuria scabra*) Decreases The Expression of The Cox-2 Gene In The Hepar of Female Mice (*Mus musculus*) of The C57BL Strain Induced By DMBA and High Fat Diet. NAFLD has been recognized as a major cause of chronic liver disease in Asia, where an estimated one-third of the population in developing countries had given clear evidence of steatosis event with the majority (70-90%) is in a simple steatosis condition. As well as other chronic liver diseases, the main mechanism which occur in NAFLD is also oxidative stress which involves so many inflammation cytokines such as TNF- α , IL-6, thromboxane, and prostaglandin which are known to be able to regulate inflammatory reactions and cancer growth in the colon and also liver. 30 C57BL strain female mice were induced by DMBA and fed high-fat diet were divided into 2 control groups and 3 treatment groups which were given three different dose of sea cucumber methanol extract specifically 0.33 ; 0.66 ; 0.99 for 6 weeks. Afterwards, the mice were being sacrificed and the liver was extracted to examined COX-2 gene expression using the semiquantitative RT-PCR method. The results of the study were statistically tested using ANOVA and Tukey HSD Post Hoc Test which showed significant results with $P < 0.001$. The expression of the COX-2 gene was inversely proportional to the concentration of the sea cucumber methanol extract. This result indicates the methanolic extract of sea cucumbers has an anti-inflammatory effect by reducing the expression of the COX-2 gene.

Keywords: Antiinflammation, Chronic Liver Disease, COX-2, Fatty Liver, NAFLD, Sitokin

Abstrak : Ekstrak Metanol Teripang (*Holothuria scabra*) Menurunkan Ekspresi Gen Cox-2 Pada Hepar Mencit (*Mus musculus*) Betina Galur C57BL Yang Diinduksi DMBA dan High Fat Diet. Saat ini NAFLD banyak dikenal sebagai penyebab utama penyakit hepar kronis di Asia, dimana diperkirakan sepertiga populasi negara berkembang memiliki bukti adanya steatosis dengan mayoritas berada pada kondisi *simple steatosis* (70-90%). Sama seperti penyakit hepar kronis pada umumnya, NAFLD juga didasari oleh mekanisme stres oksidatif yang melibatkan mediator inflamasi seperti TNF- α , IL-6, tromboksan, dan prostaglandin yang diketahui mampu meregulasi reaksi inflamasi dan pertumbuhan kanker pada kolon dan hepar. Dalam penelitian ini digunakan 30 ekor mencit betina galur C57BL yang diinduksi DMBA dan diberi pakan tinggi lemak, dibagi dalam 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan yang diberi ekstrak metanol teripang dengan dosis 0,33 g/KgBB ; 0,66 g/KgBB ; 0,99 g/KgBB selama 6 minggu. Mencit dikorbankan, kemudian organ hepar diekstraksi dan dilakukan pemeriksaan ekspresi gen COX-2 dengan metode semikuantitatif RT-PCR. Hasil penelitian diuji secara statistik menggunakan ANOVA dan Post Hoc Test Tukey HSD yang menunjukkan hasil signifikan dengan nilai $P < 0,001$. Ekspresi gen COX-2 berbanding

terbalik dengan konsentrasi ekstrak metanol teripang. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol teripang memiliki efek antiinflamasi melalui cara menurunkan ekspresi gen COX-2.

Kata kunci: Anti Inflamasi, COX-2, NAFLD, Perlemakan Hepar, Penyakit Hepar Kronis, Sitokin.

PENDAHULUAN

Insidensi penyakit hepar kronis mengalami peningkatan setiap tahunnya, termasuk di Asia. Salah satu penyakit hepar kronis yang sering ditemukan adalah Perlemakan Hati Non Alkoholik (*Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*) atau NAFLD. NAFLD merupakan kelainan hepar dengan gambaran khas berupa steatosis makrovesikular yang muncul pada pasien tanpa riwayat konsumsi alkohol, atau pasien dengan konsumsi alkohol kurang dari 20 gram etanol per minggu atau setara jumlah tersebut (Janakiram, 2015). Kejadian ini kemudian dihubungkan dengan sindroma metabolik berupa obesitas, Diabetes Melitus Tipe 2, dan hiperkolesterolemia. NAFLD mulai banyak dikenal sebagai penyebab utama pada penyakit yang mengenai organ hepar. Prevalensi NAFLD di Asia berkisar 8 – 15% dari total populasi (Adiwinata, R, dkk, 2015), sedangkan di negara berkembang NAFLD menjadi penyebab utama dari penyakit kronis hepar, dimana diperkirakan sepertiga populasi memiliki bukti adanya steatosis dari hasil pemeriksaan pencitraan dengan mayoritas berada pada kondisi *simple steatosis* (70-90%), atau steatosis tahap awal dimana ditemukan steatosis tanpa inflamasi dan fibrosis. Pasien dengan NAFLD seringkali berakhir dengan Sirosis, sehingga saat ini NAFLD mendapat perhatian lebih dalam hal penelitian (Adiwinata, R, dkk, 2015; Motino, O. et al, 2016).

Banyak penelitian yang telah dilakukan mengenai mekanisme kerusakan pada kasus-kasus penyakit hepar kronis seperti *hepatic steatosis*, NAFLD, fibrosis hepar sampai dengan kanker hepar dan berakhir pada kesimpulan bahwa mekanisme yang bertanggung jawab untuk keadaan tersebut adalah stres oksidatif yang terjadi pada parenkim hepar, serta

terdapat peningkatan aktivitas inflamasi yang dapat dilihat dari peningkatan ekspresi mediator-mediator inflamasi di parenkim hepar, baik yang melibatkan Sel Kupffer maupun tidak. Mediator-mediator pro inflamasi yang ditemukan pada proses tersebut antara lain TNF- α , IL-6, tromboksan, dan prostaglandin (Pangestuti, R, dkk, 2018; Martin-Sanz, P. et al, 2017; Motino, O. et al, 2016). Prostaglandin (PG) merupakan senyawa lipid bioaktif yang disintesis melalui jalur COX-2. PG meregulasi berbagai respon didalam tubuh, baik fisiologis maupun patologis, terutama pada reaksi inflamasi dan pertumbuhan tumor, contohnya kanker kolon dan kanker hepar (Pangestuti, R, dkk, 2018; Martin-Sanz, P. et al, 2017).

DMBA merupakan senyawa hidrokarbon polisiklik aromatik yang merupakan agen karsinogenik apabila telah diubah menjadi bentuk aktifnya, yaitu DMBA-3,4-diol-1,2-epoksida (Monga, 2014). Proses degradasi ini terjadi di hepar, apabila paparan DMBA pada hepar terjadi dalam jangka waktu yang lama, maka akan terjadi kerusakan hepatosit yang menyebabkan terjadinya stres oksidatif didalam hepar serta memicu proses inflamasi, dan lebih jauh lagi, dapat menginisiasi terjadinya kanker. Proses inflamasi yang terjadi menyebabkan dapat ditemukannya sitokin-sitokin pro inflamasi di hepar (Pangestuti, R, dkk, 2018; Oliveira, K, et al, 2015). Stres oksidatif dalam waktu yang lama serta proses inflamasi kronis menyebabkan parenkim hepar mengalami kerusakan yang *irreversible* (Martin-Sanz, P. et al, 2017). Hal ini yang menjadi dasar dari penelitian-penelitian mengenai bahan-bahan alam yang memiliki efek hepatoprotektor, salah satunya Teripang/*Sea Cucumber/Holothuria* (Kareh, M. et al, 2018).

Kareh et al (2018), dalam penelitiannya tentang efek anti

proliferasi dan anti inflamasi *Holothuria polii*, mengatakan bahwa *aquous fraction* dari teripang (*H.polii*) memiliki efek anti inflamasi dengan cara menurunkan regulasi mediator-mediator inflamasi seperti IL-6, MMP9, dan *Nitrit oxide* dikarenakan adanya kadar yang cukup tinggi dari *triterpene glycoside* atau yang lebih dikenal sebagai saponin. Informasi ini dapat digunakan untuk meneliti lebih jauh lagi efek anti inflamasi teripang melalui parameter mediator inflamasi lain, seperti COX-2.

METODE

Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit betina (*Mus musculus*), galur C57BL dengan jumlah 30 ekor yang diperoleh dari iRAT Co. Ukuran sampel untuk penelitian ini ditentukan dengan menggunakan perhitungan rumus besar sampel Mead's. Selanjutnya untuk kepentingan *blinding*, agar mencegah adanya bias dari peneliti, maka pengelompokan hewan coba dilakukan dengan metode rancangan acak sederhana. Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok, yang terdiri dari 3 kelompok perlakuan: P1, P2, P3 yang diberi pakan tinggi lemak, DMBA, dan EMT (ekstrak metanol teripang)/SCME (*sea cucumber methanol extract*) dengan dosis secara berurutan 0,33 g/KgBB ; 0,66 g/KgBB; 0,99 g/KgBB, Kelompok kontrol (+) adalah kelompok yang diberi pakan tinggi lemak dan DMBA, Kelompok kontrol (-) adalah kelompok yang diberi pakan standar dan DMBA. Masing-masing kelompok berjumlah total 6 ekor mencit setelah ditambahkan dengan Drop Out 10%.

Pengambilan Sampel

Pada hari terakhir penelitian, segera setelah semua perlakuan selesai, semua kelompok mencit percobaan diterminasi. Terminasi mencit percobaan dilakukan dengan cara memasukkan

hewan coba ke dalam tabung yang telah diisi *isoflurane* (obat anastesi). Dibawah pengaruh *isoflurane*, dalam keadaan mencit tidak sadar, dilakukan dislokasi servikal dan dekapitasi pada mencit percobaan. Selanjutnya mencit difiksasi untuk dilakukan tindakan pembedahan pada bagian abdomen. Setelah bagian abdomen dibuka, organ hepar hewan coba diambil. Organ hepar yang telah diambil lalu dimasukkan kedalam tabung *Eppendorf* yang telah diberi label untuk dibekukan di dalam *cooler box* berisi *liquid nitrogen*. Selanjutnya tabung *Eppendorf* disimpan dalam *refrigerator* -80°C sampai dilakukan pemeriksaan laboratorium.

Ekstraksi RNA Hepar

Ekstraksi mRNA dari hepar menggunakan prosedur dari GENEzolT. RNA total kemudian dikuantifikasi menggunakan *absorbance spectrophotometry* dengan panjang gelombang 268/280nm (M200 Pro, Tecan, Morrisville, NC). Selanjutnya, pada RNA yang telah di ekstraksi tersebut dilakukan pemeriksaan *Real time Reverse Transcriptase* PCR dengan menggunakan kit RT-PCR dengan alat PikoReal Real Time PCR System. Normalisasi hasil pita menggunakan *housekeeping gene* dari GAPDH. Visualisasi dan kuantifikasi pita produk PCR menggunakan perangkat lunak ImageJ. Primer yang digunakan:

COX-2 :
TGAGCAACTATTCCAAACCAGC
GCACGTAGTCTTCGATCACTATC
GAPDH :
TTGATGGCAACAATCTCCAC
CGTCCCGTAGACAAAATGGT

Pengolahan dan Analisis Data

Data kuantifikasi RNA dari seluruh kelompok hewan coba yang telah didapatkan kemudian diolah dan dianalisis dengan menggunakan ANOVA/Kruskal Wallis dan Post Hoc Test Tukey HSD/Mann Whitney.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Ekspresi Gen COX-2 Dinormalisasi dengan GAPDH

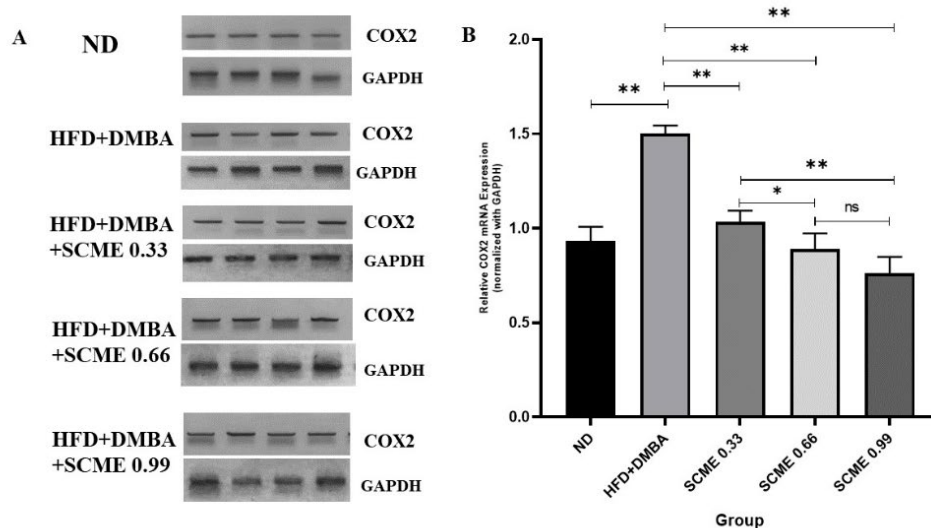
Kelompok Perlakuan	Ekspresi Gen COX-2	P
Normal Diet (N) → K (-)	0,931±0,07	
HFD+ DMBA → K (+)	1,501 ±0,043	
HFD+ DMBA+ EMT 0,33 (P1)	1,033±0,06	<0,001
HFD+ DMBA+ EMT 0,66 (P2)	0,889±0,083	
HFD+ DMBA+ EMT 0,99 (P3)	0,762±0,085	

Keterangan: HFD = High Fat Diet; EMT = ekstrak methanol teripang; P1 = kelompok perlakuan 1; P2 = kelompok perlakuan 2; P3: kelompok perlakuan 3.

Data pada tabel disajikan dalam bentuk Rerata ± SD dengan hasil P value ditentukan dengan uji ANOVA dengan signifikansi $P < 0.05$. Ekspresi gen COX-2 di tabel dinormalisasi dengan gen GAPDH. Pada ketiga kelompok perlakuan (P1, P2, P3) terlihat bahwa ekspresi gen COX-2 berbanding terbalik dengan konsentrasi SCME/EMT, dimana semakin tinggi konsentrasi SCME/EMT yang diberikan, memberikan

hasil ekspresi gen COX-2 yang semakin menurun. Penurunan ekspresi gen COX-2 ini dikatakan signifikan dikarenakan nilai $p < 0,001$.

Data yang tertera didalam tabel sebelumnya terkonfirmasi dengan uji Post Hoc yang memperlihatkan hasil bahwa ekspresi gen COX-2 pada kelompok P1 dan P2 memberikan hasil yang signifikan.



Gambar 1. Ekspresi gen COX-2

Keterangan : ND = pakan standar; SCME/EMT (sea cucumber methanol extract). A). Hasil elektroforesis COX-2 dan GAPDH, B) Histogram menunjukkan adanya perbedaan hasil uji Post Hoc yang menunjukkan * = Bermakna, ** dan * = Sangat Bermakna.**

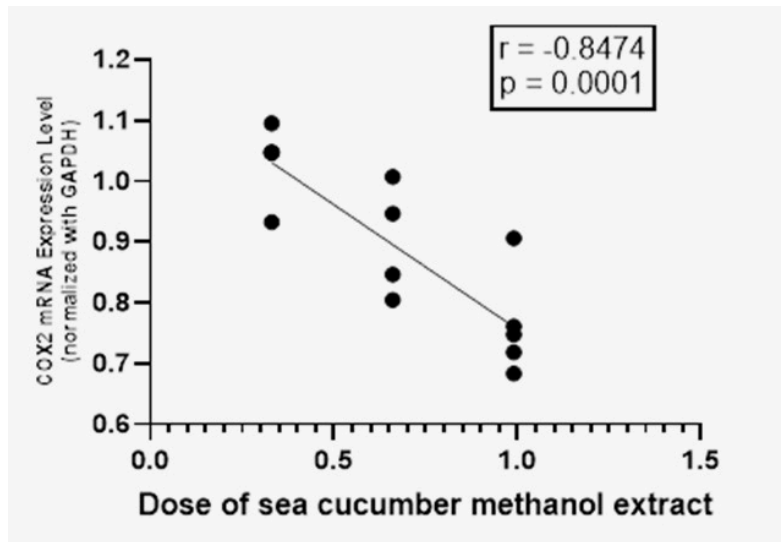
Menurunnya ekspresi gen COX-2 pada pemberian ekstrak metanol teripang menunjukkan efek anti inflamasi yang nyata pada percobaan ini. Kamyab et al, 2020, pada penelitiannya mengatakan bahwa *Holothuria scabra* memiliki berbagai

macam substansi biologis yang juga ditemukan pada agen biologis lain yang telah lebih dahulu digunakan sebagai analgetik alami pada kasus artritis karena intervensinya terhadap penurunan mediator-mediator inflamasi. Beberapa substansi tersebut adalah

glikosida triterpene, senyawa fenolik maupun saponin. Struktur kimia triterpene yang serupa dengan kortikosteroid terbukti memiliki efek yang serupa pula sebagai anti inflamasi (Kamyab E, et al, 2020).

Ekspresi Gen COX-2 Menurun Pada Peningkatan Konsentrasi EMT/SCME

Hasil uji korelasi Pearson yang terdapat pada Gambar 2 menunjukkan hasil berupa korelasi negatif serta berbeda secara bermakna. Dimana ekspresi gen COX-2 pada kelompok yang diberi SCME/EMT semakin menurun seiring dengan semakin tingginya konsentrasi ekstrak yang diberikan.



Gambar 2. Hasil Uji Korelasi Pearson Ekspresi Gen COX-2 Terhadap Konsentrasi EMT/SCME

KESIMPULAN

Berdasarkan data yang telah dipaparkan diatas, dimana dengan pemberian ekstrak metanol teripang pada model hewan coba yang diinduksi DMBA dan pakan tinggi lemak memberikan hasil berupa penurunan ekspresi gen COX-2 yang terbukti signifikan pada masing-masing kelompok perlakuan, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol teripang memiliki kemampuan sebagai anti inflamasi.

DAFTAR PUSTAKA

Adiwinata, R.; Kristianto, A. dkk. Tatalaksana terkini perlemakan hati non alkoholik: *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia* (2). 2015;53-59.
 Arora, R. et al. Hepatic Dysfunction Induced by 7, 12-Dimethylbenz(a)anthracene and Its Obviation with Erucin Using Enzymatic and Histological

Changes as Indicators : Plos One. 2014 (9);1-12
 Janakiram, N.B. et al. Sea Cucumbers Metabolites as Potent Anti-Cancer Agents : *Marine Drugs*. 2015;2909-2922
 Kamyab E., Kellermann M. Y., Kunzmann A., Schupp P. J., 2020 Chemical biodiversity and bioactivities of saponins in Echinodermata with an emphasis on sea cucumbers (Holothuroidea). In: *YOUARES 9 - The Oceans: our research, our future*. Jungblut AACL Bioflux, 2021, Volume 14, Issue 3. <http://www.bioflux.com.ro/aac1>
 1268 S., Liebich V., Bode-Dalby M. (eds), pp. 121-157, Proceedings of the 2018 conference for YOUng MARine RESEARCHer in Oldenburg, Springer International Publishing, Cham, Germany
 Kareh, M. et al. Anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the

- sea cucumber *Holothuria polii* aqueous extract: *SAGE Open Medicine*. 2018 (6);1-14.
- Martin-Sanz, P. *et al.* Cyclooxygenase 2 in liver dysfunction and carcinogenesis: Facts and perspectives. *World J Gastroenterology*. 2017;3572-3580.
- Monga, J. *et al.* Topical (+) catechin emulsified gel prevents DMBA/TPA-induced squamous cell carcinoma of the skin by modulating antioxidants and inflammatory biomarkers in BALB/c mice: *Royal Society of Chemistry*. 2014.
- Motino, O. *et al.* Cyclooxygenase-2 expression in hepatocytes attenuates non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in mice: *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016;1710-1723.
- Oliveira, K.; Avanzo, G. *et al.* Chemical carcinogenesis by DMBA (7,12-dimethylbenzanthracene) in female BALB/c mice: *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2015;125-133.
- Pangestuti, R.; Arifin, Z. Medicinal and health benefit effects of functional sea cucumbers: *Journal of Traditional and Complementary Medicine* (8). 2018;341-351.
- Wardhani, P. *et al.* Analisis Feritin Dan Ast To Platelet Ratio Index Sebagai Petanda Derajat Fibrosis Penyakit Hati Kronis: *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*. 2015;72-76