



**POTENSI EKSTRAK ETANOL BUNGA ROSELLA (*Hibiscus
sabdariffa* L.) SEBAGAI INHIBITOR MMP-2 DAN MMP-9
AKIBAT TOKSIN UBUR-UBUR (*Physalia utriculus*)
DENGAN METODE ZIMOGRAFI**

SKRIPSI

oleh :

**Melati Permata Devi
NIM 112010101051**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**POTENSI EKSTRAK ETANOL BUNGA ROSELLA (*Hibiscus
sabdarriffa* L.) SEBAGAI INHIBITOR MMP-2 DAN MMP-9
AKIBAT TOKSIN UBUR-UBUR (*Physalia utriculus*)
DENGAN METODE ZIMOGRAFI**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Pendidikan Dokter (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

oleh :

**Melati Permata Devi
NIM 112010101051**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah SWT, yang telah memberi limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga saya mendapat kesempatan untuk hidup dan menuntut ilmu, beserta Nabi Muhammad SAW yang menjadi tauladan dan memberikan pedoman dalam hidup saya;
2. Kedua orang tua, bapak Drs. Anton Mujihartono dan Dra. Fadriani Pramatha Devi serta kakak Rangga Tito Ananta Pratama, S.T yang telah memberikan doa, cinta, nasihat, kasih sayang, serta pengorbanan dalam mendidik, membesarkan, dan membimbing saya;
3. Guru-guru saya sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi, yang telah memberikan ilmu dan mencurahkan segala kemampuannya untuk membimbing saya;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTO

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Sesungguhnya bersama
kesulitan ada kemudahan.”
(terjemahan Surat Asy-syarh ayat 5-6)*)



*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2011. Al-Qur'an Tiga Bahasa. Depok: Gema Insani.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Melati Permata Devi

NIM : 112010101051

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Potensi Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) sebagai Inhibitor MMP-2 dan MMP-9 Akibat Toksin Ubur-ubur (*Physalia utriculus*) dengan Metode Zimografi” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 8 Juni 2018
Yang menyatakan,

Melati Permata Devi
NIM 112010101051

SKRIPSI

**POTENSI EKSTRAK ETANOL BUNGA ROSELLA (*Hibiscus
sabdariffa* L.) SEBAGAI INHIBITOR MMP-2 DAN MMP-9
AKIBAT TOKSIN UBUR-UBUR (*Physalia utriculus*)
DENGAN METODE ZIMOGRAFI**

Oleh

Melati Permata Devi

NIM 112010101051

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Al Munawir, M. Kes, Ph. D

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Ayu Munawaroh Aziz, M. Biomed

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Potensi Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) sebagai Inhibitor MMP-2 dan MMP-9 Akibat Toksin Ubur-ubur (*Physalia utriculus*) dengan Metode Zimografi” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Jumat, 8 Juni 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Penguji I

dr. Elly Nurus Sakinah, M. Si
NIP 19840916 200801 2 003

Penguji II

dr. Rena Normasari, M. Biomed
NIP 19830512 200812 2 002

Penguji III

dr. Al Munawir, M. Kes, Ph. D
NIP 19690901 199903 1 003

Penguji IV

dr. Ayu Munawaroh Aziz, M. Biomed.
NIP 19890313 201404 2 002

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dr. Enny Suswati, M. Kes
NIP 19700214 199903 2 001

RINGKASAN

“Potensi Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) sebagai Inhibitor MMP-2 dan MMP-9 Akibat Toksin Ubur-ubur (*Physalia utriculus*) dengan Metode Zimografi” Melati Permata Devi; 112010101051; 2018; 71 Halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Ubur – ubur merupakan salah satu hewan laut yang termasuk dalam filum *Cnidaria* (*Coelenterata*) yang memiliki *cnidoblast* berisi *nematocyst* yang mengandung toksin pada tentakelnya. Salah satu ubur-ubur yang memiliki *nematocyst* adalah *Physalia utriculus* yang dapat menimbulkan reaksi pada kulit berupa inflamasi ketika menyengat. Toksin pada ubur-ubur juga menyebabkan terganggunya transportasi ion Ca^{2+} dan Na^+ serta terlepasnya mediator inflamasi yang dapat mendegradasi matriks ekstraselular yaitu MMP-2 dan MMP-9 yang dapat mendegradasi komponen matriks ekstraselular kulit seperti gelatin, kolagen, dan elastin. Bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) telah terbukti mengandung flavonoid yang memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi dengan presentase penghambatan radang pada telapak kaki tikus yang diinduksi suspense karagenan 1% secara intraplantar sebesar 22,03; 31,48; dan 31,93 %.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa ekstra etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) berpotensi sebagai inhibitor MMP-2 dan MMP-9 akibat toksin ubur-ubur (*Physalia utriculus*).

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni secara *in vitro* dengan menggunakan 24 sampel berupa sumuran pada gel gelatin yang dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol normal, kelompok kontrol negatif, serta kelompok perlakuan P₁, P₂, P₃, dan P₄. Kelompok kontrol normal berisi aquades, kontrol negatif berisi toksin ubur-ubur 10 µg/ml, serta kelompok perlakuan P₁, P₂, P₃, dan P₄ yang berisi toksin ubur-ubur 10 µg/ml ditambah ekstrak etanol bunga rosella dengan dosis masing-masing 50, 100, 200, dan 250 µg/ml. Kemudian dilakukan uji aktivitas MMP-2 dan MMP-9 menggunakan metode gelatin zimografi yang hasilnya berupa densitas gel yang diukur menggunakan *software* Image J sebagai densitometer. Densitas gel yang telah terukur berupa *relative optical density* dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* dan uji *Post Hoc* menggunakan metode LSD untuk menentukan perbedaan bermakna dalam tiap perlakuan.

Hasil dari pengukuran rata-rata *relative optical density* MMP-2 dari kelompok Kn, K-, P₁, P₂, P₃, dan P₄ adalah 0; 1; 0.89; 0.78; 0.73; dan 0.51. Rata-rata *relative optical density* MMP-9 dari kelompok Kn, K-, P₁, P₂, P₃, dan P₄ masing-masing sebesar 0.16; 1; 0.80; 0.65; 0.54; dan 0.48. Hasil uji *One Way ANOVA* pada data MMP-2 dan MMP-9 diperoleh nilai yang berbeda secara signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Pada hasil uji LSD *relative optical density* MMP-2 terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol normal, kontrol negatif, dan kelompok perlakuan, kecuali pada

kelompok perlakuan P₂ dengan P₃ yang memiliki perbedaan tetapi tidak signifikan. Hasil uji LSD *relative optical density* MMP-9 terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, kecuali pada kelompok K- dengan P₁, kelompok P₁ dengan P₂, kelompok P₂ dengan P₃ dan P₄, kelompok P₃ dengan P₄ yang memiliki perbedaan tetapi tidak signifikan.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol bunga rosella berpotensi sebagai inhibitor MMP-2 dan MMP-9 akibat toksin ubur-ubur (*Physalia utriculus*) dengan menggunakan metode zimografi.



PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Potensi Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) sebagai Inhibitor MMP-2 dan MMP-9 Akibat Toksin Ubur-ubur (*Physalia utriculus*) dengan Metode Zimografi”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Al Munawir, M. Kes, Ph. D, selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU) dan dr. Ayu Munawaroh Aziz, M. Biomed, selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA) yang telah banyak membantu dan meluangkan waktu, pikiran serta perhatiannya untuk membimbing penulisan skripsi ini sejak awal hingga akhir;
3. dr. Cholis Abrori, M. Kes, M. Pd. Ked, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama studi di Fakultas Kedokteran Universitas Jember ini;
4. Dr. dr. Yunita Armiyanti, M. Kes, selaku koordinator KTI yang telah menyetujui penyusunan skripsi ini;
5. dr. Elly Nurus Sakinah, M. Si dan dr. Rena Normasari, M. Biomed sebagai dosen penguji yang banyak memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
6. Kedua orang tua saya, *my big boss* Drs. Anton Mujihartono dan ibu terbaikku Dra. Fadriani Pramatha Devi tercinta yang telah menjadi pendukung tiada henti serta sandaran dalam hidup, yang selalu memberikan banyak motivasi, nasihat, dan bimbingan, yang tiada lelah memberikan kasih sayang dan doa.

7. Kakakku Rangga Tito Ananta Pratama, S.T yang selalu memberikan motivasi dan doa untuk menyelesaikan tugas akhir ini;
8. Bapak dan ibu guru sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi. Pahlawan tanpa tanda jasa yang menorehkan tinta emas ilmu dalam diri saya. Penuntun jalan untuk mengenal dunia yang tanpa batas;
9. Sahabat-sahabat Febrina Sylva Fridayanti, Fajrina Muflihah Ahmad, Ratih Puspitasari, yang telah memberikan semangat dan motivasi;
10. Teman-teman angkatan 2011 yang selalu saling mendukung dan menjadi teman seperjuangan demi mendapatkan gelar sarjana kedokteran;
11. Teman-teman KKN 2014 Desa Mojogemi dan teman-teman angkatan lain yang telah memberi dukungan dan doa;
12. Semua pihak yang telah memberikan bantuan dan dukungan dalam penyusunan skripsi ini, yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi pembaca dan khususnya untuk perkembangan Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Jember, 8 Juni 2018

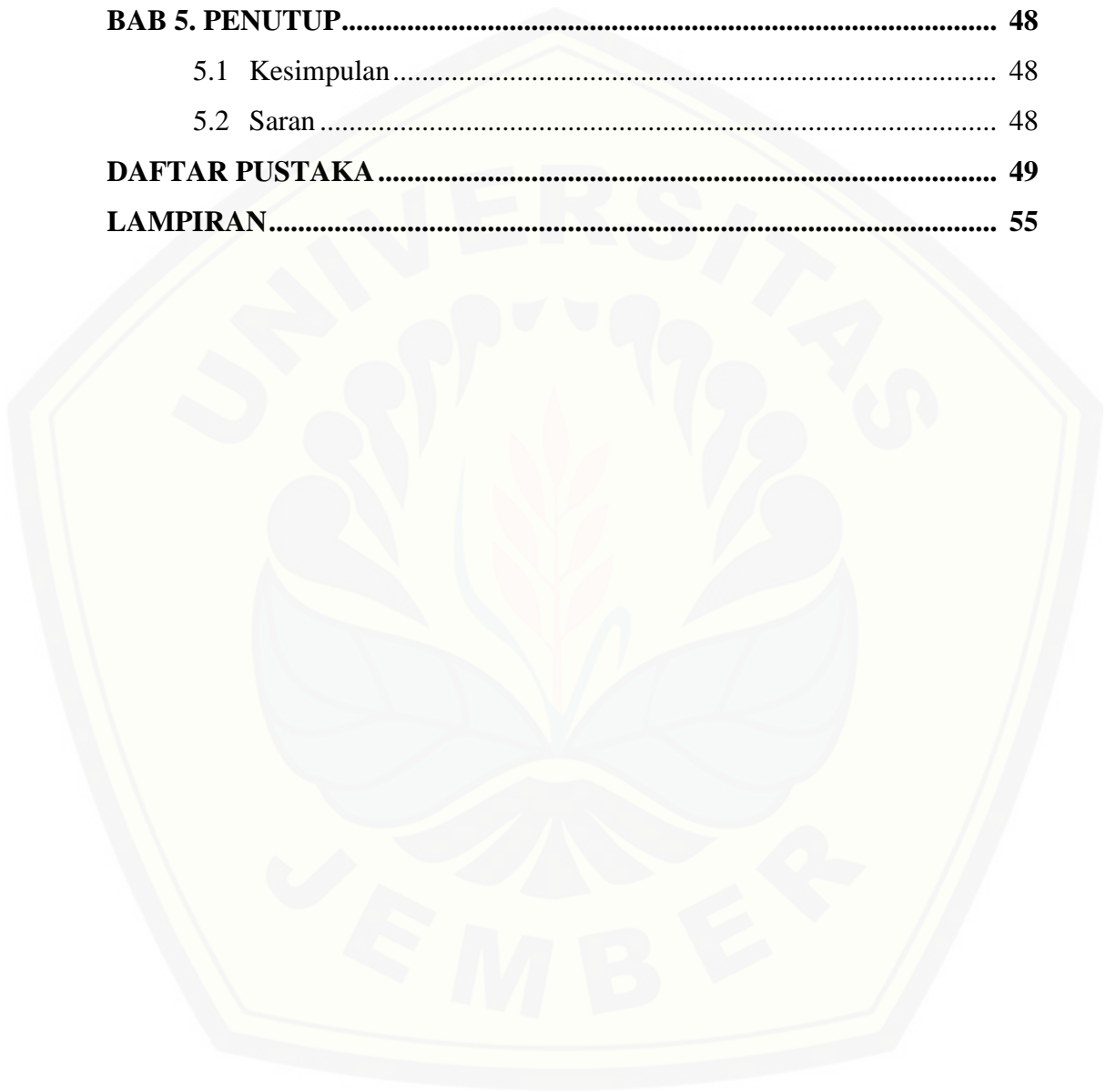
Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN BIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.4.1 Manfaat Ilmiah	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Ubur-ubur	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	5
2.1.2 Siklus Hidup	8
2.1.3 Mekanisme Sengatan Ubur-ubur	10
2.1.4 Efek Toksin Ubur-ubur	11
2.2 Ubur-ubur <i>Physalia utriculus</i>	12
2.2.1 Taksonomi dan Morfologi.....	13

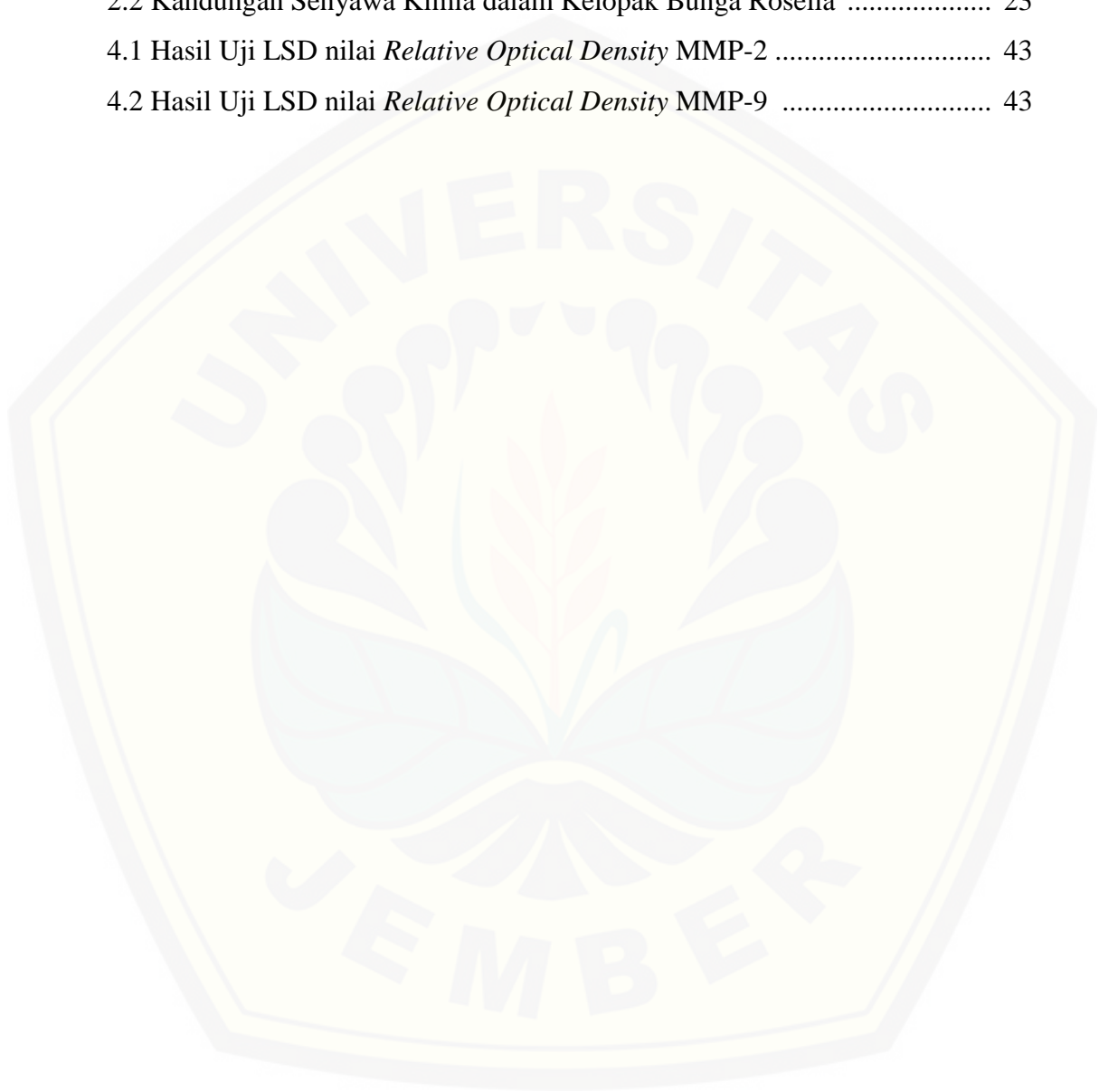
2.2.2	Kandungan Toksin dan Efek Sengatan Ubur-ubur <i>Physalia utriculus</i>	14
2.3	Inflamasi	15
2.4	Matriks Metalloproteinase	19
2.5	Rosella (<i>Hibiscus sabdariffa L.</i>).....	21
2.6	Kerangka Teori	25
2.7	Hipotesis Penelitian	26
BAB 3.	METODE PENELITIAN.....	27
3.1	Jenis Penelitian	27
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian.....	27
3.3	Sampel Penelitian	27
3.4	Rancangan Penelitian	28
3.5	Variabel Penelitian	29
3.6	Definisi Operasional	29
3.6.1	Ekstrak Etanol Bunga Rosella (<i>Hibiscus sabdariffa L.</i>)	29
3.6.2	Zimografi	29
3.6.3	<i>Bradford Protein Assay</i>	30
3.7	Bahan dan Alat Uji yang Digunakan.....	30
3.7.1	Bahan	30
3.7.2	Alat	30
3.8	Prosedur Penelitian	30
3.8.1	Ekstraksi Bunga Rosella (<i>Hibiscus sabdariffa L.</i>)	30
3.8.2	Persiapan Pengambilan dan Isolasi Toksin Ubur-ubur <i>Physalia utriculus</i>	31
3.8.3	Pengukuran Kadar Protein Toksin Ubur-ubur <i>Physalia utriculus</i>	33
3.8.4	Pemeriksaan Zimografi	34
3.9	Analisis Data.....	35
3.10	Alur Penelitian.....	35
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	37
4.1	Hasil dan Analisis	37

4.1.1	Kadar Protein Toksin Ubur-ubur	37
4.1.2	Uji Zimografi	38
4.1.3	Analisis Data.....	42
4.2	Pembahasan	44
BAB 5. PENUTUP.....		48
5.1	Kesimpulan.....	48
5.2	Saran	48
DAFTAR PUSTAKA		49
LAMPIRAN.....		55



DAFTAR TABEL

2.1 Kandungan Gizi Kelopak Bunga Rosella segar per 100 gram.....	23
2.2 Kandungan Senyawa Kimia dalam Kelopak Bunga Rosella	23
4.1 Hasil Uji LSD nilai <i>Relative Optical Density</i> MMP-2	43
4.2 Hasil Uji LSD nilai <i>Relative Optical Density</i> MMP-9	43

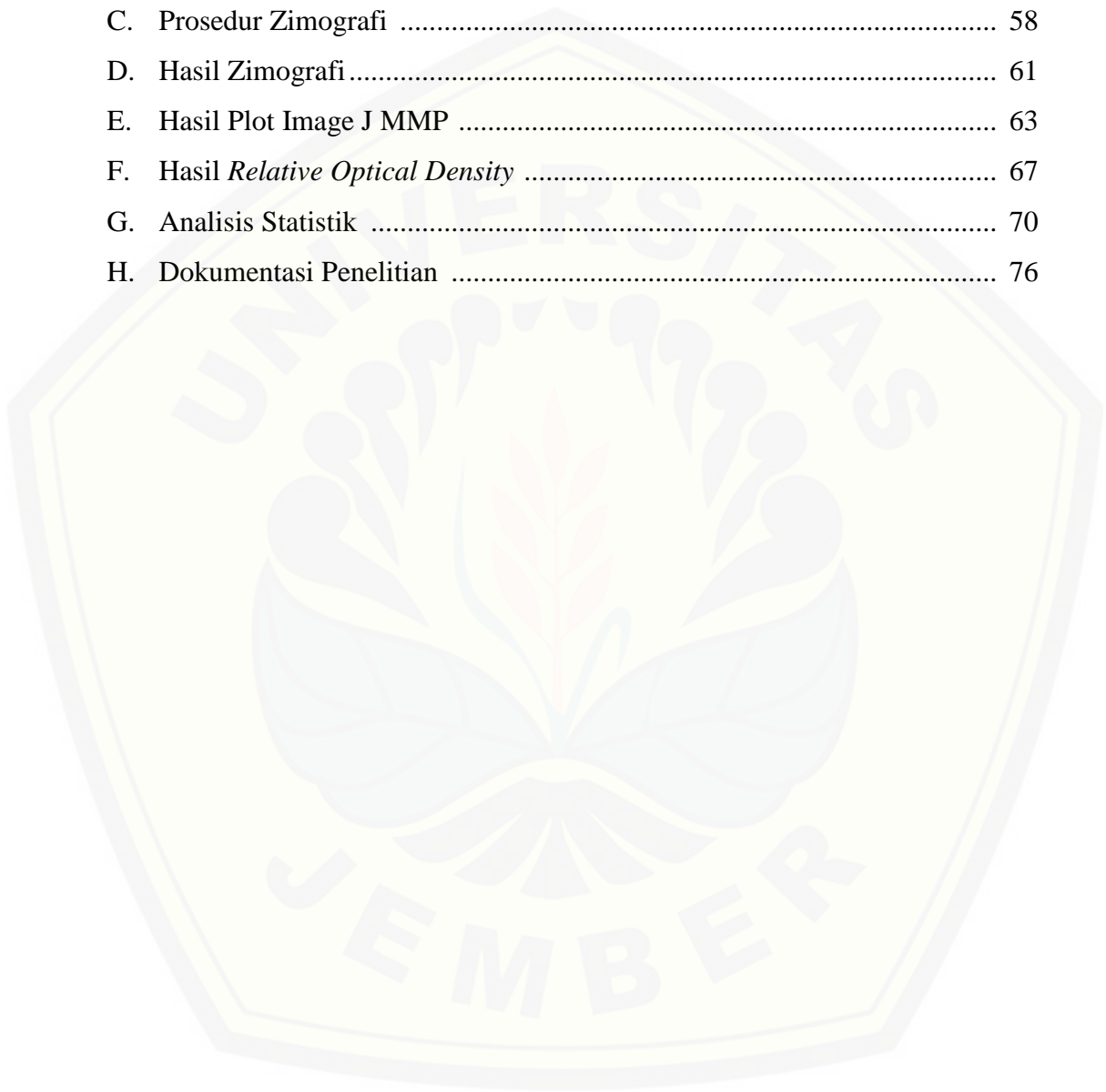


DAFTAR GAMBAR

2.1	Ubur-ubur	5
2.2	<i>Physalia utriculus</i>	6
2.3	<i>Cyanea</i>	6
2.4	<i>Phyllodiscus semoni</i>	7
2.5	<i>Box Jellyfish</i>	7
2.6	Siklus Hidup Ubur-ubur	9
2.7	Mekanisme Sengatan Ubur-ubur	11
2.8	<i>Physalia utriculus</i>	12
2.9	<i>Pneumatophore</i>	14
2.10	<i>Dactylozoid, Gastrozoid, dan Gonozoid</i>	14
2.11	Struktur Dasar Matriks Metalloproteinase (MMP)	20
2.12	Bunga Rosella	22
2.13	Kerangka Teori	25
3.1	Rancangan Penelitian.....	28
3.2	Skema Pembuatan Ekstrak Etanol Rosella.....	31
3.3	Skema Pengisolasian Toksin Ubur-ubur <i>Physalia utriculus</i>	32
3.4	Alur Penelitian dengan Zimografi	36
4.1	Kurva Standar Bovin Serum Albumin	37
4.2	Hasil Zimografi	39
4.3	Rata-rata <i>Relative Optical Density</i> MMP-2	40
4.4	Rata-rata <i>Relative Optical Density</i> MMP-9	41
4.5	Rata-rata kemampuan hambat ekstrak etanol bunga rosella terhadap aktivitas MMP-2 dan MMP-9.....	41

DAFTAR LAMPIRAN

A. Keterangan Persetujuan Etik	55
B. Hasil Absorbansi Protein Toksin Ubur-ubur <i>Physalia utriculus</i>	57
C. Prosedur Zimografi	58
D. Hasil Zimografi	61
E. Hasil Plot Image J MMP	63
F. Hasil <i>Relative Optical Density</i>	67
G. Analisis Statistik	70
H. Dokumentasi Penelitian	76



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ubur – ubur merupakan salah satu hewan laut yang termasuk dalam filum *Cnidaria* (*Coelenterata*). *Cnidaria* memiliki tentakel yang dapat menyebabkan sengatan listrik (nematosit) yang berfungsi sebagai pertahanan diri (Suling, 2011). Salah satu jenis ubur-ubur beracun yang sering ditemukan adalah *Physalia utriculus*. *Physalia utriculus* termasuk dalam filum Coelenterata kelas Hydrozoa yang memiliki nama lain *Portuguese Man-of-war* (Patten, 2006). *Physalia utriculus* dapat ditemukan di perairan Atlantik dan Mediterania, serta mudah dikenali karena bentuknya seperti kantong yang mengapung, translusen biru, merah muda atau keunguan dengan banyak tentakel. Pada tahun 2005-2013 terdapat 18 kasus sengatan ubur-ubur di perairan Indonesia dan 12 diantaranya merupakan kasus sengatan oleh *Physalia utriculus* (Mujiono, 2010; Surya online, 2013).

Pelepasan tentakel dari *Physalia utriculus* sangat berbahaya karena mengandung *cnidoblast* yang berisi *nematocyst*. *Nematocyst* dapat melakukan penetrasi pada dermis manusia. *Nematocyst* pada ubur-ubur *Physalia utriculus* memiliki toksin yang dapat menimbulkan berbagai efek ketika ubur-ubur menyengat (Nagai dan Nakajima, 2001). Toksin yang dihasilkan oleh *nematocyst* ubur-ubur merupakan campuran kompleks protein (Lane, 1958). Toksin ubur-ubur (*Physalia utriculus*) menyebabkan transportasi ion Ca^{2+} dan Na^{+} menjadi abnormal, mengacaukan membran sel, melepaskan mediator inflamasi, serta melepaskan kalium dari eritrosit yang dapat menyebabkan pecahnya eritrosit (Yanagihara, 2012). Sengatan dari ubur-ubur menyebabkan dua reaksi yang terjadi pada manusia. Reaksi tersebut dapat berupa reaksi lokal maupun sistemik (Xiao, 2011). Sengatan ubur-ubur juga dapat menyebabkan reaksi-reaksi pada kulit yang berupa dermatitis kontak alergi, reaksi hipersensitivitas tipe lambat dan menetap, granuloma anulare, eritemanodosum, dan inflamasi (Suling, 2011; Freitas, 1995; Nagai, 2003).

Inflamasi merupakan respon tubuh terhadap suatu infeksi yang melibatkan banyak mediator yang dapat bersifat lokal, sistemik, akut, dan kronis. Inflamasi akut adalah radang yang berlangsung relatif singkat, dari beberapa menit sampai beberapa hari, dan ditandai dengan perubahan vaskular, eksudasi cairan dan protein plasma serta akumulasi neutrofil yang menonjol. Inflamasi akut dapat berkembang menjadi suatu inflamasi kronis jika agen penyebab injuri masih tetap ada. Inflamasi kronis adalah respon proliferasif dimana terjadi proliferasi fibroblas, endothelium vaskuler, dan infiltrasi sel mononuklear (limfosit, sel plasma, dan makrofag) (Price dan Wilson, 2006). Menurut Suryana (2011) sel-sel inflamasi yang teraktivasi dapat mensekresi sitokin proinflamasi (IL-1, TNF, IL-6) yang dapat meningkatkan degradasi matriks (MMPs).

Enzim matriks metalloproteinase (MMP) merupakan enzim proteolitik yang memiliki kemampuan mendegradasi matriks ekstraseluler. MMP diproduksi dalam bentuk inaktif (pro-MMP) yang membutuhkan aktivasi enzim dengan cara berikatan dengan ion Ca^{2+} dan Zn^{2+} yang berperan sebagai kofaktor lain (Bruschi dan Pinto, 2013). Toksin ubur-ubur yang menyebabkan transport ion Ca^{2+} abnormal diduga dapat mengaktivasi pro-MMP menjadi MMP. Terlepasnya mediator inflamasi serta aktivasi MMP dapat meningkatkan degradasi matriks ekstraseluler. MMP-2 dan MMP-9 merupakan MMP yang mendegradasi komponen matriks ekstraseluler kulit seperti kolagen, gelatin dan elastin. Oleh sebab itu, enzim MMP-2 dan MMP-9 diduga memiliki peran dalam proses inflamasi akibat toksin ubur-ubur (Setianto et al., 2011; Whittaker dan Ayscough, 2001). Ekspresi MMP dapat dianalisis dengan beberapa metode seperti metode gelatin zimografi, imunoblotting, dan ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Metode yang banyak digunakan adalah substrat zimografi yang mengidentifikasi MMP dengan degradasi dari substrat dan berat molekulnya. Untuk mendeteksi gelatinase, MMP-2 dan MMP-9 digunakan gelatin zimografi (Beurden *et al*, 2005). Metode gelatin zimografi dapat mengukur aktivitas dari MMP yang spesifik serta cukup sensitif dan bersifat semi kuantitatif dalam mendeteksi MMP-2 dan MMP-9 (Hu dan Beeton, 2010).

Bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) saat ini menjadi tanaman obat yang menjadi begitu populer. Nilai gizi dan kandungan kimia dari rosella diantaranya adalah vitamin C, vitamin A, dan 18 jenis asam amino yang diperlukan tubuh, protein, karbohidrat, tiamin, kalsium, antosianin, niacin, flavonoid, alkaloid dan asam stearat. Antosianin merupakan salah satu jenis flavonoid yang dapat membantu mencegah stroke, menghambat perkembangan tumor, antikanker, serta sebagai antiinflamasi (Susilowati, 2009). Antosianin, flavonoid, dan polyphenol merupakan zat kardioprotektif pencegah penyakit kardiovaskular yang terdapat dalam kelopak bunga rosella (Maryani dan Kristiana, 2005). Kelopak bunga rosella dengan dosis 102, 205, dan 410 mg/ 200 g bb tikus memiliki aktivitas antiinflamasi dengan presentase penghambatan radang pada telapak kaki tikus yang diinduksi suspensi karagenan 1% secara intraplantar sebesar 22,03; 31,48; dan 31,93 % secara berturut-turut (Saptarini *et al*, 2012).

Berdasarkan uraian di atas, peneliti bermaksud ingin mengetahui potensi ekstrak etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) sebagai inhibitor MMP-2 dan MMP-9 akibat toksin ubur-ubur (*Physalia utriculus*) dengan menggunakan metode zimografi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas, permasalahan yang dapat dirumuskan adalah apakah ekstrak etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) berpotensi sebagai inhibitor MMP-2 dan MMP-9 akibat toksin ubur-ubur (*Physalia utriculus*) dengan menggunakan metode zimografi ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui potensi ekstrak etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) sebagai inhibitor MMP-2 dan MMP-9 akibat toksin ubur-ubur (*Physalia utriculus*) dengan menggunakan metode zimografi.

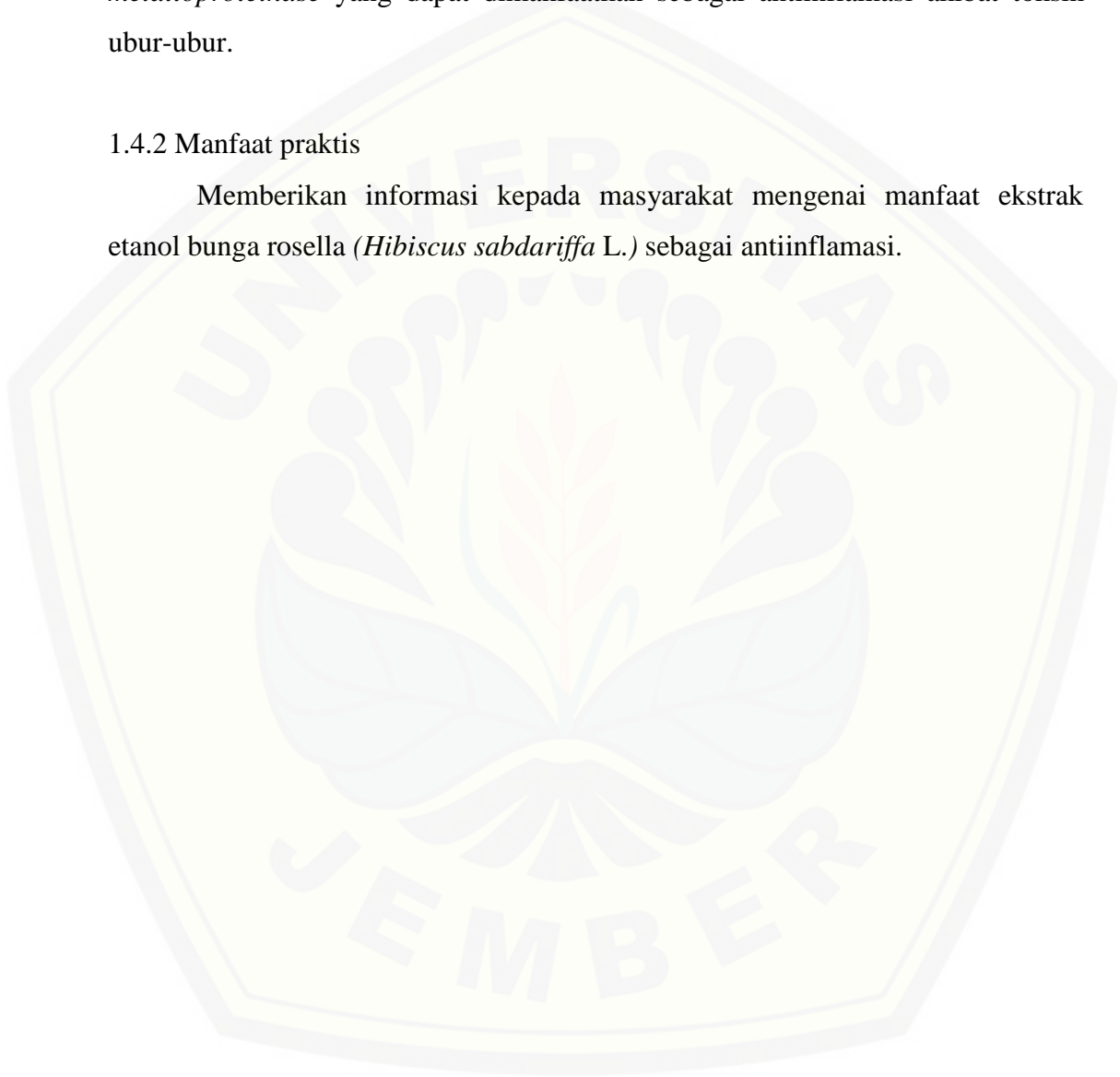
1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat ilmiah

Sebagai bahan informasi penelitian lebih lanjut mengenai potensi ekstrak etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) sebagai inhibitor *matrix metalloproteinase* yang dapat dimanfaatkan sebagai antiinflamasi akibat toksin ubur-ubur.

1.4.2 Manfaat praktis

Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai manfaat ekstrak etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) sebagai antiinflamasi.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ubur-Ubur

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi



Gambar 2.1 Ubur-ubur (Whitaker *et al.*, 2005)

Ubur-ubur atau scyphozoa merupakan *Coelenterata* yang hidup di laut baik dalam bentuk polip yang melekat di dasar ataupun yang berenang bebas dalam bentuk medusa. Ubur-ubur memiliki tubuh bergelatin mirip agar-agar, berbentuk bulat, memiliki kandungan air hingga 95%, serta mempunyai tentakel yang berisi *nematocyst* (Mujiono, 2010).. *Nematocyst* adalah tubulus tipis dengan duri kecil yang dilapisi *cnidoblast* pada tentakel yang memiliki fungsi untuk memasukkan toksin ke dalam tubuh korban sebagai bentuk pertahanan diri (Mujiono, 2010; Suling, 2011). Toksin *nematocyst* mengandung senyawa yang dapat menimbulkan efek neurotoksik dan reaksi kulit yang parah (Mujiono, 2010).

Ubur-ubur dapat ditemukan di seluruh lautan dunia karena memiliki kemampuan untuk bertahan dalam berbagai macam suhu dan salinitas. Kebanyakan ubur-ubur hidup di daerah pantai terutama perairan tropis dan subtropis seperti Cina, Malaysia, Filipina, Australia, dan Indonesia karena banyak ditemui zooplankton yang merupakan makanan utamanya di perairan negara-negara tersebut (Whitaker *et al.*, 2005). Beberapa kelas dalam filum *Coelenterata*, yaitu :

- a. Hydrozoa, merupakan *Coelenterata* dengan ukuran kecil yang tidak mencolok, dapat hidup secara soliter maupun koloni, dan dapat berbentuk

polip dan medusa. *Hydrozoa* terdiri atas genus *Physalia* dan *hydroid coral*. Genus *Physalia* mempunyai dua spesies yaitu *Physalia physalis* dan *Physalia utriculus*.



Gambar 2.2 *Physalia utriculus* (Whitaker *et al.*, 2005)

- b. Scyphozoa, memiliki bentuk tubuh seperti mangkuk, soliter, memiliki bentuk dominan berupa medusa yang lebih besar dari kelas *hydrozoa*, dan hidup pada dasar perairan laut. Contoh dari scyphozoan adalah *Aurelia aurita*, *Chrysaora colorata*, dan *Cyanea*.



Gambar 2.3 *Cyanea* (Whitaker *et al.*, 2005)

- c. Anthozoa, memiliki bentuk seperti bunga dengan warna yang beraneka ragam, hidup di laut, koloni maupun soliter, memiliki bentuk tubuh polip dan tanpa medusa. Anthozoa meliputi anemon laut, koral batu, koral tanduk, bulu laut atau pena laut. Salah satu spesiesnya adalah *Phyllodiscus semoni* (Mujiono, 2010).



Gambar 2.4 *Phyllodiscus semoni* (Hoeksema dan Crowther, 2011)

- d. Cubozoa, adalah salah satu kelas dalam *Cnidaria* yang paling beracun. Salah satu contohnya yaitu *box jellyfish*. Racun yang terdapat dalam kelas ini bersifat mematikan (Cheng *et al.*, 2007; Mujiono, 2010).



Gambar 2.5 *Box jellyfish* (Brinkman *et al.*, 2009)

Ubur-ubur memiliki banyak jenis spesies dengan berbagai bentuk, ukuran, dan warna tetapi ubur-ubur mempunyai bentuk morfologi yang mirip. Struktur dari ubur-ubur yaitu simetri secara radial ini menguntungkan karena dapat membantu ubur-ubur dalam mendeteksi adanya makanan dan merespon terhadap bahaya dari berbagai arah. Ubur-ubur memiliki susunan saraf yang primitif dengan sel saraf yang tidak terpusat, berupa jala tidak beraturan yang terdapat paling banyak pada epidermis tentakel dan daerah mulut. Sistem saraf ubur-ubur mengandung reseptor untuk mendeteksi cahaya, bau, dan stimulus lainnya, serta untuk mengkoordinasi respon dengan cepat dan tepat (Whitaker *et al.*, 2005).

Dinding tubuh ubur-ubur terdiri atas lapisan luar yaitu epidermis atau ektodermis yang melapisi permukaan luar tubuh, lapisan dalam yaitu gastrodermis yang melapisi bagian usus, dan *middle jelly* yaitu mesogleia merupakan lapisan tipis elastik yang terletak diantara epidermis dan gastrodermis. Struktur lainnya yakni terdapat empat sampai delapan *oral arms* di dekat mulutnya yang berfungsi membawa makanan dari tentakel ke mulutnya (Whitaker *et al.*, 2005). Ubur-ubur juga memiliki *cnidocyte* yaitu sel penyengat yang berisi kapsul *nematocyst* yang terletak di hampir seluruh bagian epidermis tentakel maupun yang berada di sekitar mulut (Suwignyo, 1989; Wiratmini *et al.*, 2008). Fungsi *nematocyst* adalah sebagai alat pelindung untuk melumpuhkan musuh atau mangsanya (Yanagihara, 2002; Suling, 2011).

Ubur-ubur mempunyai dua jenis pergerakan yaitu pergerakan horizontal dan pergerakan vertikal. Pergerakan horizontal adalah ubur-ubur bergantung pada keadaan ombak dan angin di dalam habitatnya, sedangkan pergerakan vertikal adalah hasil dari kontraksi bagian medusa secara ritmis yang menyebabkan air dalam rongga medusa terdorong keluar (Whitaker *et al.*, 2005).

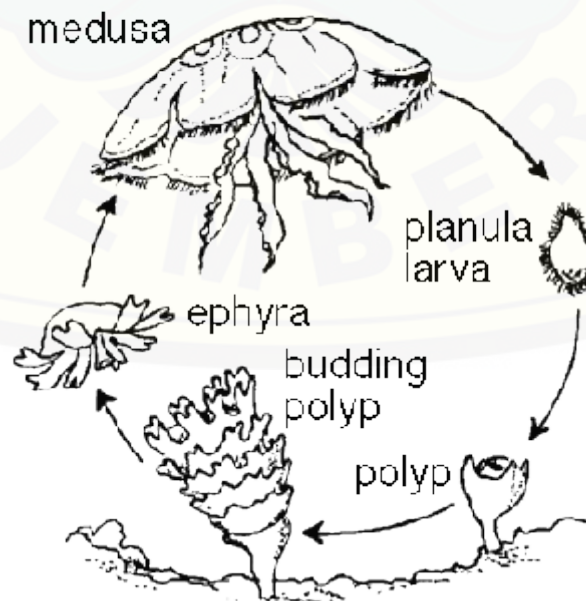
2.1.2 Siklus Hidup

Ubur-ubur bereproduksi secara seksual dan aseksual. Organ reproduksi terletak dalam gastrodermis. Siklus seksual yaitu medusa yang berbentuk seperti lonceng atau payung, mempunyai mesogleia tebal, bagian konveks menghadap ke atas dan mulut terletak di tengah bagian konkaf yang menghadap ke bawah. Siklus aseksual merupakan bentukan polip yang berbentuk silinder dengan bagian mulut

mengandung tentakel yang menghadap ke atas dan ujung lainnya melekat pada substrat, bentukan polip tersebut memiliki lapisan mesoglea yang tipis (Suwignyo, 1989).

Proses reproduksinya, ubur-ubur jantan mengeluarkan sperma ke air, sperma masuk ke dalam mulut betina dan terjadi fertilisasi. Pembelahan menghasilkan *blastula* berlekuk, kemudian menjadi larva *planula*. *Planula* keluar dari tubuh betina ke air. Setelah berenang bebas, *planula* menempelkan tubuhnya pada karang di dasar laut dan tumbuh menjadi larva polip yang disebut *scyphistoma*. *Scyphistoma* dapat memperbanyak diri dengan reproduksi aseksual atau budding. Medusa terbentuk dari pembelahan transversal ujung oral *scyphistoma*, disebut strobilisasi, kemudian terbentuk setumpuk medusa muda yang disebut epifera. Medusa muda melepaskan diri dan berenang bebas. *Scyphistoma* akan tumbuh menjadi polip lagi untuk kemudian membentuk epifera pada tahun berikutnya setelah proses strobilisasi selesai seperti pada Gambar 2.6. Epifera yang terbentuk pada musim dingin akan menjadi medusa dewasa yang bereproduksi secara seksual pada musim semi atau musim panas berikutnya (Whitaker *et al.*, 2005).

Jellyfish Life Cycle



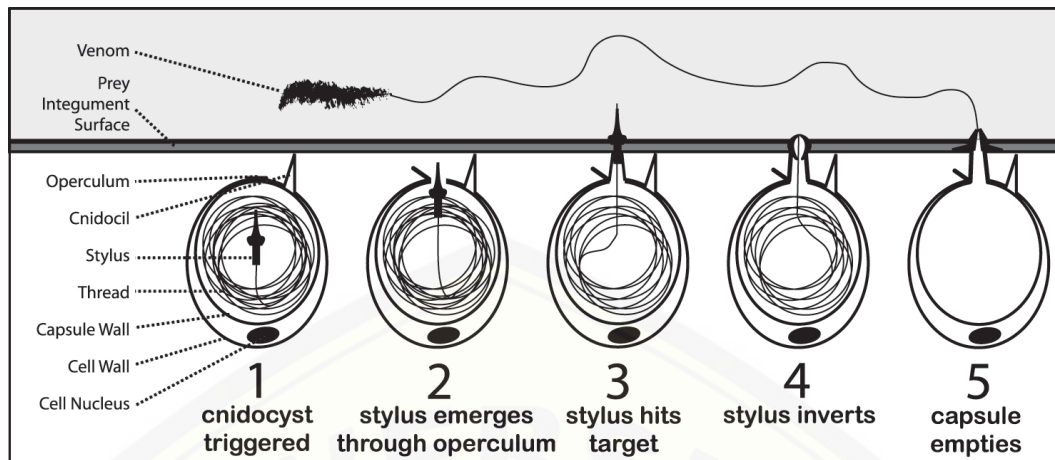
Gambar 2.6 Siklus hidup ubur-ubur (Whitaker *et al.*, 2005)

2.1.3 Mekanisme Sengatan Ubur-Ubur

Ubur-ubur memiliki kavitas gastrovaskular tunggal dan satu set tentakel. Kavitas gastrovaskular tunggal berguna untuk pencernaan dan sirkulasi. Tentakel dilapisi oleh deretan alat penyengat khusus (*nematocyst*). *Nematocyst* berada di dalam *cnidoblast* atau kapsul luar. Pada permukaan luar *cnidoblast* terdapat *cnidocil* (*trigger point*) yang dapat dirangsang dengan stimulus mekanik atau kimia yang jika terdapat rangsangan berupa kontak dengan objek sasaran, maka gulungan benang yang mengandung toksin dapat ditembakkan. Di dalam rongga *cnidoblast*, terdapat *denticles* yang digunakan untuk menguraikan gulungan benang sehingga dapat memanjang hingga menembus kulit dermis manusia (Cheng *et al.*, 2007; Suwignyo, 1989; Whitaker *et al.*, 2005).

Stimulasi mekanik dan kimia yang mengenai titik rangsangan berada di *cnidoblast* akan membentuk sinyal untuk membuka penutup *nematocyst* dan mengeluarkan toksin. Proses ini menggunakan tekanan internal yang tinggi sehingga menyebabkan ejeksi dalam waktu cepat. *Nematocyst* mampu melakukan penetrasi dengan kecepatan diatas 15 m/s dan kedalaman mencapai 0,9 mm. Toksin yang telah masuk ke dalam mikrovaskular dermis akan diabsorpsi ke dalam sirkulasi sistemik kemudian toksin menyebar ke seluruh tubuh mangsa secara hematogen. Setelah mangsa tersengat, *nematocyst* akan beregenerasi melalui differensiasi sel pluripoten (Cheng *et al.*, 2007).

Proses sengatan ubur-ubur diawali dengan adanya stimulasi dari kulit yang menginisiasi pelepasan *nematocyst*. Setelah itu akan terjadi peningkatan tekanan internal ubur-ubur yang diikuti dengan masuknya *nematocyst* ke dalam kulit, diikuti dengan pelepasan toksin ke dalam terowongan integumen mangsa (Oppegard *et al.*, 2009).



Gambar 2.7 Mekanisme sengatan ubur-ubur (Oppegard *et al.*, 2009)

2.1.4 Efek Toksin Ubur-Ubur

Toksin ubur-ubur dapat mengakibatkan terjadinya berbagai macam gejala, mulai dari gejala lokal, gejala sistemik sampai akhirnya dapat menyebabkan kematian. Gejala lokal yang dapat terjadi seperti rasa gatal kemudian rasa terbakar di tempat sengatan ubur-ubur (Mujiono, 2010). Toksin ubur-ubur juga dapat menyebabkan nyeri yang biasanya disertai *eritematous rush* dan dalam 2-24 jam atau lebih akan timbul menjadi *vesikel eritematous*. Gejala sistemik yang dapat terjadi misalnya seperti mual, muntah, pusing, spasme otot, paralisis, hipotensi, hingga terjadi *distress pernafasan* (Junior, 2010). Sesak nafas yang terjadi menunjukkan bahwa toksin ubur-ubur menyerang sistem pernafasan yang dapat menyebabkan *distress pernafasan* yang berujung kematian. Toksin ubur-ubur juga menyebabkan pola nafas menjadi cepat dan dalam, kemudian nafas akan melemah dan disertai kegagalan pernafasan (Xiao *et al.*, 2011).

Pada beberapa penelitian yang telah dilakukan pada hewan coba seperti kelinci, tikus, dan mencit menunjukkan bahwa injeksi toksin ubur-ubur menyebabkan kematian dalam hitungan menit. Kegagalan pernafasan merupakan bentuk gejala terminal dan didapatkan pula tanda adanya kardiotosisitas (Turner dan Freeman, 1969). Efek toksin ubur-ubur juga dapat mempengaruhi terjadinya perubahan histopatologi otot jantung pada hewan coba yang menggunakan tikus Wistar (Wahyuningrum, 2013).

2.2 Ubur-Ubur *Physalia utriculus*



Gambar 2.8 *Physalia utriculus* (Junior, 2010)

Physalia utriculus atau ubur-ubur api merupakan ubur-ubur yang sengatannya dapat menimbulkan rasa panas dan menyebabkan kulit manusia melepuh seperti luka bakar. *Physalia utriculus* mempunyai gelembung yang mengapung di atas permukaan air dan berfungsi sebagai layar yang dapat menghanyutkan ubur-ubur tersebut oleh tiupan angin (Whitaker, 2005).

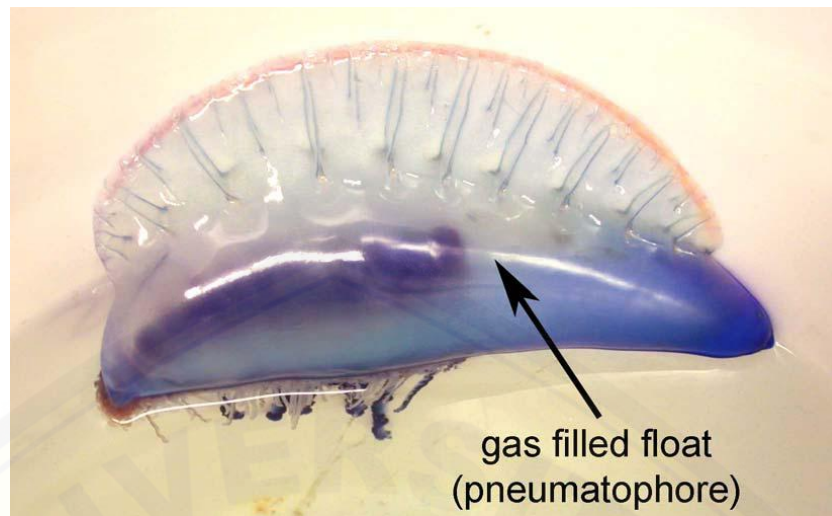
Physalia utriculus merupakan anggota filum *Cnidaria*, bentuknya mirip dengan ubur-ubur lainnya terdiri atas medusa dan polip. Namun, *Physalia utriculus* bukan termasuk ubur-ubur yang sebenarnya atau *true jellyfish*. *Physalia utriculus* merupakan hewan yang terdiri atas banyak organisme yang fungsinya masing-masing sehingga tidak dapat hidup sendiri. Nama lain dari *Physalia utriculus* yakni *Portuguese man-of-war* (King, Tanpa Tahun).

2.2.1 Taksonomi dan Morfologi

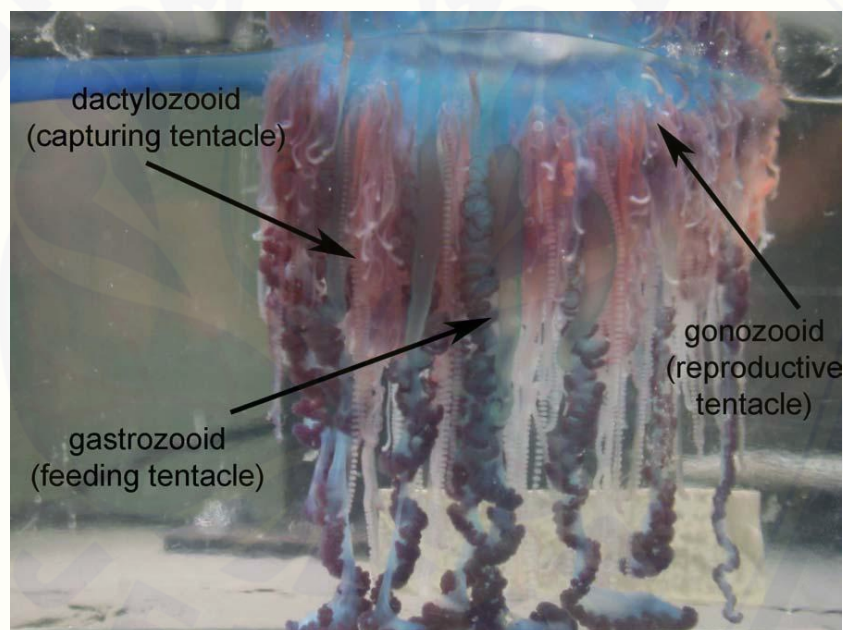
Klasifikasi *Physalia utriculus* menurut King (tanpa tahun), *Southeastern Regional taxonomic Centre* :

Kingdom : Animalia
Filum : Cnidaria
Kelas : Hydrozoa
Ordo : Siphonophora
Subordo : Rhizophysaliae
Famili : Physaliidae
Genus : *Physalia*
Spesies : *Physalia utriculus*

Warna *Physalia utriculus* yaitu biru transparan, merah muda atau keunguan dan memiliki banyak tentakel. Tubuh *Physalia utriculus* mempunyai empat bagian utama, yakni *pneumatophore*, *gastrozoid*, *dactylozoid*, dan *gonozoid* (King, tanpa tahun). *Pneumatophore* merupakan bagian besar yang terisi udara untuk mengapung, dapat dilihat pada (Gambar 2.9), dijumpai pada permukaan lautan, dan warnanya translusen dengan sedikit berwarna merah muda, ungu atau biru. *Dactylozoids* membentuk umbai-umbai tentakel yang panjang untuk menangkap mangsa. *Gastrozoids* bertugas mencerna makanan dan *gonozoids* bertugas untuk reproduksi. *Dactylozoids*, *gastrozoids*, dan *gonozoids* dapat dilihat pada Gambar 2.4. *Physalia utriculus* hanya memiliki satu tentakel utama dengan panjang lebih dari 10 meter serta memiliki beberapa tentakel pendek lainnya (Mujiono, 2010).



Gambar 2.9 *Pneumatophore* (King, Tanpa Tahun)



Gambar 2.10 *Dactylozoid, gastrozoid, dan gonozoid* (King, Tanpa Tahun)

2.2.2 Kandungan Toksin dan Efek Sengatan Ubur-Ubur *Physalia utriculus*

Toksin ubur-ubur (*Physalia utriculus*) berupa cairan dengan konsistensi kental, lipofilik, dan mengandung polipeptida yang dapat menimbulkan efek neurotoksik dan reaksi kulit yang parah pada manusia. Toksin tersebut masuk ke dalam tubuh melalui cara difusi (Junior, 2010). Pada toksin ubur-ubur terdapat campuran senyawa kompleks terdiri atas *bradikinin*, *hemolysin*, *serotonin*,

histamine, prostaglandin, adenosine triphosphatase, nucleotidas, fibrinolysin, RNase, DNase, dermatoneurotoksin, kardiotoxin, neurotoksin, nefrotoksin, miotoksin, dan protein antigen (Lane dan Dodge, 1958).

Toksin ubur-ubur (*Physalia utriculus*) menyebabkan transportasi ion Ca^{2+} dan Na^+ menjadi abnormal, mengacaukan membran sel, melepaskan mediator inflamasi, dan bekerja langsung sebagai racun pada miokardium, jaringan saraf, hepar dan ginjal (Cheng *et al.*, 2007). Toksin ini juga menyebabkan pelepasan kalium dari eritrosit dalam lima menit kemudian dilanjutkan dengan terjadi pecahnya eritrosit dalam dua puluh menit berikutnya setelah toksin masuk ke dalam pembuluh darah (Yanagihara, 2012).

Toksin *Physalia utriculus* menyebabkan berbagai gejala baik gejala lokal maupun gejala sistemik. Gejala lokal berupa lesi seperti eritema, pruritus, nyeri, bengkak, dan parastesi. Gejala sistemik dapat muncul ketika terpapar toksin ubur-ubur *Physalia utriculus* dalam dosis besar, berupa nyeri kepala, mual, lakrimasi, *nasal discharge*, vertigo, dan bisa mengarah ke syok anafilaktik (Alam dan Qasim, 1991). Daerah yang kontak dengan *nematocyst Physalia utriculus* akan timbul papul dan disekitarnya terdapat zona eritema. Papul akan berkembang dan membesar dengan cepat disertai dengan nyeri dan sensasi rasa terbakar. Otot akan mengalami spasme dan kram yang timbul beberapa jam setelah *injury* (Alam dan Qasim, 1991). Sengatan yang lebih parah bisa menyebabkan terjadinya nekrosis kulit dalam dua puluh empat jam setelah masuknya toksin, yang dapat hilang dalam waktu 2 minggu atau menetap (Cegolon *et al.*, 2013).

2.3 Inflamasi

Inflamasi adalah respon perlindungan terlokalisasi yang ditimbulkan oleh cedera atau kerusakan jaringan yang berfungsi menghancurkan, mengurangi, maupun mengurung (sekuestrasi) baik agen pencedera maupun jaringan yang cedera (Dorland, 2010). Menurut Robbins dan Kumar (2007), inflamasi adalah suatu respon protektif yang ditujukan untuk menghilangkan penyebab awal jejas sel serta membuang sel dan jaringan nekrotik yang diakibatkan oleh kerusakan sel.

Inflamasi dapat berupa akut dan kronik. Inflamasi akut biasanya beronset cepat dan durasinya pendek, berakhir dalam hitungan menit atau paling lambat beberapa hari, dan ditandai dengan cairan dan protein plasma eksudasi serta didominasi oleh akumulasi leukosit neutrofil. Menurut Dorland (2010), tanda kardinal yang muncul akibat adanya inflamasi akut meliputi sakit (dolor), panas (kalor), kemerahan (rubor), pembengkakan (tumor), dan berkurangnya fungsi (functiolaesa). Inflamasi kronik dapat lebih berbahaya dengan durasi yang panjang ditandai dengan perjalanan limfosit dan makrofag dengan keterkaitannya dengan proliferasi pembuluh darah dan fibrosis. Inflamasi kronik dapat terjadi sebagai lanjutan dari inflamasi akut yang dapat menyebabkan kerusakan yang permanen (Dorland, 2010). Inflamasi dapat disebabkan karena rangsangan fisik, kimiawi, biologi (infeksi akibat mikroorganisme atau parasit), dan kombinasi ketiga agen tersebut (Mutschler, 1991).

Inflamasi akut merupakan respon cepat dan segera terhadap cedera dengan mengirimkan leukosit ke daerah jejas. Leukosit berfungsi sebagai pembersih mikroba yang menginvasi serta memulai proses pembongkaran jaringan nekrotik. Perubahan penampang dan struktural dari pembuluh darah serta adanya emigrasi leukosit merupakan komponen utama dalam proses inflamasi akut (Robbins dan Kumar, 2007). Proses mekanisme inflamasi akut sebagai berikut :

- a. Setelah jejas, terjadi dilatasi arteriol lokal yang mengakibatkan aliran darah meningkat. Sfingter prakapiler membuka dengan akibat aliran darah dalam kapiler yang telah berfungsi meningkat dan juga dibukanya anyaman kapiler yang sebelumnya inaktif. Akibatnya anyaman venular pasca kapiler melebar dan diisi darah yang mengalir deras. Mikrovaskular pada lokasi jejas melebar dan berisi darah terbencong (Robbins dan Kumar, 2007).
- b. Eksudasi yang merupakan reaksi dari inflamasi akut diakibatkan karena peningkatan permeabilitas vaskuler serta keluarnya protein plasma dan sel-sel darah putih ke dalam jaringan (Robbins dan Kumar, 2007).
- c. Pada ujung arteriol kapiler terjadi tekanan hidrostatis tinggi yang mendesak cairan keluar menuju jaringan interstisial sehingga

mengakibatkan terjadinya peningkatan konsentrasi protein plasma serta tekanan osmotik koloid meningkat (Robbins dan Kumar, 2007).

- d. Aspek terpenting dalam reaksi radang berupa penimbunan sel-sel darah putih seperti neutrofil yang mendominasi pada awal pembentukan eksudat dan monosit pada daerah jejas (Robbins dan Kumar, 2007).
- e. Bendungan awal dari sirkulasi mikro akan menyebabkan sel-sel darah merah menggumpal dan membentuk agregat-agregat yang lebih besar daripada leukosit sendiri. Sel darah merah akan terdapat di bagian tengah dalam aliran aksial dan sel-sel darah putih pindah ke bagian tepi. Mula-mula sel darah putih bergerak dan menggulung pelan-pelan sepanjang permukaan endotel pada aliran yang tersendat tetapi kemudian sel-sel tersebut akan melekat dan melapisi permukaan endotel (Robbins dan Kumar, 2007).
- f. Migrasi sel-sel darah putih menuju lokasi jejas yang dipengaruhi oleh pengaruh kimia yang dapat berdifusi disebut kemotaksis. Neutrofil dan monosit paling reaktif terhadap rangsang kemotaksis, sedangkan limfosit bereaksi lemah. Beberapa faktor kemotaksis dapat mempengaruhi neutrofil maupun monosit, yang lainnya bekerja secara selektif terhadap beberapa jenis sel darah putih. Faktor-faktor kemotaksis dapat endogen berasal dari protein plasma atau eksogen, misalnya produk bakteri (Robbins dan Kumar, 2007).
- g. Proses fagositosis terjadi setelah leukosit berada pada lokasi jejas. Meskipun sel-sel fagosit dapat melekat pada partikel dan bakteri tanpa didahului oleh suatu proses pengenalan yang khas, tetapi fagositosis akan sangat ditunjang apabila mikroorganisme diliputi oleh opsonin (imunoglobulin dan komponen-komponen sistem komplemen). Kemudian terjadi proses fagosom. Fagosom merupakan proses ingesti bakteri yang kemudian terbentuk vakuola fagositik yang dimasukkan ke dalam vesikel sitoplasma. Granula-granula sitoplasma akan menyatu dengan fagosom dan melepaskan isinya ke dalam merupakan proses degranulasi. Sebagian besar mikroorganisme yang telah mengalami

pelahapan mudah dihancurkan oleh fagosit yang berakibat pada kematian mikroorganisme. Walaupun beberapa organisme yang virulen dapat menghancurkan leukosit (Robbins dan Kumar, 2007).

Inflamasi kronis merupakan inflamasi yang berdurasi panjang yang dapat terjadi selama berminggu-minggu hingga bertahun-tahun dan terjadi proses secara simultan dari inflamasi aktif, cedera jaringan, dan penyembuhan. Proses mekanisme inflamasi kronis sebagai berikut :

- a. Inflamasi kronik ditandai oleh infiltrasi sel mononuklir (makrofag, limfosit, dan sel plasma yang diaktifkan limfosit B) dalam jumlah yang lebih besar, destruksi jaringan, dan perbaikan (proliferasi angiogenesis dan fibrosis) (Mitchell dan Cotran, 2003).
- b. Inflamasi kronik dapat muncul menyusul inflamasi akut atau responnya sejak awal bersifat kronik. Perubahan inflamasi akut menjadi inflamasi kronik berlangsung bila respon inflamasi akut tidak dapat reda, disebabkan agen penyebab jejas yang menetap atau terdapat gangguan pada proses penyembuhan normal (Robbins dan Kumar, 2007).
- c. Ada kalanya inflamasi kronik sejak awal merupakan proses primer. Penyebabnya seperti infeksi persisten oleh mikroorganisme intrasel tertentu, kontak lama dengan bahan yang tidak dapat hancur, dan penyakit autoimun (Robbins dan Kumar, 2007).
- d. Bila suatu inflamasi berlangsung lebih lama dari 4 atau 6 minggu disebut kronik. Tetapi karena banyak kebergantungan respon efektif dan sifat alami jejas, maka batasan waktu tidak banyak artinya. Perbedaan antara inflamasi akut dan kronik sebaiknya berdasarkan pola morfologi reaksi (Robbins dan Kumar, 2007).

2.4 Matriks Metalloproteinase

Matrix metalloproteinase (MMP) merupakan *zinc dependent endopeptidase* yang merupakan protein utama yang berperan dalam degradasi matriks ekstraselular secara luas. MMP diproduksi dalam bentuk inaktif (pro-

MMP). Pro-MMP diaktivasi oleh ion *zinc* (Zn^{2+}) maupun ion kalsium (Ca^{2+}) pada PH netral yang berperan sebagai kofaktor pada *domain catalytic* struktur MMP (Ansari *et al.*, 2013; Bruschi dan Pinto, 2013). Matriks metalloproteinase (MMP) memegang peranan penting dalam proliferasi sel, migrasi, diferensiasi, angiogenesis, apoptosis dan pertahanan tubuh. Disregulasi dari matriks metalloproteinase (MMP) memiliki implikasi dalam berbagai penyakit termasuk arthritis, ulkus kronik, encephalomyelitis dan kanker.

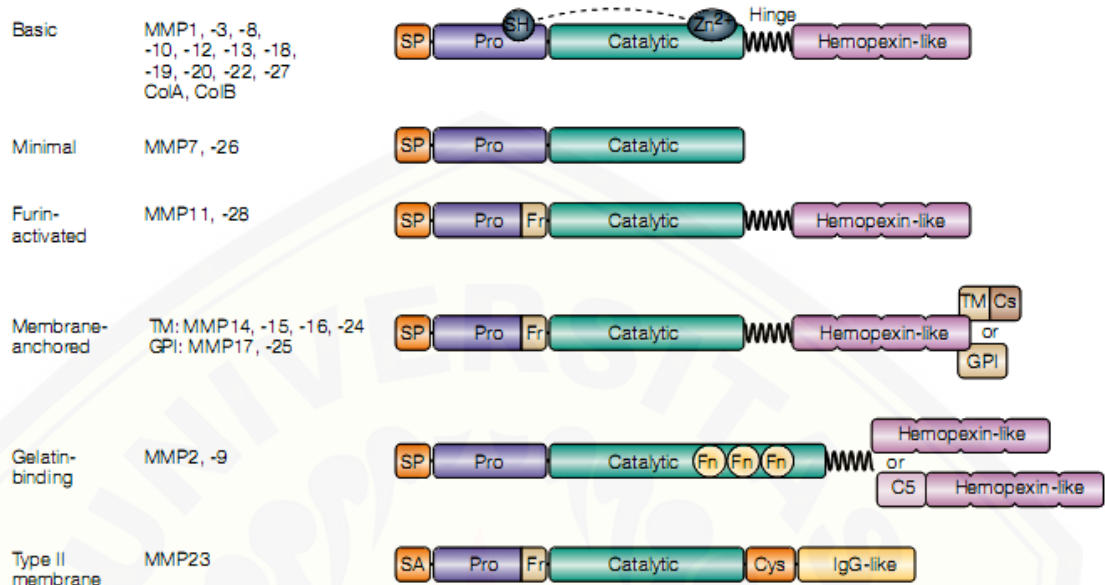
Peningkatan ekspresi Matriks Metalloproteinase (MMP), khususnya gelatinase, yang mendegradasi komponen membran basal. Matriks Metalloproteinase (MMP) memiliki pengaruh dalam migrasi sel dengan cara mengubah tempat perlekatan, membentuk tempat perlekatan baru, memecah sel-sel atau memecah reseptor sel-matriks dan mengeluarkan kemoatraktan dari membran basal (Piasiska *et al.*, 2011).

Terdapat 25 macam MMP dan digolongkan menjadi 5 kelompok yaitu:

- a. *Collagenases* seperti MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18. Kelompok *collagenases* dapat mendegradasi kolagen tipe I, II, III, dan IV;
- b. *Gelatinase* yang meliputi MMP-2 dan MMP-9 dapat mendegradasi gelatin pada kulit dan kolagen tipe IV di membrana basalis;
- c. *Stromelysin* terdiri dari MMP-3, MMP-10, dan MMP-11 mampu mendegradasi komponen MES secara umum, termasuk *proteoglycans*, *laminins*, *fibronectin*, *vitronectin*, dan beberapa tipe kolagen;
- d. *Matrilysins* seperti MMP-7, MMP-26, dan MMP-12 yang dapat mendegradasi matrilisin tipe 1 dan 2 serta *metalloelastase*, makrofag *elastase*, dan makrofag *metalloelastase*;
- e. *Membrane-type* MMP meliputi MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP, MT4-MMP, dan MT6-MMP. Kelompok *membrane-type* MMP mampu mendegradasi komponen MES dan dapat mengaktivasi MMP yang lain (Bruschi dan Pinto, 2013).

Struktur dasar MMP terdiri dari 3 protein homolog, yaitu: (a) *domain signal peptide*, yang merupakan domain untuk sekresi enzim, (b) *domain propeptide*, yang akan dihilangkan ketika enzim menjadi aktif, dan (c) *domain catalytic*, yang

mengandung ikatan Zn^{2+} dan atau Ca^{2+} yang bertanggung jawab dalam aktivitas proteolitik (Ansari *et al.*, 2013).



Gambar 2.11 Struktur dasar Matriks Metalloproteinase (MMP) (Bruschi dan Pinto, 2013)

Matriks Metalloproteinase adalah suatu endoproteinase yang mengandung *zinc*, dengan struktur yang hampir sama tetapi memiliki perbedaan substrat. MMP dihasilkan oleh berbagai *connective tissue* dan sel *pro-inflammatory* di dalam tubuh seperti fibroblast, osteoblast, sel endotel, makrofag, neutrofil, dan limfosit (Bruschi dan Pinto, 2013). Fibroblast, sel epitel, dan sel endotel (sel *non-inflammatory*) dapat menghasilkan MMP-1, MMP-2, dan atau MMP-9. Sedangkan PMN dan makrofag yang merupakan sel inflamasi dapat menghasilkan MMP-8 dan MMP-9. Gelatin, kolagen tipe IV dan V, serta fibronectin merupakan substrat utama MMP-2 dan MMP-9. Pada keadaan normal, aktivitas proteolitik MMP diketahui dikontrol oleh tiga tahapan: aktivasi zimogen, transkripsi, dan inhibisi oleh bentuk aktif *Tissue Inhibitor of MMPs* (TIMPs). Keseimbangan MMP dan TIMP bergeser pada jaringan kanker (Verma dan Hansch, 2007).

Matriks Metalloproteinase mempunyai karakteristik sebagai berikut: (a) mampu mendegradasi matriks ekstra seluler, (b) disekresi dalam bentuk laten dan membutuhkan aktivasi untuk aktivitas proteolitik, (c) mengandung *zinc* pada sisi aktifnya, (d) memerlukan kalsium untuk stabilitasnya, (e) berfungsi pada pH

normal, (f) aktivitasnya dihambat dengan penghambat khusus yaitu *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) (Hadipurnomo, 2011). Peningkatan MMP dapat terjadi karena pengaruh sitokin pro-inflamasi seperti IL-1, TNF, dan IL-6 pada proses inflamasi (Obzen dan Erdogan, 2008). Peningkatan aktivitas MMP memicu inhibisi oleh TIMP. Ketidakseimbangan antara MMPs dan TIMPs dapat memberikan kontribusi terhadap remodeling ECM (Zhou *et al.*, 2013).

2.5 Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Tanaman rosella memiliki nama ilmiah *Hibiscus sabdariffa* L. dan beberapa nama daerah seperti gamel walanda di daerah Sunda, kasturi rortha daerah Ternate, mrambos hijau di Jawa Tengah, asam jarot daerah Padang, dan kesew jawe di Sumatera Selatan. Bunga rosella merupakan herba tahunan yang bergetah. Tinggi tanaman ini dapat mencapai ketinggian 0.5–3 meter serta mengeluarkan bunga hampir sepanjang tahun. Batangnya berbentuk bulat, tegak, berkayu, dan berwarna merah. Daunnya berupa daun tunggal, berbentuk bulat telur, pertulangan daunnya menjari, berujung tumpul, tepi bergerigi, dan dengan pangkal berlekuk (Mardiah *et al.*, 2009). Bunga tanaman rosella merupakan bunga tunggal, pada setiap tangkai tanaman rosella hanya terdapat satu bunga. Bagian mahkota dari bunga rosella terdapat 5 helai dan terdapat kelopak yang berwarna merah. Mahkota dan kelopak bunga inilah yang sering dimanfaatkan sebagai bahan makanan dan minuman (Maryani dan Kristiana, 2005).



Gambar 2.12 Bunga rosella (Soerjauan, 2012)

Dalam taksonomi tumbuhan, rosella diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Bangsa : Malvales

Suku : Malvaceae

Marga : Hibiscus

Jenis : *Hibiscus sabdariffa*

Menurut DEPKES RI kelopak bunga rosella mengandung vitamin C, vitamin D, Vitamin B1, B2, niacin, riboflavin, betakaroten, zat besi, asam amino, polisakarida, omega 3, kalsium, Rasa asam dari kelopak bunga rosella disebabkan kandungan vitamin C dan asam glikolik (Maryani dan Kristiana, 2005). Rosella memiliki kadar vitamin C 9 kali lebih tinggi daripada jeruk, berfungsi untuk menetralsir lemak dalam tubuh, selain itu juga sebagai salah satu antioksidan eksogen (Arrelano *et al.*, 2004; Maryani dan Kristiana, 2005). Bunga rosella memiliki kandungan gizi yang bermanfaat bagi tubuh. Kandungan gizi dalam kelopak bunga rosella segar dapat dilihat pada Tabel 2.1

Tabel 2.1 Kandungan gizi kelopak bunga rosella segar per 100 gram

Nama Senyawa	Jumlah
Kalori	44 kal
Air	86,2%
Protein	1,6 gr
Karbohidrat	11,1 gr
Serat	2,5 gr
Kalsium	160 mg
Fosfor	60 mg
Besi	3,8 gr
Betakaroten	285 mg
Vitamin C	14 mg
Tiamin	0,04 mg
Riboflavin	0,6 mg
Niasin	0,5 mg
Sulfida	-
Nitrogen	-

Sumber : Maryani dan Kristiana (2005)

Di bawah ini adalah kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam kelopak bunga rosella.

Tabel 2.2 Kandungan senyawa kimia dalam kelopak bunga rosella

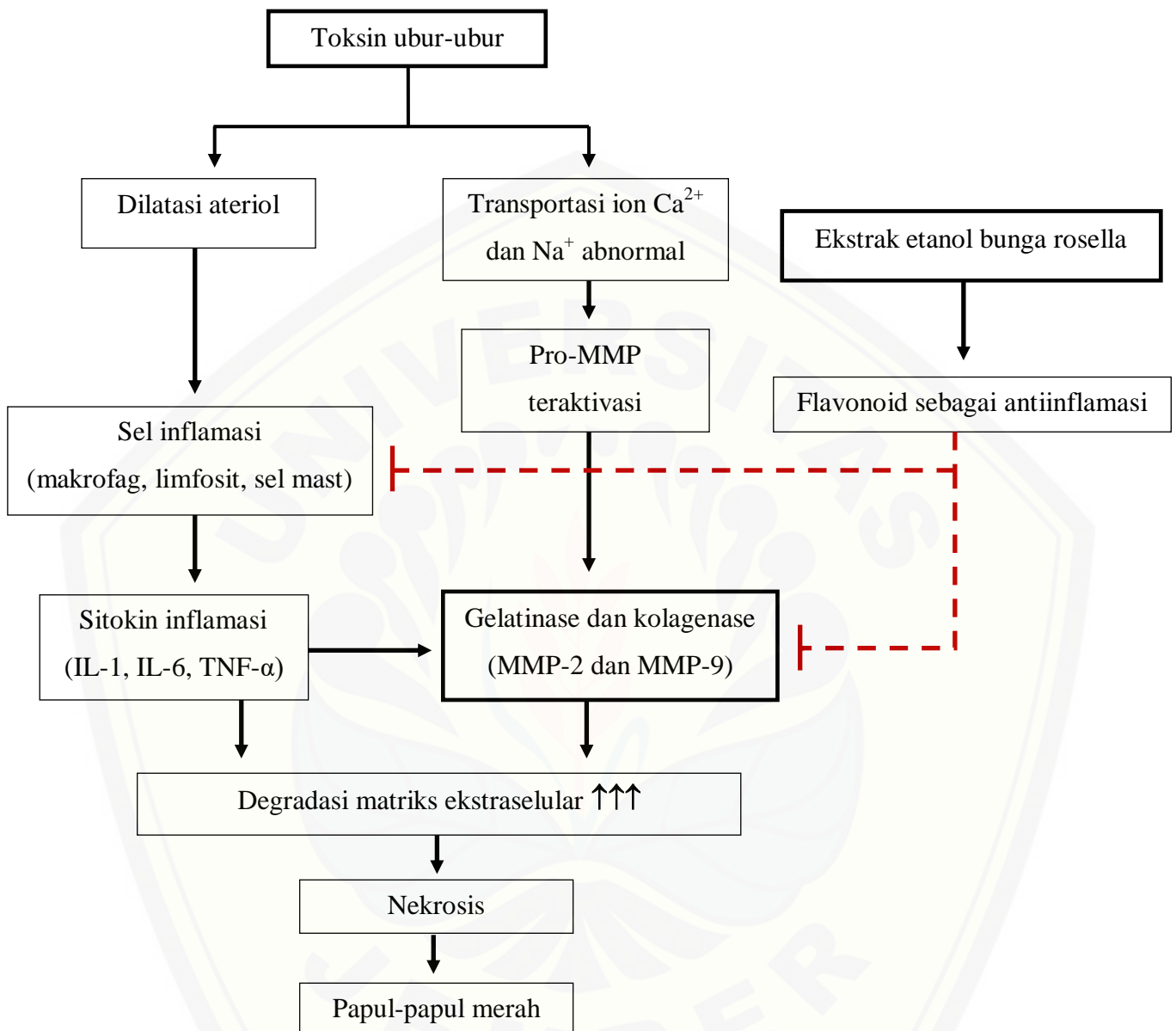
Nama Senyawa	Jumlah
Campuran asam sitrat dan asam malat	13%
Anthocyanin yaitu gossipetin (hydroxyflavone) dan hibiscin	2%
Vitamin C	0,004-0,005%
Protein	
Berat segar	6,7%
Berat kering	7,9%

Sumber : Maryani dan Kristiana (2005)

Terdapat kandungan antosianin yang juga ditemukan oleh Mahadevan *et al.* (2009) dan Ijeomah *et al.*, (2012). Pigmen warna antosianin ini merupakan salah satu jenis senyawa flavonoid. Flavonoid dapat berfungsi sebagai antikanker serta dapat membantu mencegah stroke, sedangkan antosianin berkasiat sebagai antiinflamasi, mengobati diabetes, ulcus, dan dapat digunakan sebagai antiviral dan antimikroba (Wrolstad, 2001; Chiu *et al.*, 2015). Menurut Saptarini *et al.* (2012), kelopak bunga rosella memiliki aktifitas antiinflamasi dengan persentase penghambatan radang pada kaki tikus yang diinduksi karagen 1% sebesar 22,03; 31,48 dan 31,93% pada dosis pemberian ekstrak kelopak bunga rosella 102, 205 dan 410 mg/ 200 g bb. Artikel review yang dibuat oleh Ramadhani dan Sumiwi

(2016) menunjukkan bahwa persentase inhibisi kelopak bunga rosella pada penelitian Saptarini *et. al* (2012) lebih tinggi dibandingkan dengan rimpang kencur, daun mahkota dewa, daun ubi jalar, dan asam jawa yang menggunakan metode penelitian yang sama. Kelopak bunga rosella selain mengandung antosianin juga memiliki kandungan flavonoid jenis lain (gossypetin, hibiscetine, hibiscin, dan sabdaretine), asam protocatechuic, alkaloid, betasitosterol, asam sitrat, galactose, pectin, delphinidin, asam stearate, dan quercetin (Mahadevan *et al.*, 2009; Saptarini *et al.*, 2012). Sementara Ijeomah *et al.* (2012) melaporkan jika rosella mengandung alkaloid, flavonoid, antosianin, tannin, polifenol, oksalat, dan saponin. Toksisitas ekstrak kelopak bunga rosella sangat rendah, LD50 dari ekstrak kelopak bunga rosella tersebut ditemukan di atas 5000 mg/kg, penelitian dilakukan pada tikus (Ali *et al.*, 2005).

2.6 Kerangka Teori



Gambar 2.13 Kerangka teori

Keterangan:



: yang diteliti

: menghambat

Toksin ubur-ubur (*Physalia utriculus*) berupa campuran kompleks protein yang mengandung *bradikinin*, *hemolysin*, *serotonin*, *histamine*, *prostaglandin*,

adenosine triphosphatase, nucleotidas, fibrinolysin, RNase, DNase, dermatoneurotoksin, kardiotoxin, neurotoksin, nefrotoksin, miotoksin, protein antigen, dan lain-lain dapat mengakibatkan efek yang merugikan manusia. Toksin ubur-ubur dapat menyebabkan transport ion Ca^{2+} dan Na^+ menjadi abnormal. Toksin ubur-ubur (*Physalia utriculus*) yang masuk ke dalam kulit akan menimbulkan papul-papul merah yang batasnya ireguler. Proses inflamasi terjadi setelah timbul kontak antara ubur-ubur dan kulit. Reaksi inflamasi tersebut terjadi karena adanya proses dari mediator-mediator inflamasi yang berupa neutrofil, makrofag, limfosit, sel mast, dan sitokin proinflamasi. Sel inflamasi yang teraktivasi akan mensekresi sitokin proinflamasi seperti interleukin-6, interleukin-1, $\text{TNF-}\alpha$, *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), *C-reactive protein* (CRP). Sitokin meningkatkan aktifitas sel-sel inflamasi seperti makrofag dan limfosit T serta dapat menghasilkan MMP-2 dan MMP-9. Sitokin juga mempunyai efek biologis meningkatkan degradasi matriks serta mengurangi sintesis dari matriks, aktivasi sel endotel, dan meningkatnya vasoreaktifitas sel otot polos vaskuler. Meningkatnya infiltrasi sel makrofag dan limfosit akan mengakibatkan tingginya tingkat kerusakan matriks ekstraseluler seperti kolagen. Matriks metalloproteinase yang mendegradasi kolagen, gelatin, dan elastin adalah MMP tipe 2 dan MMP tipe 9. MMP-2 dan MMP-9 akan aktif jika berikatan dengan ion Ca^{2+} dan Zn^{2+} .

Ekstrak etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) mempunyai kandungan alkaloid, flavonoid, antosianin, tannin, polifenol, oksalat, dan saponin. Kandungan flavonoid dan antosianin bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dapat menghambat kerja MMP sehingga proses perusakan matriks ekstraseluler terhambat dan akhirnya memengaruhi proses inflamasi pada kulit akibat toksin ubur-ubur.

2.7 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) berpotensi sebagai inhibitor MMP-2 dan MMP-9 akibat toksin ubur-ubur (*Physalia utriculus*).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian eksperimental bertujuan untuk mengetahui hubungan sebab akibat antara kelompok eksperimen yang mendapat intervensi dengan kelompok kontrol. Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental murni (*true experimental design*) secara *in vitro*. Adanya randomisasi pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol menjadi salah satu syarat dari rancangan penelitian eksperimental murni (Notoatmodjo, 2012).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober tahun 2015 hingga bulan Oktober tahun 2016. Ubur-ubur *Physalia utriculus* didapat dari hasil tangkapan nelayan di pantai Papuma Kabupaten Jember. Pembuatan ekstrak bunga rosella, pengisolasian toksin ubur-ubur, dan uji zimografi dilakukan di Laboratorium Biomol Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sumuran pada gel gelatin. Toksin ubur-ubur yang telah diberi perlakuan dan diinkubasi selama 30 menit dimasukkan ke dalam sumuran gel kemudian dilakukan uji zimografi. Pada uji ini, perhitungan besarnya sampel di tiap kelompok adalah menggunakan rumus Federer sebagai berikut:

$$(n-1)(p-1) \geq 15$$

Keterangan :

n : jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

p : jumlah kelompok perlakuan

Jika dalam penelitian ini penulis melakukan 6 macam perlakuan maka pengulangan sampel dapat dihitung:

$$(n-1)(p-1) \geq 15$$

$$(n-1) (6-1) \geq 15$$

$$(n-1)(5) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

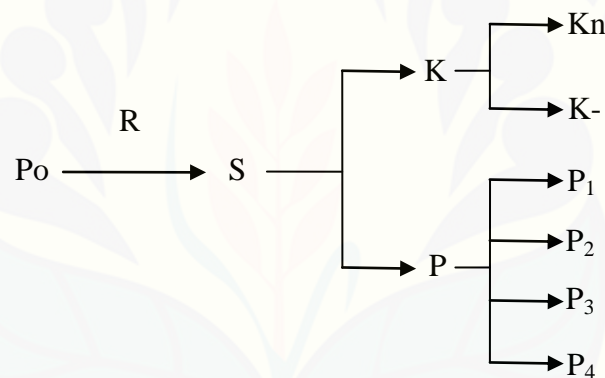
$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan rumus di atas, pengulangan sampel pada masing-masing kelompok perlakuan sebanyak 4 kali, sehingga besar sampel keseluruhan yang diperlukan untuk penelitian ini adalah 24 sampel.

3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Post Test Only Control Group Design*. Rancangan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Rancangan penelitian

Keterangan :

- Po : Populasi
 R : Randomisasi sampel
 S : Sampel
 K : Kelompok kontrol
 P : Kelompok perlakuan
 Kn : Kelompok kontrol normal berisi aquades dan tanpa pemberian toksin ubur-ubur *Physalia utriculus*
 K- : Kelompok kontrol negatif dengan pemberian racun toksin ubur-ubur *Physalia utriculus* 10 µg/ml
 P₁ : Kelompok perlakuan 1 dengan pemberian racun toksin ubur-ubur *Physalia utriculus* 10 µg/ml dan ekstrak ethanol bunga rosella 50 µg/ml
 P₂ : Kelompok perlakuan 2 dengan pemberian racun toksin ubur-ubur *Physalia utriculus* 10 µg/ml dan ekstrak ethanol bunga rosella 100 µg/ml

- P₃ :Kelompok perlakuan 3 dengan pemberian racun toksin ubur-ubur *Physalia utriculus* 10 µg/ml dan ekstrak ethanol bunga rosella 200 µg/ml
- P₄ :Kelompok perlakuan 4 dengan pemberian racun toksin ubur-ubur *Physalia utriculus* 10 µg/ml dan ekstrak ethanol bunga rosella 250 µg/ml

3.5 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian toksin ubur-ubur dan ekstrak bunga rosella. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah degradasi matriks metalloproteinase yang ditunjukkan dengan densitas gel proses zimografi.

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Ekstrak Ethanol Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Ekstrak bunga rosella adalah sediaan ekstrak dari simplisia *Hibiscus sabdariffa* L. dengan cara mengekstraksi bunga rosella kering dengan pelarut etanol 96% dengan metode soxhletasi. Prinsip Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Depkes RI, 2000). Dosis yang digunakan pada penelitian ini sebesar 50, 100, 200, dan 250 µg/ml untuk mengetahui potensi ekstrak bunga rosella sebagai inhibitor MMP-2 dan MMP-9 (Chiu *et al* , 2015).

3.6.2 Zimografi

Zimografi merupakan teknik elektroforesis yang didasarkan pada *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) yang berisi substrat dikopolimerisasikan dalam matriks gel poliakrilamid misalnya gelatin, untuk mendeteksi aktivitas enzimatik. Untuk mendeteksi MMP-2 dan MMP-9 digunakan substrat gelatin. Hasil zimografi berupa densitas gel (ketebalan pita) yang diukur menggunakan densitometri berupa software ImageJ yang menghasilkan data semi kuantitatif. Data semi kuantitatif yang berupa jenis data numerik tersebut merupakan perbandingan ketebalan pita antara kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan yang ditampilkan sebagai *relative optical density*.

3.6.3 *Bradford Protein Assay*

Bradford protein assay adalah metode untuk mengukur konsentrasi total protein pada sampel dengan menggunakan larutan *Bradford* (Bradford, 1976). Pengukuran konsentrasi total protein pada penelitian ini yang berupa toksin ubur-ubur dibutuhkan untuk menentukan dosis toksin ubur-ubur yang akan diuji dengan ukuran berdasarkan standar protein *Bovin Serum Albumin* (BSA) sebesar 1 µg/ml.

3.7 Bahan dan Alat Uji yang Digunakan

3.7.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: bunga rosella, aquades steril, Bradford, 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 30% Acrylamide, dH₂O, Temed, 10% APS, larutan Gelatin, 20 mg/ml 1% w/v SDS, 10% SDS.

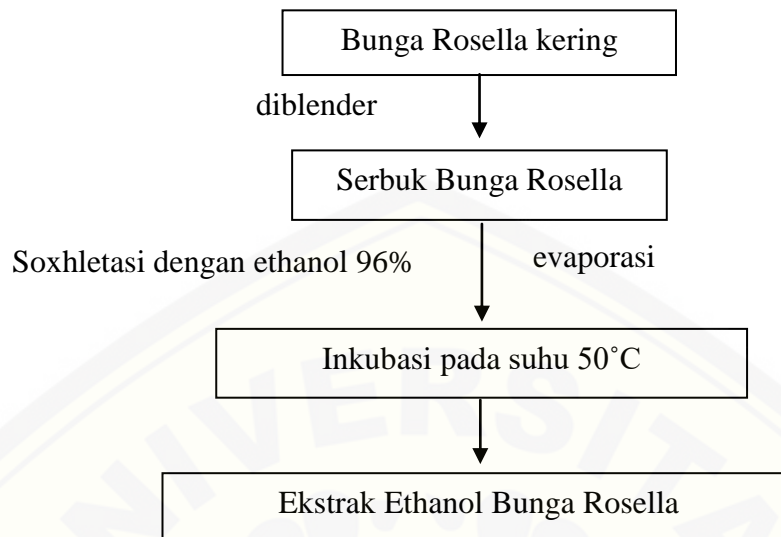
3.7.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: blender, ekstraktor soxhlet, neraca Ohaus, inkubator, sentrifus, spektrofotometer, beaker glass, lemari pendingin, *disposable centrifuge tube*, vortex, eppendorf, mikropipet, rak eppendorf, kamera digital, unit elektroforesis, unit spektrofotometer.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Ekstraksi Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Bunga rosella dikeringkan, setelah itu diblender agar dapat terekstrak sempurna. Bunga rosella yang telah kering ditimbang sebanyak 50 gram di neraca Ohaus, lalu dimasukkan ke dalam kertas saring yang dibentuk seperti tabung. Tabung tersebut dimasukkan ke dalam *soxhlet extractor* dan diekstrak dengan menggunakan etanol 96% sebanyak 200 ml. Selanjutnya, ekstrak yang didapat dikeringkan menggunakan *waterbath* dengan suhu 50°C. Proses ini dilakukan sebanyak tiga kali.



Gambar 3.2 Skema pembuatan ekstrak etanol rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

3.8.2 Persiapan Pengambilan dan Isolasi Toksin Ubur-Ubur *Physalia utriculus*

Ubur-ubur beracun merupakan hasil tangkapan nelayan di wilayah Pantai Papuma Kabupaten Jember. Penangkapan ubur-ubur dilakukan pada sore dan malam hari dengan menggunakan jaring nelayan. Ubur-ubur yang ditangkap dimasukkan ke dalam ember transparan berisi air laut. Kemudian ubur-ubur tersebut dibawa ke Laboratorium Patologi Anatomi FK UNEJ untuk diidentifikasi spesies berdasarkan gambaran morfologi meliputi gambaran makroskopis (panjang dan lebar tubuh, panjang dan jumlah tentakel) dan mikroskopis (struktur *nematocyst* di medusa dan tentakel serta struktur di dalam *nematocyst* dan ukurannya) yang akhirnya ubur-ubur beracun tersebut telah teridentifikasi sebagai spesies *Physalia utriculus* (Mujiono, 2010).

Toksin ubur-ubur (*Physalia utriculus*) terdapat di dalam nematokista yang berada di dalam tentakel. Pada proses ini bertujuan agar terjadi autolisis sehingga memudahkan pelepasan nematokista. Proses selanjutnya ditujukan agar racun di dalam nematokista dapat keluar yaitu menggunakan metode Bloom dengan sedikit modifikasi melalui tahapan seperti pada gambar 3.3.



Gambar 3.3 Skema pengisolasian toksin ubur-ubur *Physalia utriculus*

Sampel ubur-ubur yang teridentifikasi akan dipisahkan tentakel dan medusa ubur-ubur *Physalia utriculus* menggunakan alat bedah, kemudian tentakel dilarutkan menggunakan air laut dengan perbandingan 1:5. Larutan tersebut diletakkan pada tabung yang kemudian disimpan selama 24 jam dalam suhu 4°C agar terjadi proses autolisis. Tabung berisi larutan yang telah disimpan selama 24 jam tersebut dikocok dengan gerakan memutar menggunakan sentrifus selama 30 menit dalam suhu 4°C untuk memudahkan benang-benang toksin keluar dari nematokista, pada akhir pengocokan diambil beberapa tetes larutan untuk diperiksa secara mikroskopis guna menilai keluarnya racun dari nematokista. Tabung yang berisi tentakel kembali disimpan selama 24 jam dalam suhu 4°C, kemudian setelah 24 jam dilakukan pengocokan kembali selama 30 menit. Proses tersebut dilakukan berulang hingga pada pemeriksaan mikroskopis tampak sebagian besar racun keluar dari nematokista. Ekstrak tentakel tersebut kemudian disaring menggunakan kasa steril sebanyak empat lapis. Hasil filtrasi ekstrak tentakel di *lipolyzer* menggunakan *dry freeze vacuum* untuk mendapatkan bentukan kristal toksin ubur-ubur. Kristal-kristal toksin ubur-ubur tersebut ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan 1 ml aquabides, kemudian divortex dan disentrifus untuk mendapatkan supernatan. Supernatan yang dihasilkan akan diukur kadar proteinnya menggunakan metode *Protein Bradford Assay* untuk mengetahui kadar toksin *Physalia utriculus*.

3.8.3 Pengukuran Kadar Protein Toksin Ubur-Ubur *Physalia utriculus*

Pada penelitian ini pengukuran kadar protein toksin ubur-ubur (*Physalia utriculus*) menggunakan metode *Protein Bradford Assay* dengan spektrofotometri R Biopharm Well Reader NS 451414017FSEP. Teknik yang dilakukan adalah dengan membandingkan *absorbance* dari protein standart yang telah diketahui kadar proteinnya dengan *absorbance* sampel toksin ubur-ubur *Physalia utriculus*. Langkah-langkah melakukan pengukuran antara lain sebagai berikut : protein standart dengan konsentrasi 1mg/μl dimasukkan ke dalam *epENDORF* sebanyak 0 μl, 5 μl, 10 μl, 15 μl, 20 μl, dan sampel toksin juga dimasukkan ke dalam *epENDORF* sebanyak 5 μl dan 10 μl. Kemudian ditambahkan reagen *bradford* ke

masing-masing *eppendorf* hingga volumenya mencapai 1000 μ l. Setelah itu masing-masing larutan dari tiap *eppendorf* diletakkan ke dalam mikroplate sebanyak 100 μ l dan dilakukan pembacaan dengan menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 630 nm. Setelah itu *absorbance* protein standart dan sampel toksin akan dibandingkan, sehingga dapat diketahui kadar protein toksin ubur-ubur *Physalia utriculus*.

3.8.4 Pemeriksaan Zimografi

Pemeriksaan zimografi dilakukan dengan pembuatan *separating gel* dan *stacking gel*. *Separating gel* dibuat dengan 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 30% Acrylamide, larutan gelatin, 1% SDS, H₂O, temed, dan 10% APS yang dicampur di tabung Erlenmeyer kemudian dimasukkan ke *glass plate* dan ditunggu hingga gel terpolimerisasi. Sedangkan untuk *stacking gel* dibuat dengan 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 30% Acrylamide, H₂O, 10% SDS, temed, dan 10% APS yang dimasukkan dalam erlenmeyer untuk diaduk kemudian larutan dimasukkan ke *glass plate* di atas *separating gel* menggunakan mikropipet dan gel ditunggu hingga membeku.

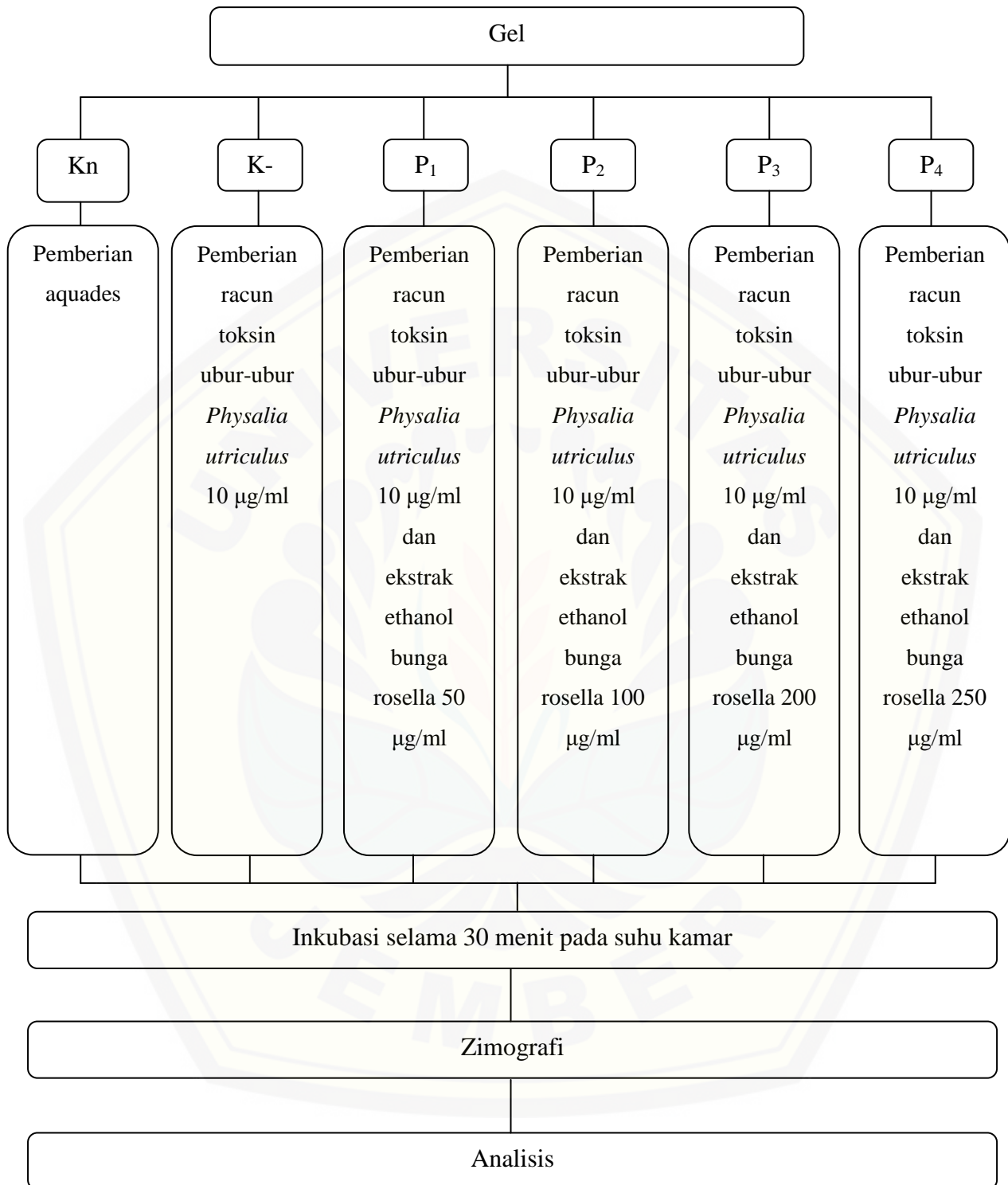
Proses selanjutnya adalah mencampur 50 μ l sampel dengan sampel buffer 50 μ l pada *eppendorf* yang kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar.. Tris-glycine-SDS buffer dituangkan di antara gel dan dalam *chamber* sampai garis batas. Sebanyak 35 μ l campuran sampel dan sampel buffer dimasukkan dalam sumuran. *Running gel* dilakukan pada tegangan sebesar 90 volt dan dihentikan hingga sampel berada dibawah gel. Gel diletakkan dalam larutan *renaturing buffer* selama 30 menit. Kemudian gel diletakkan dalam larutan *development buffer* dan diinkubasi selama 16-18 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya, gel diwarnakan menggunakan *Coomassie Brilliant Blue* selama 30 menit pada suhu ruang. MMP terdeteksi sebagai pita jernih dengan latar belakang biru. Setelah itu, dilakukan *destaining* dengan methanol selama 2 jam pada suhu ruang. Area jernih yang didapat dihitung menggunakan densitometri. Analisis data densitas dikerjakan menggunakan *software* ImageJ. Densitas gel menunjukkan ketebalan gel yang mampu dicerna oleh MMP.

3.9 Analisis Data

Data yang akan dianalisis berupa densitas gel. Analisis data yang dilakukan adalah uji normalitas dan uji varian. Jika sebaran data normal dan data varian sama ($p > 0,05$), analisis data yang digunakan adalah *One Way Anova*. Namun, jika tidak sama ($p < 0,05$), penulis menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya digunakan uji *Post Hoc Tukey* sebagai lanjutan *One Way Anova* dan *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis* untuk menentukan perbedaan yang bermakna dalam tiap kelompok. Perbedaan tiap kelompok dinilai bermakna atau signifikan apabila nilai $p < 0,05$.

3.10 Alur Penelitian

Toksin ubur-ubur yang telah diukur kadar proteinnya dimasukkan ke dalam eppendorf, kemudian ditambahkan ekstrak etanol bunga rosella dengan dosis yang sesuai rancangan penelitian. Campuran tersebut kemudian ditambahkan sampel buffer dengan perbandingan 1:1, setelah itu diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Larutan yang telah diinkubasi kemudian dimasukkan ke dalam sumuran pada gel elektroforesis menggunakan *white tip* berujung tipis, kemudian dilakukan proses zimografi. Hasil zimografi tersebut kemudian dihitung menggunakan densitometri berupa software ImageJ. Data yang diperoleh dari penghitungan menggunakan software tersebut kemudian dikonversikan menjadi *relative optical density* yang akan dianalisis. Skema alur penelitian dapat dilihat pada gambar 3.4.



Gambar 3.4 Skema alur penelitian dengan zimografi

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) berpotensi sebagai inhibitor MMP golongan gelatinase yaitu MMP-2 dan MMP-9 akibat toksin ubur-ubur *Physalia utriculus* dengan menggunakan metode gelatin zimografi.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, peneliti merekomendasikan beberapa hal sebagai berikut :

1. Perlu diadakannya penelitian lebih lanjut mengenai kandungan flavonoid sebagai senyawa aktif dalam bunga rosella yang berpotensi sebagai antiinflamasi;
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis efektif ekstrak etanol bunga rosella sebagai inhibitor MMP-2 dan MMP-9 akibat toksin ubur-ubur;
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang potensi ekstrak etanol bunga rosella sebagai antiinflamasi akibat toksin ubur-ubur secara in vivo.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, J. M. & Qasim, R. 1991. *Toxicology of physalia's (Portugese man-o'war) venom*. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences.
- Ali, B. H., Naser, A. W., dan Gerald, B. 2005. Phytochemical, Pharmacological and Toxicologi Aspects of *Hibiscus sabdariffa* L. : A Review. *Phytotherapy Research*. Vol. 19: 369-375.
- Ansari, M. Afaque, Shaikh, S., Muteeb, G., Rizvi, Syed M. D., Shakil, S., Alam, A., Tripathi, R., Ghazal, F., Rehman, A., Ali, Saeedut Z., Pandey, Anil K., dan Ashraf, Ghulam M. 2013. *Role of Matriz Metalloproteinases in Cancer*. Advances in Protein Chemistry. OMICS Group eBooks : 4-19.
- Arrelano, Romero, Soto, dan Tortoriello. 2004. Effectiveness and Tolerability of a Standardized Extract from Hibiscus Sabdariffa in Patients With Mild to Moderate Hypertension, a Controlled And Randomized Clinical Trial. *Phytomedicine*. Vol. 11: 82-375.
- Besral. 2010. Pengolahan dan Analisa Data-1 Menggunakan SPSS. Depok: Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Indonesia.
- Beurden, S., Patricia, A. M., dan Johannes W. Von den Hoff. 2005. *Zymographic Techniques For The Analysis of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors*. Biotechniques. 2005 Jan; 38(1): 73-83.
- Bradford, Marion M. 1976. *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Brinkman, Diane L. dan Burnell, James N. 2009. *Biochemical and molecular characterisation of cubozoan protein toxins*. Toxicon Vol. 54, pp: 1162–1173
- Bruschi, Fabrizio dan Pinto, Barbara. 2013. *The Significance of Matrix Metalloproteinases in Parasitic Infection Involving the Central Nervous System*. Pathogens, 2: 105-129.
- Cegolon, Luca, Heymann, William C., Lange, John H., dan Mastrangelo, Giuseppe. 2013. *Jellyfish Stings and Their Management: A Review*. Marine Drugs, 11 : 523-550.
- Cheng, D., Dattaro, A. J., Yakobbi, R. 2007. *Jellyfish Stings*. Med. J. Aust.

- Chiu, Chun-Tang, Chen, Jing-Hsien, Chou, Fen-Pi, dan Lin, Hui-Hsuan. 2015. *Hibiscus sabdariffa Leaf Extract Inhibits Human Prostate Cancer Cell Invasion via Down-Regulation of Akt/NF- κ B/MMP-9 Pathway*. *Nutrients*. Vol. 7: 5065-5087.
- Chung, Ratnapala, Cooke, dan Yanagihara. 2000. *Partial Purification and Characterization of α Hemolysin (CAH 1) from Hawaiian Box Jellyfish (Carybdea alata) Venom*.
- Dahlan, M. Sopiudin. 2013. *Statistik Untuk Kedokteran dan Kesehatan : Deskriptif, Bivariat, dan Multivariat Dilengkapi Aplikasi Menggunakan SPSS*. Jakarta : Salemba Medika.
- Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cetakan Pertama. Jakarta : Depkes RI. Hal. 10-11.
- Dorland, W. A Newman. 2010. *Kamus Kedokteran Dorland Ed. 31* (Ahli Bahasa : Albertus Agung Mahode). Jakarta : EGC.
- Freitas, José C. D., Schiozer, Wandir A., and Malpezzi, Elena L. A. 1995. *Case Report a Case of Envenoming by Portuguese Man-of-War From the Brazilian Coast*. *Toxicon* Vol. 33 No. 7, pp: 859-861.
- Hadipurnomo, S. 2011. "Hubungan Kadar Serummatrix metalloproteinases -9 Terhadap Kejadian Gagal jantung Akut Sebagai Komplikasi Sindroma Koroner Akut." Tidak Diterbitkan. Tesis. Yogyakarta: Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada.
- Hoeksema, Bert W. dan Crowther, Andrea L. 2011. *Masquerade, mimicry and crypsis of the polymorphic sea anemone Phyllodiscus semoni and its aggregations in South Sulawesi*. *Contributions to Zoology* Vol. 80 No. 4, pp: 251-268.
- Hu, X. dan Beeton, C. 2010. *Detection of Functional Matrix Metalloproteinases by Zymography*. *Journal of Visualized Experiments* 45: 1-5.
- Ijeomah, A. U., Ugwuona, F. U., dan Abdullahi, H. 2012. *Phytochemical Compositon and Antioxidant Properties of Hibiscus sabdariffa and Moringa oleifera*. *Nigerian Journal of Agriculture, Food and Environment*. Vol. 8 (1):10-16.
- Junior, V., Silveira, Fabio L., Migotto, A. 2010. *Skin Lession In Envenoming By Cnidarians (Portuguese Man-of-War And Jellyfish): Etiology And Severity Of Accidents On The Brazilian Coast*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 52: 47-50.

- Kang, C., Jin, Y. B., Kwak, J., Jung, H., Yoon, W. D., Yoon, T.J., Kim, J. S., Kim, E. 2013. Protective Effect of Tetracycline Against Dermal Toxicity Induced by Jellyfish Venom. *PLOS ONE* 8(3): 1-8.
- King, Rachel. Tanpa Tahun. *The Portuguese man-of-War (Physalia physalis)*. South Carolina Departement of Natural Resources.
- Kupai, K., Szucs, G., Cseh, S., Hajdu, I., Csonka, C., Csont, T., Ferdinandy, P. 2010. Matrix Metalloproteinase Activity Assays : Importance Of Zymography. *J Pharmacol Toxicol Methods* 61 (2) : 205-209.
- Kupai, K. 2011. Gelatin Zymography for Detection of Matrix-metalloproteinase-2 and -9 (MMP-2, MMP-9) From Myocardiam Samples. HURO.
- Lane, C.E. & Dodge, E. 1958. *The Toxicity of Physalia Nematocyst*. Miami: Marine Laboratory University of Miami.
- Mahadevan, N., Shivali and Kamboj, V. 2009. Hibiscus sabdariffa Linn. – An overview. *Natural Product Radiance*, Vol. 8(1), 2009, pp. 77-83.
- Mardiah H. S., Rahayu, A., dan Ashadi, R. W. 2009. *Budidaya dan Pengolahan Rosella*. Edisi 1. Jakarta: Agromedia.
- Maryani, H. dan Krisriana, L. 2005. *Khasiat dan Manfaat Rosela*. Jakarta: PT AgroMedia Pustaka.
- Mitchell, R.N. and Cotran, R.S. 2007. Jejas, Adaptasi, dan Kematian Sel. Dalam: Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L. (eds). *Buku Ajar Patologi Robbins Volume 1*. Edisi VII. Jakarta: EGC.3:7-26.
- Mujiono, N. 2010. *Jellyfish Sting: An Indonesian Case Report*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*.
- Mutschler, E., 1991. *Dinamika Obat Buku Ajar Farmakologi dan Toksikologi Edisi Kelima*. Diterjemahkan oleh Mathilda B. Widiyanto dan Anna Setiadio Rianti tahun 1991. Bandung: Penerbit ITB.
- Nagai, H. & Nakajima, T. 2001. *Novel Hemolytic Active Proteins and Genes Encoding The Same*. European Patent Application: 1-8.
- Nagai, Hiroshi. 2003. *Recent Progress in Jellyfish Toxin Study*. *Journal of Health Science*, 49 (5): 337-340.
- Notoadmojo, S. 2012. *Metodologi Penelitian Kesehatan Edisi Revisi*. Jakarta: Rineka Cipta.

- Oppergard, S.C, Anderson, P.A, dan Eddington, T.D. 2009. Research: Puncture Mechanics of Cnidarian Cnidocyst: A Natural Actuator. *Journal of Biological Engineering*. <http://www.jbioleng.org/content/3/1/17> [23 Oktober 2014]
- Ozben, B., and Erdogan, O. 2008. The Role of Inflammation and Allergy in Acute Coronary Syndromes. *Inflammation & Allergy – Drug Targets*, 7: 136-44.
- Patten, Peg Van. 2006. *The Portuguese Man-of-War: Unwelcome in New England*. Connecticut Sea Grant.
- Piasiska, Herza, M. Nadjib D. Lubis, Soekimin. 2011. Tampilan Pulasan Imunohistokimia *Matrix Metalloproteinase-9* (MMP-9) pada *Undifferentiated Carcinoma* Nasofaring Tipe Regaud dan Tipe Schmincke. Medan: Majalah Patologi vol. 20 no.3.
- Price, S. A. dan Wilson, L. M. 2006. *Patofisiologi : Konsep Klinis Proses-proses Penyakit*. Alih Bahasa oleh Pendit, Hartanto, Wulansari, dan Mahanani. Jakarta: EGC.
- Ramadhani, Nur dan Sumiwi, Sri Adi. 2016. *Aktivitas Antiinflamasi Berbagai Tanaman Diduga Berasal dari Flavonoid: Artikel Review*. Jatinangor : Farmaka Suplemen Volume 14 Nomor 2, 111-123.
- Robbins dan Kumar. 2007. *Buku Ajar Patologi jilid 1*. Edisi 7. Jakarta: EGC.
- Saptarini, Nyi M., Darusman, F., dan Priatna, B. 2012. *Anti-inflammatory Activity of Hisbiscus sabdariffa Calyx Extract*. *Jurnal Medika Planta* Vol. 1 (5), April 2012: 18-23
- Setianto, Y. S., Mubarika, S., Astuti, I., Irawan, B. 2011. Corelation Between Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) With Complications of Acute Heart Failure In Myocardial Infarction With ST Elevation (STEMI) And Acute Coronary Syndromes Without STElevation (NSTEACS). *Jurnal Kardiologi Indonesia*32(4): 229-235.
- Seyedian, Ramin, Pipelzadeh, Mohammad H., Jalali, Amir, Kim, Euikyung, Lee, Hyunkyung, Kang, Changkeun, Cha, Mijin, Sohn, Eun-tae, Jung, Eun-Sun, Rahmani, Ali H., dan Mirakabady, Abbas Z. 2010. *Enzymatic Analysis of Hemiscorpius lepturus Scorpion Venom Using Zymography and Venom-specific Antivenin*. *Toxicon* 56, 521-525.
- Soerjauan. 2012. Yuk Kita Kenal Lebih Dekat Bunga Rosela, Tanaman Hias dengan Manfaat Antihipertensi [on line]. <http://soerjauan.blogspot.com/2012/02/yuk-kita-kenal-lebih-dekat-bungarosela.html>. [20 Maret 2015].

- Suling, Pieter L. 2011. *Cutaneous Lesions From Coastal and Marine Organisms*. P₂KB_Dermatoses & STIs Associated with Travel to Tropical Countries: 191-196.
- Surya online. 13 Agustus 2013. "Kasus sengatan ubur-ubur sepanjang pantai selatan Pulau Jawa".
- Suryana, K. 2011. Kadar Interleukin-10 Plasma Rendah, Matrix Metalloproteinase-9 dan Resiko Kadar Interleukin-6/Interleukin Tinggi yang Memberi Resiko Kejadian Kardiovaskuler Lebih Tinggi pada Penderita Sindroma Koroner Akut. *Disertasi*. Denpasar. Program Pendidikan Spesialis Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.
- Susilowati, A. E. 2009. Pengaruh Pemberian Ekstrak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) Terhadap Kerusakan Sel-sel Hepar Mencit (*Mus musculus*) Akibat Paparan Parasetamol. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Surakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.
- Suwignyo, S. 1989. *Vertebra air*. Bogor: Lembaga Sumberdaya Informasi IPB 15-17.
- Toth, M. dan Fridman, R. 2013. Assessment of Gelatinase (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin Zymography. *National Institute of Health Public Access* 57.
- Turner, R. J., Freeman, S. E. 1969. A Pharmacological Study of The Toxin Of A Cnidarian, *Chironex flecker* Southcott. *Br. J. pharmacy*. 35, 510-520.
- Verma, R. P. dan Hansch, C. 2007. Matrix Metalloproteinase (MMP) : Chemical-biological Functions and (Q)SARs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15; 2223-2268.
- Wahyuningrum, R. K. 2013. "Pengaruh Induksi Toksin Ubur-ubur (*Physalia physalis*) Terhadap Gambaran Histopatologi Jantung Tikus Wistar". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Wiratmini, N. I., Wiryatno, J., dan Dalem, A. A. G. R. 2008. *Makrozoobenthos pantai pererenan (Kabupaten Bandung): Jenis, Status, dan Manfaatnya bagi Masyarakat*. Universitas Udayana: Bali.
- Whittaker, M. dan Ayscough, A. 2001. Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors – Current Status and Future Challenges. *Celltransmissions* 17(1): 3-14.
- Whitaker, D., King, R., dan David. K. 2005. *Jellyfish an Information*. Pasific. Bull. Mar, Sci.

- Wrolstad, R.E. 2001. *The Possible Health Benefits of Anthocyanin Pigments and Polyphenolics*. <http://lpi.oregonstate.edu/ss01/anthocyanin.html>. [15 April 2015].
- Xiao, Liu, He, Wang, Ye, Liu, Nie, Zhao dan Zhang. 2011. *The Acute Toxicity and Hematological Characterization Of The Effect Of Tentacle-Only Extract From The Jellyfish Cyanea capillata*. *Marine Drugs*. 9, 526-534.
- Yanagihara, A., Janelle, M. Y., Kuroiwa., Louise, M., Oliver., John, J., Chung., Dennis D., Kunkel. 2002. *Ultrastructure of a Novel Eurytele Nematocyst of Carybdea Alata Reynaud (Cubozoa, cnidaria)*. *Cell Tissue Res*, 308: 307-318.
- Yanagihara, Angel A. dan Shohet, Ralph V. 2012. *Cubozoan Venom-Induced Cardiovascular Collapse Is Caused by Hiperkalemia and Prevented by Zinc Gluconate in Mice*. *Plose One*. Issue 12, Volume 7, Desember 2012.
- Zhou Shao-fei, Hu San-Yuan, Ma Lei, Miao Lei dan Mao Wei-Zheng. 2013. *Correlation Between Papillary Thyroid Cancer and Peripheral Blood Levels of Matrix Metalloproteinase-2, Matrix Metalloproteinase-9, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2*. *Chin Med J* 2013; 126 (10): 1925-1926. Doi: 10.3760/cma.j.issn.03666999.20130172.

LAMPIRAN

Lampiran A. Keterangan Persetujuan Etik



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER**

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877
Jember 68121 Email : fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK

ETHICAL APPROVA

Nomor : 790 /H25.1.11/KE/2015

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

**POTENSI EKSTRAK ETANOL BUNGA ROSELLA (*Hibiscus Sabdariffa L.*)
SEBAGAI INHIBITOR MMP-2 DAN MMP-9 DALAM PROSES INFLAMASI
AKIBAT TOKSIN UBUR-UBUR (*Physalia Utriculus*) DENGAN METODE
ZIMOGRAFI**

Nama Peneliti Utama : Melati Permata D (Nim :112010101051)
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 27 Februari 2016



dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Tanggapan Anggota Komisi Etik

Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lain.

Saran Komisi Etik :

- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan ekstrak ethanol bunga reosella
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pembuatan toksin ubur-ubur.
- Mohon diperhatikan kontrol kualitas pemeriksaan laboratorium yang dilakukan

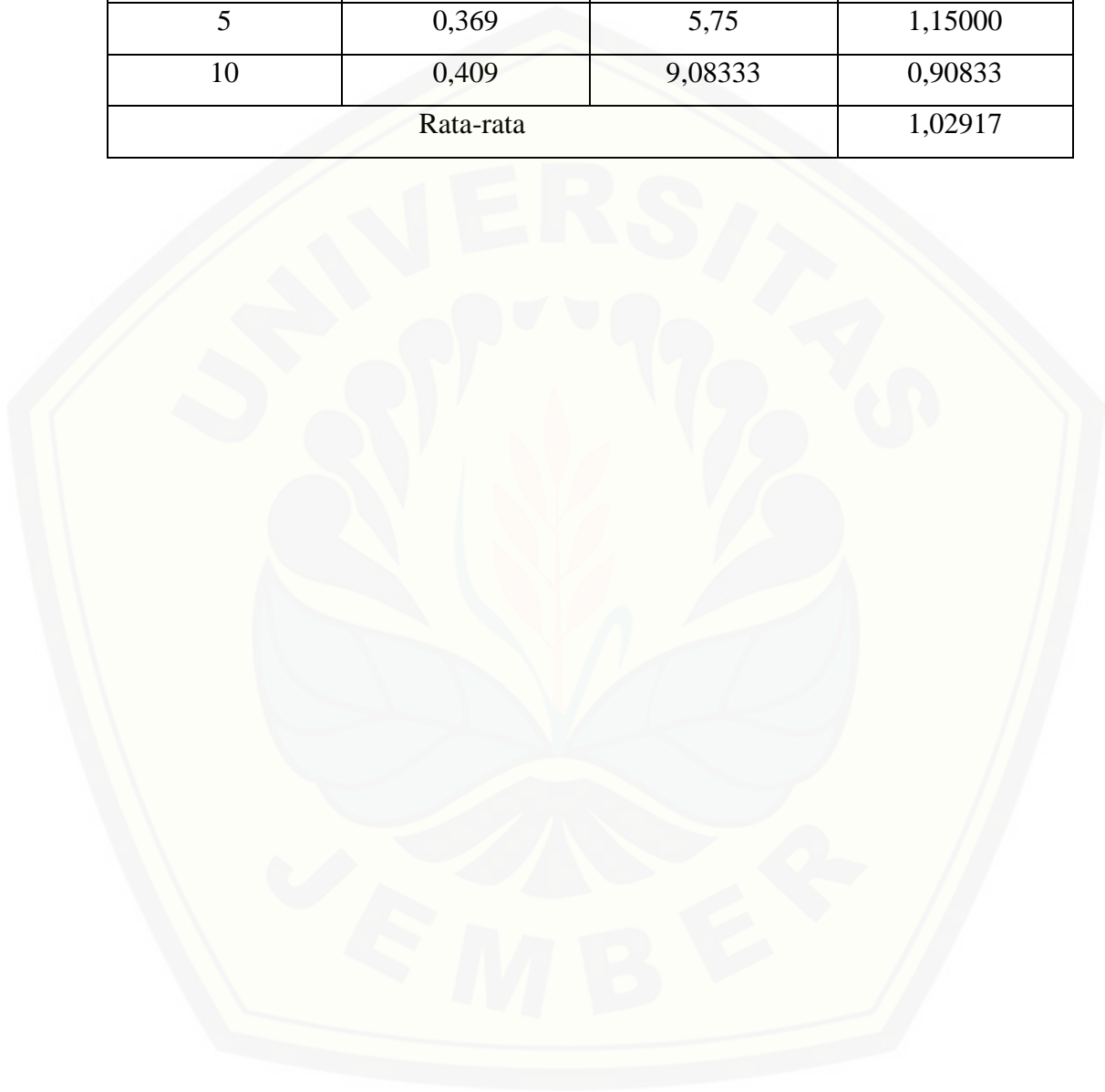
Jember, 25 Februari 2016



(dr. Rini Riyanti, Sp.PK)

Lampiran B. Hasil Absorbansi Protein Toksin Ubur-Ubur *Physalia utriculus*

Volume toksin (μl)	Absorbansi (y)	x	Kadar protein toksin ($\mu\text{g/ml}$)
5	0,369	5,75	1,15000
10	0,409	9,08333	0,90833
Rata-rata			1,02917



Lampiran C. Prosedur Zimografi (Kupai, 2011)**C.1 Pembuatan Gel *Acrylamide* 8%**

a. Separating Gel

Bahan :

- | | |
|---|---------|
| 1. 1,5 M Tris HCl pH 8.8 | 3,75 ml |
| 2. 30% <i>Acrylamide</i> | 4,0 ml |
| 3. H ₂ O | 5,75 ml |
| 4. Larutan gelatin (20 mg/ml, 1% w/v SDS) | 1,5 ml |
| 5. Temed | 10 µl |
| 6. 10% APS (Ammonium Persulfate Solution) | 50 µl |

Prosedur :

1. Siapkan bahan dan larutan cetakan gel
2. Campurkan bahan nomor 1 sampai 4 pada beaker glass ukuran 100 ml
3. Setelah keempat bahan tercampur, tambahkan APS dan temed, campur dengan cepat
4. Masukkan larutan dengan segera pada cetakan hingga batas sisir yang akan dimasukkan
5. Tambahkan *aquades* di atas larutan agar gel yang terbentuk memiliki permukaan yang lurus
6. Tunggu hingga gel mengeras. Jika gel telah mengeras, bersihkan *aquades* pada cetakan dengan kertas saring

b. Stacking Gel

Bahan :

- | | |
|--------------------------|---------|
| 1. 0,5 M Tris HCL pH 6,8 | 12,5 ml |
| 2. 30% <i>Acrylamide</i> | 0,65 ml |
| 3. H ₂ O | 3,05 ml |
| 4. 10% SDS | 50 µl |
| 5. Temed | 8 µl |
| 6. 10% APS | |

Prosedur :

1. Campur bahan nomer 1 sampai 3 ke dalam *beaker glass*
2. Tambahkan 10% SDS, temed dan APS dengan cepat
3. Segera masukan larutan ke dalam cetakan gel, kemudian pasang sisir
4. Tunggu hingga gel memadat

C.2 Pelaksanaan *Running Gel*

Prosedur:

1. Pasang plate yang berisi gel pada alat elektroforesis Biorad. Pastikan tidak bcor
2. Masukkan *running buffer* 1x *new* pada *plate* (Tris/Glicine/SDS catalog BIO-RAD 161-0732)
3. Masukkan *running buffer* 1x *new* pada *chamber* Tris/Glicine/SDS catalog BIO-RAD 161-0732) hingga pada batas yang tertera pada alat
4. Masukkan sampel pada sumuran gel
5. Lakukan Running pada voltase 90 volt hingga sampel berada kurang lebih 1 cm di atas batas bawah gel

C.3 Pembuatan *Renaturation Buffer* (Triton X-100 (2,5% v/v))

Bahan :

- | | |
|--------------------------|--------|
| 1. 2,5% v/v Triton X-100 | 25 ml |
| 2. H ₂ O | 975 ml |

Prosedur :

1. Campur 2,5% v/v Triton X-100 dengan H₂O
2. Inkubasi gel dalam larutan secukupnya (kurang lebih 75 ml/gel) selama 40 menit

C.4 *Development Buffer* (50 mM Tris HCl; 0,15 M NaCl; 10 mM CaCl₂)

Bahan :

- | | |
|---|------------|
| 1. NaCL | 8,766 gram |
| 2. CaCl ₂ . 2 H ₂ O | 1,47 gram |

- | | |
|---------------------|------------|
| 3. Tris Base | 6,057 gram |
| 4. NaOH | 0,5 gram |
| 5. H ₂ O | 1000 ml |

Prosedur :

1. Campurkan bahan-bahan tersebut ke dalam *beaker glass*
2. Tambahkan HCl hingga pH larutan menjadi 7,8-8
3. Inkubasi gel dalam larutan hingga seluruh bagian gel terendam (kurang lebih 75 ml/gel) selama semalam (20 jam) dengan shaker

C.5 Staining Gel (Coomassie Brilliant Blue 0,05%)

Bahan :

- | | |
|--------------------------------------|--------|
| 1. <i>Coomassie Brilliant Blue G</i> | 250 ml |
| 2. Metanol | 125 ml |
| 3. <i>Glacial acetic acid</i> | 50 ml |
| 4. H ₂ O | 325 ml |

Prosedur :

1. Campur semua bahan
2. *Staining* gel dengan larutan secukupnya selama 1 jam

C.6 Destaining Solution

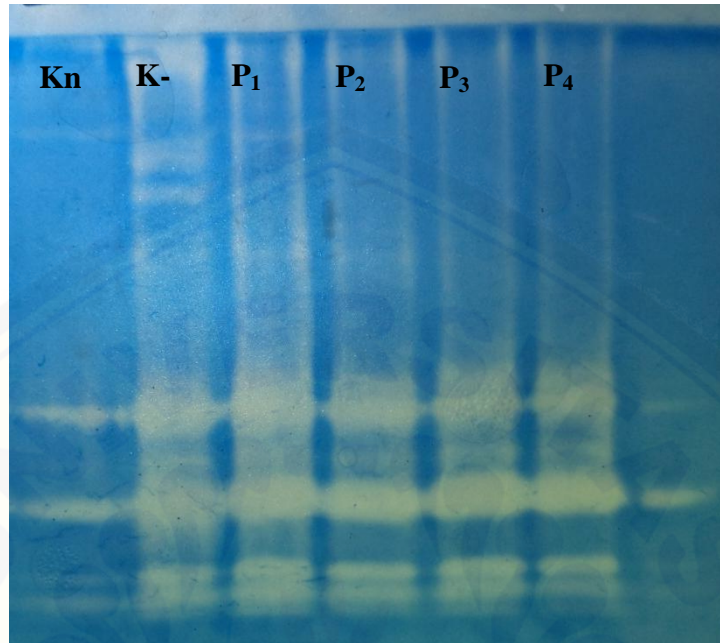
Bahan :

- | | |
|-------------------------------|--------|
| 1. Metanol | 40 ml |
| 2. <i>Glacial acetic acid</i> | 80 ml |
| 3. H ₂ O | 880 ml |

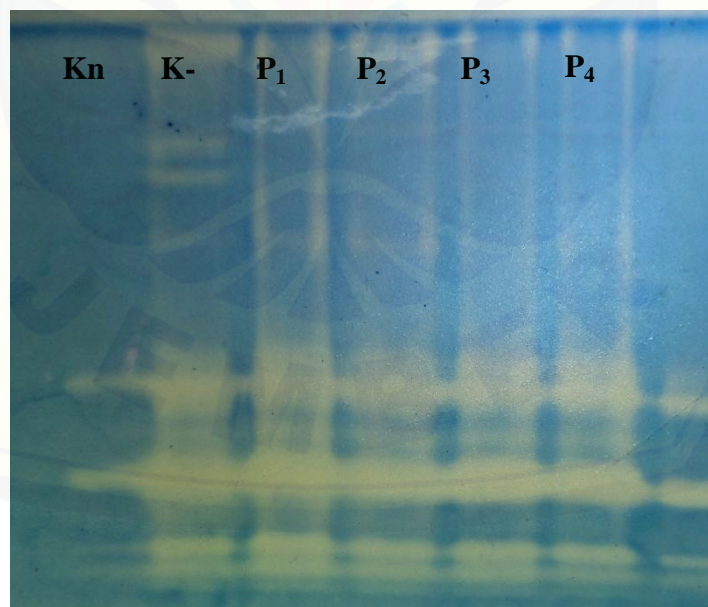
Prosedur :

1. Campur semua bahan
2. *Destaining* gel dengan larutan secukupnya selama 5 menit

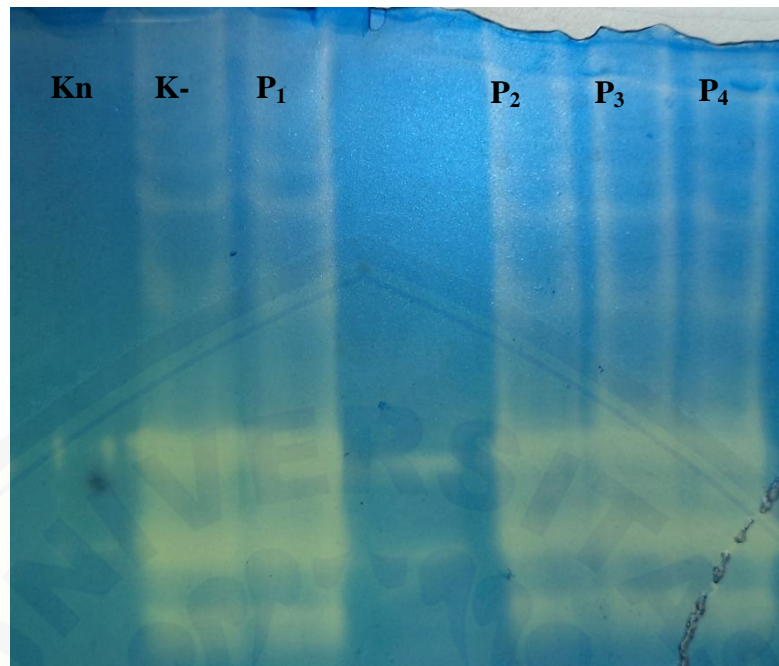
Lampiran D. Hasil Zimografi



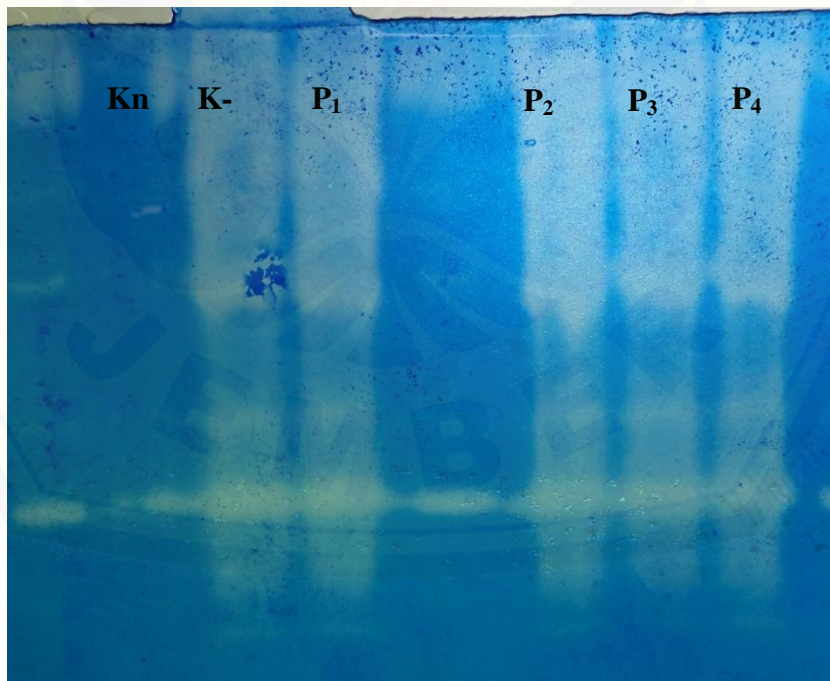
Gambar D.1 Hasil Zimografi Gel 1



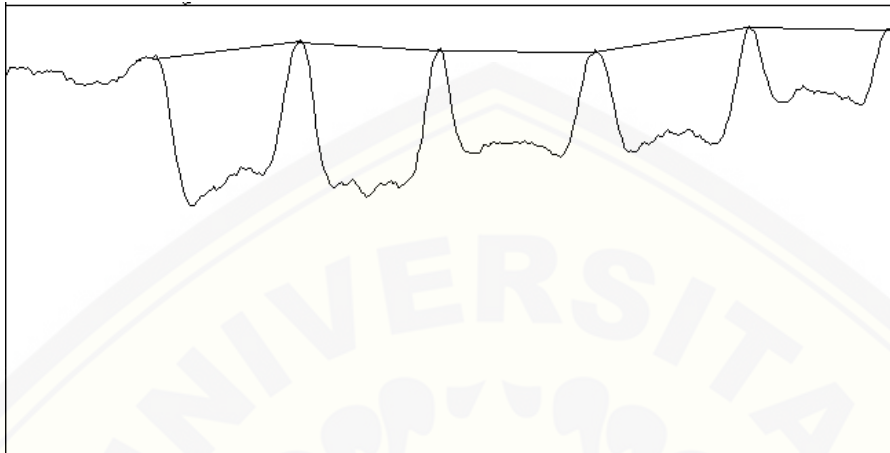
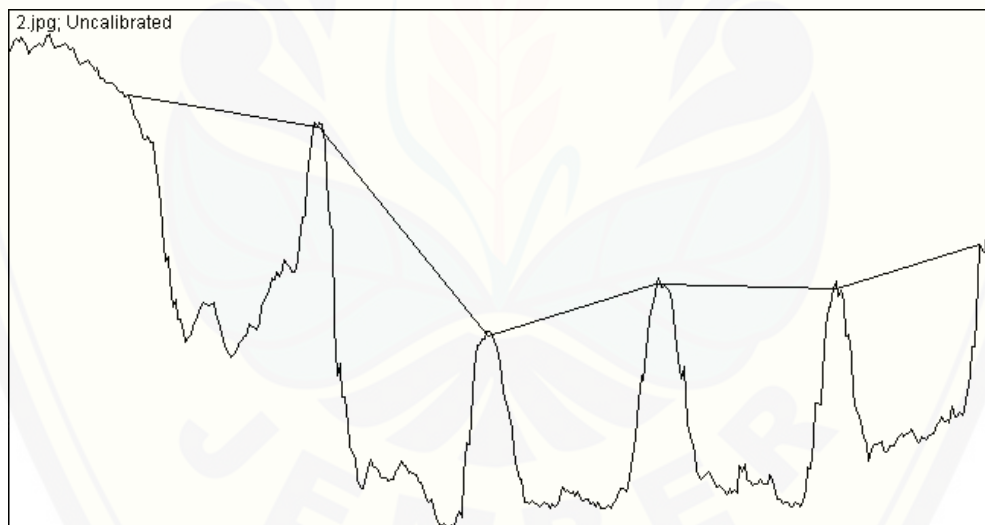
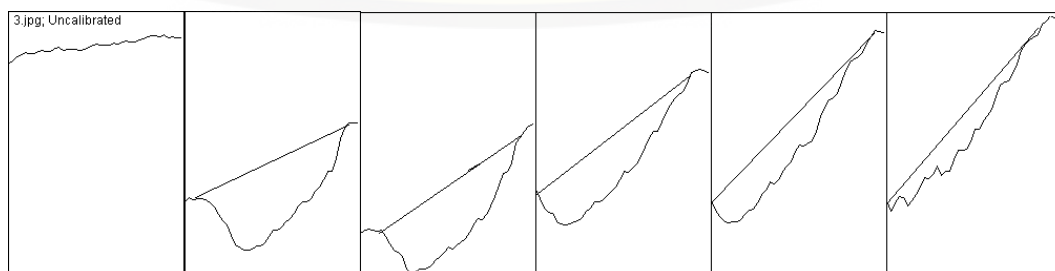
Gambar D.2 Hasil Zimografi Gel 2

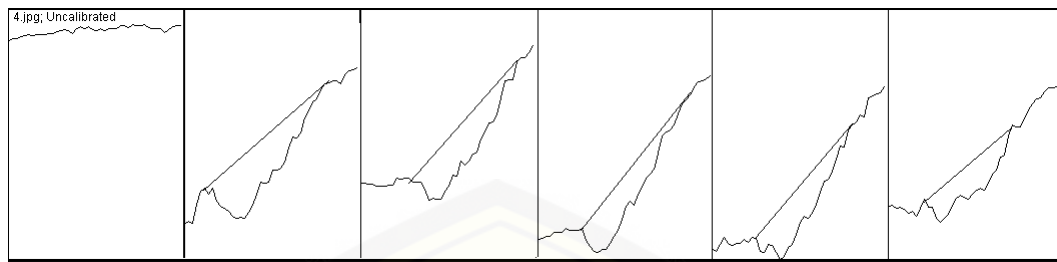
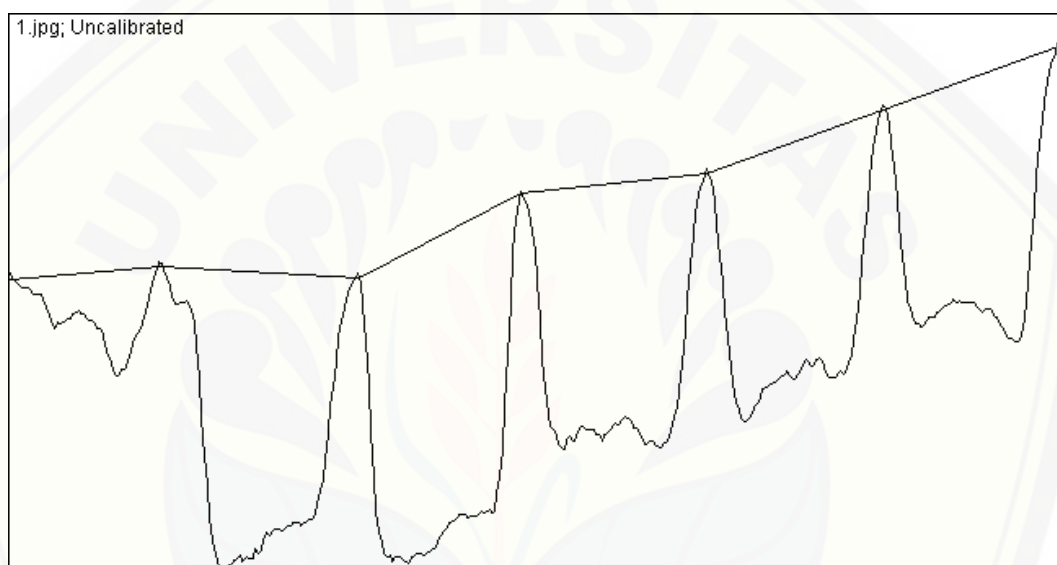
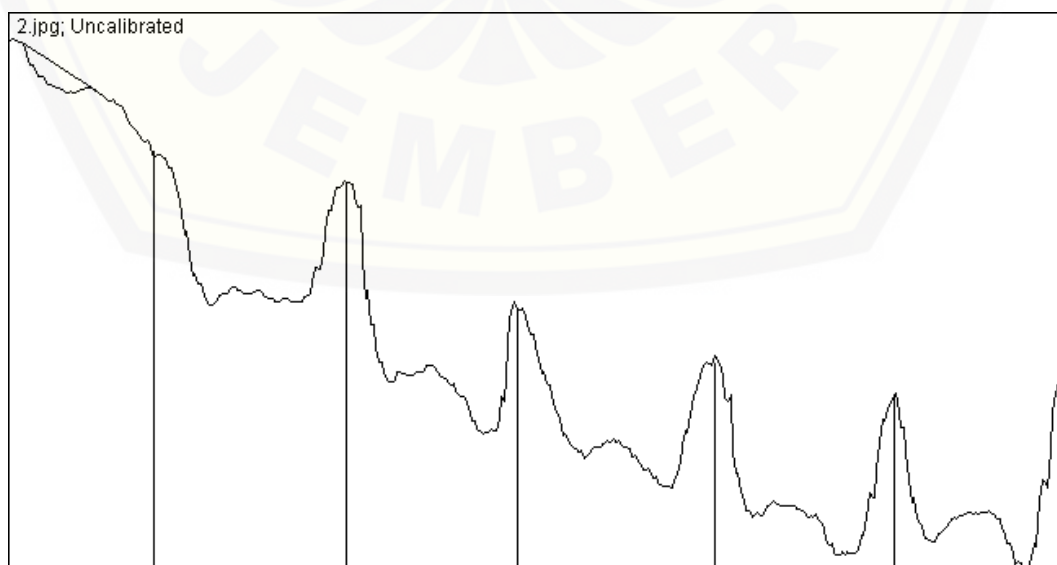


Gambar D.3 Hasil Zimografi Gel 3

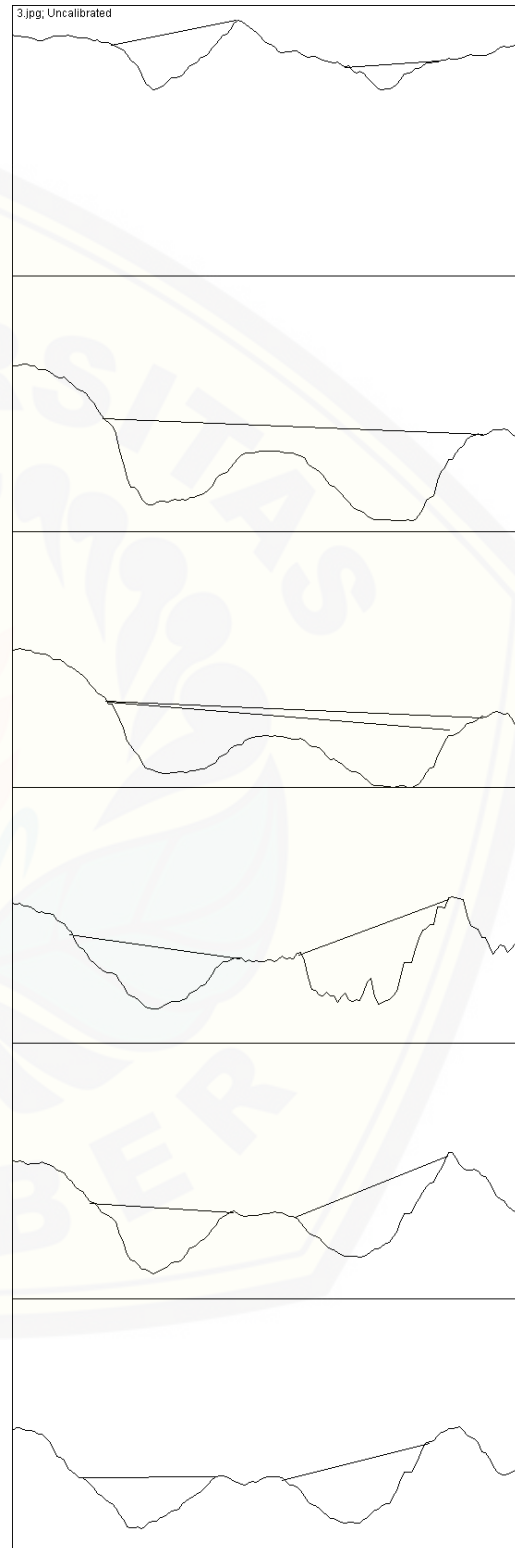


Gambar D.4 Hasil Zimografi Gel

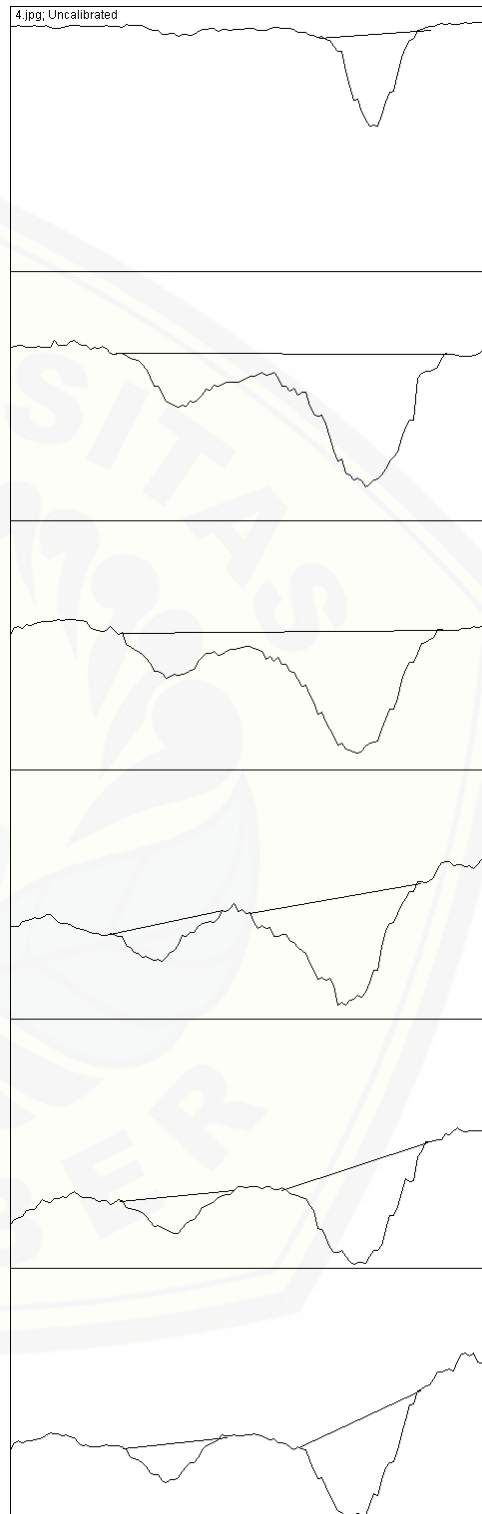
Lampiran E. Hasil Plot Image J MMP**E.1 Plot Image J Zimografi MMP-2 Gel 1****E.2 Plot Image J Zimografi MMP-2 Gel 2****E.3 Plot Image J Zimografi MMP-2 Gel 3**

E.4 Plot Image J Zimografi MMP-2 Gel 4**E.5 Plot Image J Zimografi MMP-9 Gel 1****E.6 Plot Image J Zimografi MMP-9 Gel 2**

E.7 Plot Image J Zimografi MMP-9 Gel 3

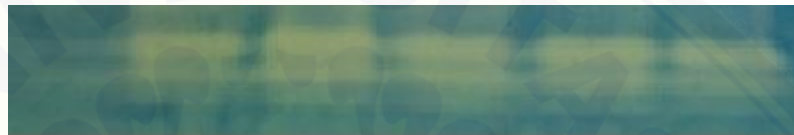


E.8 Plot Image J Zimografi MMP-9 Gel 4



Lampiran F. Hasil *Relative Optical Density*

ROD	0,000	1,000	0,975	0,824	0,813	0,506
Tx (10µg/ml)	-	+	+	+	+	+
Rosella (µg/ml)	-	-	50	100	200	250

Gambar F.1 Hasil *Relative Optical Density* MMP-2 Gel 1

ROD	0,000	1,000	0,845	0,792	0,730	0,597
Tx (10µg/ml)	-	+	+	+	+	+
Rosella (µg/ml)	-	-	50	100	200	250

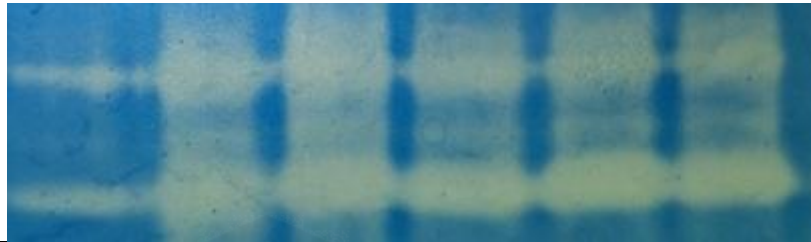
Gambar F.2 Hasil *Relative Optical Density* MMP-2 Gel 2

ROD	0,000	1,000	0,893		0,789	0,664	0,428
Tx (10µg/ml)	-	+	+		+	+	+
Rosella (µg/ml)	-	-	50		100	200	250

Gambar F.3 Hasil *Relative Optical Density* MMP-2 Gel 3

ROD	0,000	1,000	0,840		0,730	0,707	0,553
Tx (10µg/ml)	-	+	+		+	+	+
Rosella (µg/ml)	-	-	50		100	200	250

Gambar F.4 Hasil *Relative Optical Density* MMP-2 Gel 4



ROD	0,146	1,000	0,882	0,846	0,826	0,774
Tx (10 μ g/ml)	-	+	+	+	+	+
Rosella (μ g/ml)	-	-	50	100	200	250

Gambar F.5 Hasil *Relative Optical Density* MMP-9 Gel 1

ROD	0,019	1,000	0,603	0,482	0,225	0,194
Tx (10 μ g/ml)	-	+	+	+	+	+
Rosella (μ g/ml)	-	-	50	100	200	250

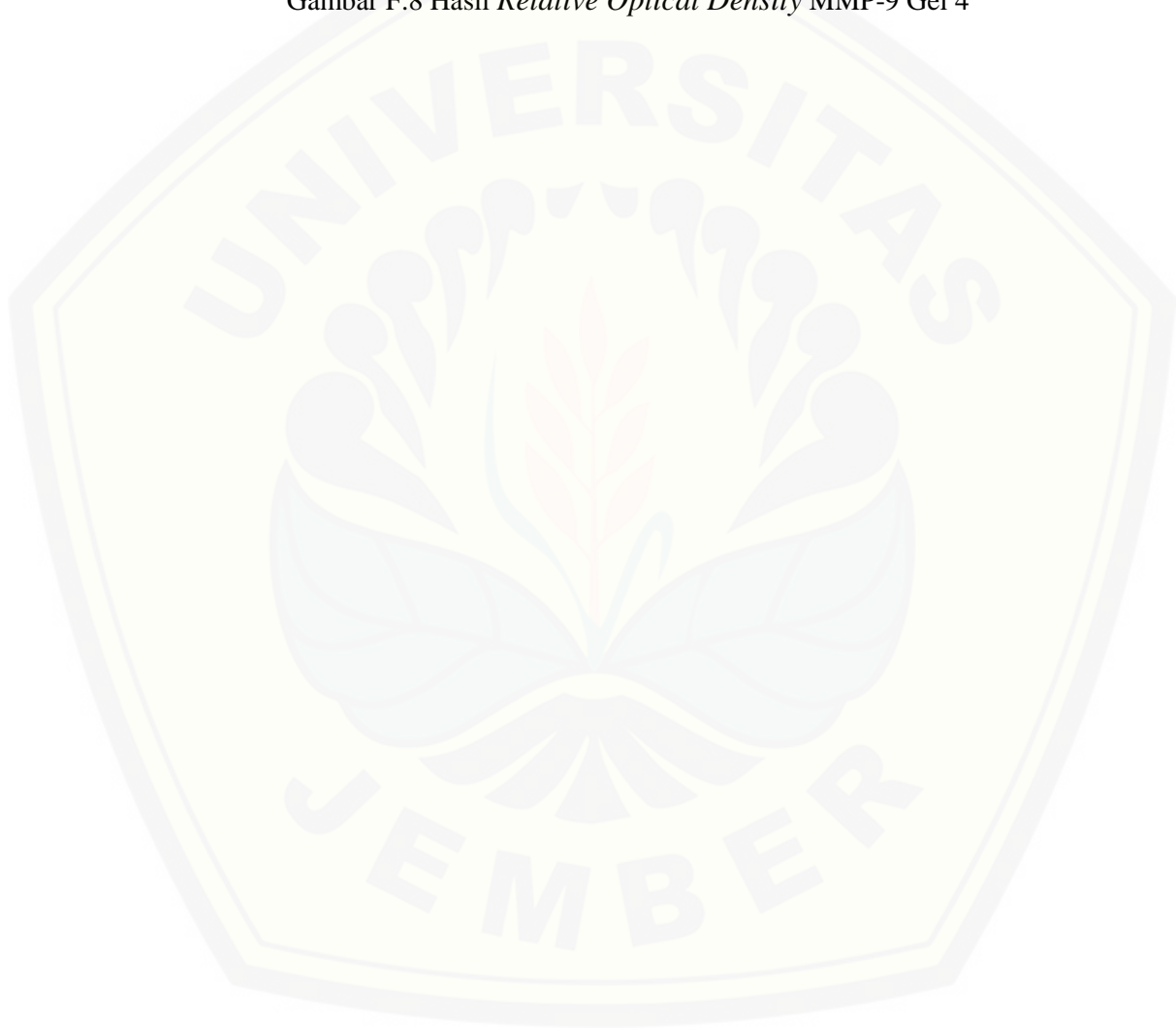
Gambar F.6 Hasil *Relative Optical Density* MMP-9 Gel 2

ROD	0,205	1,000	0,819		0,599	0,511	0,414
Tx (10 μ g/ml)	-	+	+		+	+	+
Rosella (μ g/ml)	-	-	50		100	200	250

Gambar F.7 Hasil *Relative Optical Density* MMP-9 Gel 3



ROD	0,251	1,000	0,906		0,660	0,581	0,514
Tx (10 μ g/ml)	-	+	+		+	+	+
Rosella (μ g/ml)	-	-	50		100	200	250

Gambar F.8 Hasil *Relative Optical Density* MMP-9 Gel 4

Lampiran G. Analisis Statistik

G.1 Analisis Statistik MMP-2

Uji Normalitas dan Homogenitas Data

Tests of Normality^{a,b}

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^c			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ROD	P1	,255	4	.	,864	4	,276
	P2	,303	4	.	,920	4	,539
	P3	,240	4	.	,959	4	,774
	P4	,171	4	.	,980	4	,905

a. ROD is constant when Kelompok = Kontrol normal. It has been omitted.

b. ROD is constant when Kelompok = Kontrol negatif. It has been omitted.

c. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variance^{a,b}

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
ROD	Based on Mean	,460	3	12	,715
	Based on Median	,463	3	12	,713
	Based on Median and with adjusted df	,463	3	11,350	,713
	Based on trimmed mean	,470	3	12	,709

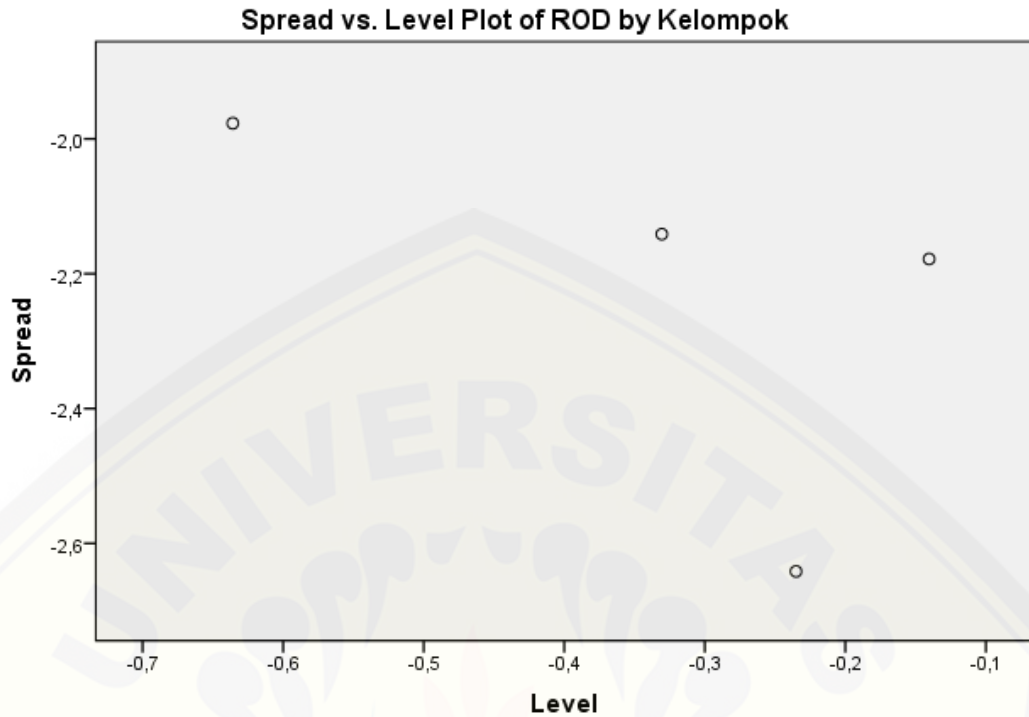
a. ROD is constant when Kelompok = Kontrol normal. It has been omitted.

b. ROD is constant when Kelompok = Kontrol negatif. It has been omitted.

Test of Homogeneity of Variances

ROD

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,977	5	18	,039



* Plot of LN of Spread vs LN of Level
Slope = -,772 Power for transformation = 1,772

Uji One Way ANOVA

Descriptives

ROD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol normal	4	,00000	,000000	,000000	,00000	,00000	,000	,000
Kontrol negatif	4	1,00000	,000000	,000000	1,00000	1,00000	1,000	1,000
P1	4	,88825	,062575	,031287	,78868	,98782	,840	,975
P2	4	,78375	,039178	,019589	,72141	,84609	,730	,824
P3	4	,72850	,062623	,031312	,62885	,82815	,664	,813
P4	4	,52100	,072282	,036141	,40598	,63602	,428	,597
Total	24	,65358	,337078	,068806	,51125	,79592	,000	1,000

ANOVA

ROD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,570	5	,514	211,239	,000
Within Groups	,044	18	,002		
Total	2,613	23			

Uji Post Hoc LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ROD

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol normal	Kontrol negatif	-1,00000 [*]	,034877	,000	-1,07327	-,92673
	P1	-,888250 [*]	,034877	,000	-,96152	-,81498
	P2	-,783750 [*]	,034877	,000	-,85702	-,71048
	P3	-,728500 [*]	,034877	,000	-,80177	-,65523
	P4	-,521000 [*]	,034877	,000	-,59427	-,44773
Kontrol negatif	Kontrol normal	1,000000 [*]	,034877	,000	,92673	1,07327
	P1	,111750 [*]	,034877	,005	,03848	,18502
	P2	,216250 [*]	,034877	,000	,14298	,28952
	P3	,271500 [*]	,034877	,000	,19823	,34477
	P4	,479000 [*]	,034877	,000	,40573	,55227
P1	Kontrol normal	,888250 [*]	,034877	,000	,81498	,96152
	Kontrol negatif	-,111750 [*]	,034877	,005	-,18502	-,03848
	P2	,104500 [*]	,034877	,008	,03123	,17777
	P3	,159750 [*]	,034877	,000	,08648	,23302
	P4	,367250 [*]	,034877	,000	,29398	,44052
P2	Kontrol normal	,783750 [*]	,034877	,000	,71048	,85702
	Kontrol negatif	-,216250 [*]	,034877	,000	-,28952	-,14298
	P1	-,104500 [*]	,034877	,008	-,17777	-,03123
	P3	,055250	,034877	,131	-,01802	,12852
	P4	,262750 [*]	,034877	,000	,18948	,33602
P3	Kontrol normal	,728500 [*]	,034877	,000	,65523	,80177
	Kontrol negatif	-,271500 [*]	,034877	,000	-,34477	-,19823
	P1	-,159750 [*]	,034877	,000	-,23302	-,08648

	P2	-,055250	,034877	,131	-,12852	,01802
	P4	,207500*	,034877	,000	,13423	,28077
P4	Kontrol normal	,521000*	,034877	,000	,44773	,59427
	Kontrol negatif	-,479000*	,034877	,000	-,55227	-,40573
	P1	-,367250*	,034877	,000	-,44052	-,29398
	P2	-,262750*	,034877	,000	-,33602	-,18948
	P3	-,207500*	,034877	,000	-,28077	-,13423

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

G.2 Analisis Statistik MMP-9

Uji Normalitas dan Homogenitas Data

Tests of Normality^b

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ROD	Kontrol normal	,213	4	.	,946	4	,690
	P1	,298	4	.	,838	4	,189
	P2	,215	4	.	,978	4	,889
	P3	,210	4	.	,983	4	,920
	P4	,184	4	.	,993	4	,974

a. Lilliefors Significance Correction

b. ROD is constant when Kelompok = Kontrol negatif. It has been omitted.

Test of Homogeneity of Variance^a

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
ROD	Based on Mean	,632	4	15	,648
	Based on Median	,604	4	15	,666
	Based on Median and with adjusted df	,604	4	11,457	,667
	Based on trimmed mean	,635	4	15	,646

a. ROD is constant when Kelompok = Kontrol negatif. It has been omitted.

Test of Homogeneity of Variances

ROD

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,623	5	18	,205

Uji One Way ANOVA

Descriptives

ROD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Kontrol normal	4		
Kontrol negatif	4	1,00000	,000000	,000000	1,00000	1,00000	1,000	1,000
P1	4	,80250	,137967	,068984	,58296	1,02204	,603	,906
P2	4	,64675	,151985	,075993	,40491	,88859	,482	,846
P3	4	,53575	,247299	,123650	,14224	,92926	,225	,826
P4	4	,47400	,240555	,120277	,09122	,85678	,194	,774
Total	24	,60238	,309110	,063097	,47185	,73290	,019	1,000

ANOVA

ROD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,684	5	,337	11,799	,000
Within Groups	,514	18	,029		
Total	2,198	23			

Uji Post Hoc LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: ROD

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
	Kontrol negatif	-,844750*	,119463	,000	-1,09573	-,59377
	P1	-,647250*	,119463	,000	-,89823	-,39627
Kontrol normal	P2	-,491500*	,119463	,001	-,74248	-,24052
	P3	-,380500*	,119463	,005	-,63148	-,12952
	P4	-,318750*	,119463	,016	-,56973	-,06777
Kontrol negatif	Kontrol normal	,844750*	,119463	,000	,59377	1,09573
	P1	,197500	,119463	,116	-,05348	,44848

	P2	,353250*	,119463	,008	,10227	,60423
	P3	,464250*	,119463	,001	,21327	,71523
	P4	,526000*	,119463	,000	,27502	,77698
P1	Kontrol normal	,647250*	,119463	,000	,39627	,89823
	Kontrol negatif	-,197500	,119463	,116	-,44848	,05348
	P2	,155750	,119463	,209	-,09523	,40673
	P3	,266750*	,119463	,038	,01577	,51773
	P4	,328500*	,119463	,013	,07752	,57948
P2	Kontrol normal	,491500*	,119463	,001	,24052	,74248
	Kontrol negatif	-,353250*	,119463	,008	-,60423	-,10227
	P1	-,155750	,119463	,209	-,40673	,09523
	P3	,111000	,119463	,365	-,13998	,36198
	P4	,172750	,119463	,165	-,07823	,42373
P3	Kontrol normal	,380500*	,119463	,005	,12952	,63148
	Kontrol negatif	-,464250*	,119463	,001	-,71523	-,21327
	P1	-,266750*	,119463	,038	-,51773	-,01577
	P2	-,111000	,119463	,365	-,36198	,13998
	P4	,061750	,119463	,612	-,18923	,31273
P4	Kontrol normal	,318750*	,119463	,016	,06777	,56973
	Kontrol negatif	-,526000*	,119463	,000	-,77698	-,27502
	P1	-,328500*	,119463	,013	-,57948	-,07752
	P2	-,172750	,119463	,165	-,42373	,07823
	P3	-,061750	,119463	,612	-,31273	,18923

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran H. Dokumentasi Penelitian



Toksin ubur-ubur yang telah diisolasi



Bahan-bahan zimografi



Sample penelitian yang telah diinkubasi

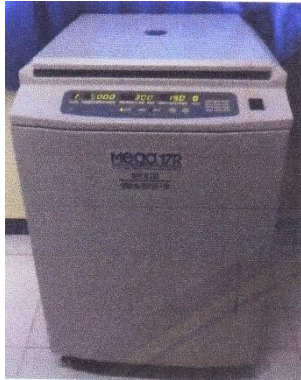


Proses pembuatan gel

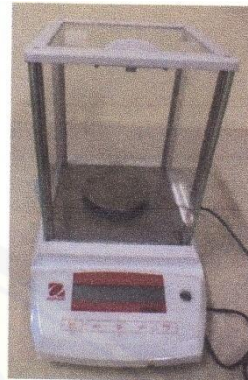


Proses elektroforesis

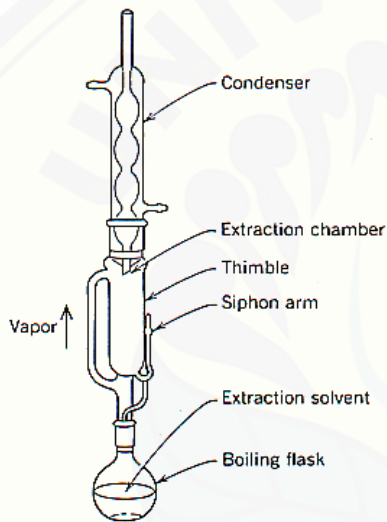
Alat Penelitian



Sentrifuge



Neraca Ohaus



Soxhlet ekstraktor



Spektrofotometer



Vortex



Mikropipet



Blue tip dan yellow tip