

PENGARUH EKSTRAK ETANOL BAWANG PUTIH TUNGGAL (*ALLIUM SATIVUM L.*) TERHADAP VIABILITAS SEL PBMC YANG TERPAPAR HIDROGEN PEROKSIDA SECARA IN VITRO

Joshua Ezra Ronaldo Bayak¹, I. G. K. Nyoman Arijana², I. G. A. Dewi Ratnayanti², I Wayan Sugiritama²

¹Program Studi Sarjana Kedokteran dan Profesi Dokter,
Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

²Bagian Histologi, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

Koresponding : Joshua Ezra Ronaldo Bayak

Email: bykjoshua@student.unud.ac.id

ABSTRAK

Kematian sel merupakan salah satu akibat dari kerusakan DNA yang disebabkan oleh *reactive oxygen species* (ROS). Bawang putih tunggal diketahui memiliki banyak kandungan antioksidan yang berpotensi untuk mencegah kematian sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ekstrak etanol bawang putih tunggal dapat mencegah kematian sel PBMC yang disebabkan oleh H₂O₂ yang merupakan ROS. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan kultur PBMC yang berjumlah 25 sumur dikelompokkan menjadi 5 kelompok, yakni P0 (normal salin), P1 (H₂O₂ 0,3%), P2, P3, dan P4 (H₂O₂ 0,3% dan ekstrak etanol bawang putih tunggal dengan dosis masing-masing 5%, 10%, dan 20%). Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C CO₂ 5% selama 1 jam dan kemudian dipanen dan dilakukan perhitungan jumlah sel. Analisis data dilakukan dengan program SPSS. Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan jumlah sel PBMC viabel antara P1 dan P3 sebesar -145.000 (IK95% -170.970,04 – (-119.029,96)), dan antara P1 dan P4 sebesar -20.000 (IK95% -45.970,03 – 5.970,03). Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol bawang putih tunggal dengan dosis 10% dapat mencegah kematian sel akibat paparan radikal bebas, tetapi dosis 20% menyebabkan efek toksik terhadap PBMC.

Kata kunci: viabilitas sel, ROS, bawang putih tunggal, PBMC

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) can cause DNA damage and eventually cellular death. Garlic is known to possess antioxidant properties which have the potential to prevent cellular death. This research aims to know whether garlic is able to prevent PBMC death caused by H₂O₂ which is a ROS. This is an experimental research using 25 wells of PBMC grouped into 5 groups, which are P0 (normal saline), P1 (H₂O₂ 0,3%), P2, P3, and P4 (H₂O₂ 0,3% and single garlic ethanol extract with doses of 5%, 10%, and 20%, respectively). Samples are then incubated on 37°C CO₂ 5% for an hour, then extracted and went for cell viability count. Data analysis is done by SPSS program. Results show that there are differences in number of viable PBMC cells between P1 and P3 for -145,000 (95%CI -170,970.04 – (-119,029.96), and between P1 and P4 for -20,000 (95%CI -45,970.03 – 5,970.03). It can be concluded that single garlic ethanol extract with dose of 10% can prevent cellular death due to free radical exposure, but dose of 20% causes toxic effects to PBMC.

Keywords: cell viability, ROS, single garlic, PBMC

PENDAHULUAN

Radikal bebas memberikan banyak pengaruh yang berhubungan bukan hanya dengan proses penuaan, tetapi juga penyakit degenerative yang

dapat dijumpai pada masyarakat lanjut usia. Hasil dari penelitian-penelitian sebelumnya juga mendukung pernyataan dimana radikal bebas mempunyai peran pada penuaan, tetapi

penggunaan antioksidan dapat menghambat kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas¹. Salah satu contoh dari radikal bebas yang dapat diamati adalah hidrogen peroksida (H_2O_2)².

Radikal bebas dapat ditangkal atau diredam dengan antioksidan. Cara kerja dari antioksidan adalah memberikan salah satu elektronnya kepada radikal bebas yang mempunyai elektron yang tidak berpasangan agar radikal bebas tersebut menjadi stabil³.

Hingga saat ini berbagai penelitian telah dilakukan untuk menilai kemampuan suatu bahan untuk mengatasi penuaan, termasuk diantaranya bahan-bahan herbal, contohnya

Tabel 1. Hasil Analisis Deskriptif

Kelompok	Jumlah Rerata	Standar Error	95% Interval Kepercayaan		Standar Deviasi
			Batas Bawah	Batas Atas	
P0	275.000	7.905,69	253.050,27	296.949,72	17.677,66
P1	100.000	7.905,69	78.050,27	121.949,72	17.677,66
P2	105.000	9.354,14	79.028,73	130.971,26	20.916,50
P3	245.000	9.354,14	219.028,73	270.971,22	20.916,50
P4	120.000	9.354,14	94.028,73	145.971,26	20.916,50

bawang putih. Bawang putih sudah menjadi barang yang tidak asing bagi masyarakat Indonesia, dan tidak hanya berfungsi sebagai bahan masakan tetapi juga memiliki fungsi untuk kesehatan tubuh. Bawang putih memiliki banyak metabolic sekunder yang membentuk sebuah sistem kimiawi yang kompleks dan juga merupakan mekanisme imun terhadap mikroorganisme dan faktor eksternal lainnya⁴. Bawang putih memiliki beberapa kandungan penting yang memiliki peran sebagai antioksidan, seperti fenol, flavonoid, dan proantiosianidin yang memiliki berbagai peran untuk menangkal radikal bebas⁵.

Secara spesifik terdapat suatu bahan alami pada bawang putih yang memiliki banyak manfaat, yakni alisin. Alisin diketahui memiliki manfaat untuk menghambat proliferasi sel kanker, siklus sel, bahkan apoptosis⁶. Bawang putih tunggal memiliki jenis senyawa organosulfur yang berbeda dibandingkan dengan bawang putih biasa, yaitu dalam bentuk di-2-prophenyl (CAS) Allyl trisulfide⁷.

Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk meneliti pengaruh ekstrak etanol bawang putih tunggal pada viabilitas sel PBMC yang terpapar hidrogen peroksida secara *in vitro*.

Penelitian ini telah mendapatkan kelaikan etik dengan nomor 550/UN14.2.2/PD/KEP/2018 dari Komisi Etika Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah Denpasar.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini adalah eksperimental murni dengan pola *Post Test Only Control Group Design* pada kultur *in vitro*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana pada bulan Januari 2018 hingga bulan Oktober 2018.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah darah vena manusia. Dengan perhitungan berdasarkan rumus Frederer, penelitian ini menggunakan lima kelompok perlakuan dengan lima sumur tiap kelompok. Kelompok P0 merupakan kelompok perlakuan negatif dengan paparan normal salin. Kelompok P1 merupakan

kelompok perlakuan positif dengan paparan H_2O_2 0,3%. Pada kelompok P2, P3, dan P4 diberi paparan H_2O_2 0,3% dan ekstrak etanol bawang putih tunggal dengan variasi dosis masing-masing 5%, 10%, dan 20%.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol bawang putih tunggal dengan dosis 5% pada P2, 10% pada P3, dan 20% pada P4. Variabel tergantung adalah viabilitas sel, dan variabel kendali adalah PBMC, lingkungan, dan paparan H_2O_2 .

Ekstrak etanol bawang putih tunggal sebanyak 50mL diperoleh dengan cara melarutkan ekstrak bawang putih tunggal pada larutan etanol 96% yang kemudian dikeringkan dan dikonsentrasikan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu $60^{\circ}\pm 10^{\circ}C$.

Isolasi PBMC dilakukan dengan cara mengambil 3 cc darah vena cubiti yang ditampung dalam tabung EDTA 15 ml yang sudah berisi 3 cc Histopaque. Darah kemudian disentrifugasikan pada kecepatan 2500 rpm selama 10 menit sehingga muncul 3 lapisan. Lapisan tengah diambil dan dipindahkan ke tabung 15 ml yang baru dan disentrifugasikan kembali pada kecepatan 2500 rpm selama 10 menit hingga *pellet* berwarna putih tampak.

HASIL

Hasil analisis deskriptif dapat dilihat pada Tabel 1. Proses analisis data kemudian dilanjutkan dengan uji normalitas data, dan didapatkan hasil sesuai Tabel 2.

Setelah itu analisis data dilanjutkan dengan uji homogenitas dan didapatkan angka signifikansi sebesar 0,826. Hal ini berarti bahwa data-data tersebut homogen. Analisis data kemudian dilanjutkan dengan tes ANOVA, dan didapatkan angka signifikansi sebesar 0,000.

Selanjutnya dilakukan uji *post hoc* untuk mengetahui perbedaan rerata antar kelompok setelah intervensi. Hasil uji *post hoc* dapat dilihat pada Tabel 3.

PEMBAHASAN

Dari Tabel 1 dapat diketahui bahwa jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (P0), maka viabilitas sel menurun pada semua kelompok percobaan, namun kelompok P3 menunjukkan hasil yang paling mendekati dengan kelompok kontrol.

Untuk perbandingan antara kelompok P0 dan P1 didapatkan perbedaan jumlah sel viabel sebesar 63,63%. Ini berarti pada kelompok P1 terdapat penurunan jumlah sel viabel sebanyak 63,63% dibandingkan dengan kelompok P0. Pengurangan ini disebabkan oleh adanya paparan H₂O₂ pada PBMC.

Tabel 2. Uji Normalitas Shapiro Wilk

Kelompok	Statistics	df	Sig.
P0	0,883	5	0,325
P1	0,883	5	0,325
P2	0,881	5	0,314
P3	0,881	5	0,314
P4	0,552	5	0,314

Selanjutnya, untuk perbandingan antara kelompok P0 dan P2 didapatkan perbedaan jumlah sel viabel sebesar 61,81%. Meskipun rerata jumlah sel viabel pada kelompok P2 lebih pendek dibandingkan dengan kelompok P0, jika dibandingkan dengan kelompok P1 (tanpa adanya intervensi ekstrak etanol bawang putih tunggal) maka terdapat perbaikan sebesar 1,82%, meskipun masih tidak terdapat perbedaan signifikan antara kelompok P1 dan P2.

Kemudian untuk perbandingan antara kelompok P0 dan P3 didapatkan perbedaan rerata sebesar 10,90%, sedangkan perbandingan antara kelompok P1 dan P3 adalah sebesar -52,72%, ini berarti terdapat perbaikan dalam jumlah sel viabel sebesar 52,72% pada kelompok P3 dibandingkan dengan kelompok P1.

Selanjutnya, untuk perbandingan antara kelompok P0 dan P4 didapatkan perbedaan rerata sebesar 56,36%, dan antara kelompok P1 dan P4 sebesar -7,27%.

Dari Tabel 3 dapat dilihat bahwa perbedaan efek yang ditimbulkan tidak terjadi pada semua kelompok yang dapat dilihat di kolom perbedaan rerata. Ekstrak etanol bawang putih tunggal

dengan dosis 10% (P3) merupakan dosis yang paling efektif dibandingkan dosis 5% dan 20% untuk menghambat penurunan jumlah sel viabel yang disebabkan oleh stres oksidatif, dalam hal ini hidrogen peroksida dengan *p value* sebesar 0,00 (IK95% -170.970,04 – (-119,029,96)).

Penjelasan di atas menunjukkan bahwa hipotesis-hipotesis penelitian terbukti benar, dimana penggunaan ekstrak etanol bawang putih tunggal bisa mencegah menurunnya jumlah sel PBMC viabel yang terpapar H₂O₂, dimana efek ekstrak etanol bawang putih tunggal yang terbaik ditunjukkan oleh kelompok P3 dengan dosis ekstrak etanol bawang putih tunggal sebesar 10%, sedangkan pemberian dosis ekstrak etanol bawang putih tunggal sebesar 20% menunjukkan adanya toksisitas pada sel PBMC. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa antioksidan sebelumnya menunjukkan bahwa antioksidan tokotrienol, karotenoid, dan flavonoid dapat mencegah kerusakan DNA atau memperkuat mekanisme perbaikan DNA yang dapat menyebabkan kematian sel^{5,8}.

Pembentukan ROS dapat disebabkan oleh paparan sinar UV yang berlebihan. Sebuah penelitian menyimpulkan bahwa bawang putih dapat menghambat penuaan selular pada keratinosit manusia yang terekspos dengan sinar UV, dengan cara menurunkan aktivitas SA-β-gal dan SIRT1, ekspresi MMP-1, dan pembentukan ROS oleh radiasi sinar UV⁹.

Paparan sinar UVB dapat menyebabkan ekspresi NF-kB yang bertanggung jawab atas ekspresi sitokin inflamasi TNF-α, IL-1β, dan C-reactive protein yang berlebihan. Sitokin-sitokin ini memiliki peran penting akan ekspresi MMP-1. Namun, polifenol pada bawang putih dapat menyebabkan supresi sitokin IL-1β dan IL-6. Selain itu, alisin dapat menghambat sekresi TNF-α juga. Dialil disulfida, dialil trisulfida, dan S-allyl cysteine dapat menghambat *signalling pathway* dari NF-kB dan MAPK⁹.

Penelitian yang lain menunjukkan bahwa

Tabel 3. Uji *Post Hoc* LSD

Uji <i>Post Hoc</i>	Perbedaan Rerata	P (IK95%)
P0 vs P1	175.000*	0,00(149.029,96 – 200.970,03)
P0 vs P2	170.000*	0,00 (144.029,96 – 195.970,03)
P0 vs P3	30.000*	0,02 (4.029,96 – 55.970,03)
P0 vs P4	155.000*	0,00 (129.029,96 – 180.970,03)
P1 vs P2	-5.000	0,69 (-30.970,03 – 20.970,03)
P1 vs P3	-145.000*	0,00 (-170.970,04 – (-119.029,96))
P1 vs P4	-20.000	0,12 (-45.970,03 – 5.970,03)
P2 vs P3	-140.000*	0,00 (-165,970,04 – (-114.029,96))
P2 vs P4	-15.000	0,24 (-40.970,03 – 10.970,03)
P3 vs P4	125.000*	0,00 (99.029,96 – 150.970,03)

* p signifikan pada angka <0,05

bawang putih tunggal mampu menghambat aktivasi dari NF-kB dimana aktivitas abnormal dari NF-kB yang diinisiasi oleh adanya stres oksidatif dapat menyebabkan pemendekan telomer dan kematian sel¹⁰.

Akan tetapi bawang putih tunggal dengan dosis yang tinggi dapat memberikan efek toksis yang menyebabkan pemendekan telomer dan kematian sel. Sebuah penelitian menyimpulkan bahwa sebuah komponen pada bawang putih, yakni dialil disulfida (DADS) dan alisin dapat menghambat ekspresi *human telomerase reverse transcriptase* (hTERT) sehingga aktivitas telomerase menjadi terinhibisi. Inhibisi dari aktivitas telomerase akan menyebabkan pemendekan telomer^{6,11}.

Penelitian ini memiliki beberapa kelebihan, antara lain sampel yang digunakan adalah sampel darah dari manusia sehingga dapat memberikan hasil yang akurat, dan bahan yang digunakan yakni bawang putih tunggal merupakan bahan yang mudah diperoleh, tidak hanya di Indonesia tetapi di Asia Tenggara secara umumnya dan telah dikenal akan khasiatnya dari masa ke masa.

Namun, penelitian ini juga memiliki beberapa kelemahan, salah satunya penelitian ini hanyalah bersifat *in vitro*, sehingga diperlukan penelitian lanjut untuk menilai efek ekstrak etanol bawang putih secara *in vivo*. Selain itu, perlakuan hanya dilaksanakan dalam jangka waktu yang pendek, sehingga pengaruh jangka panjang dari ekstrak etanol bawang putih tunggal belum diketahui secara pasti.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol bawang putih tunggal

(*Allium sativum L.*) dapat mencegah pemendekan telomer manusia yang terpapar hydrogen peroksida. Selain itu, dosis yang berbeda memberikan efek yang berbeda pula, dimana dosis 5% dan 10% memberikan efek protektif sedangkan dosis 20% memberikan efek toksis terhadap jumlah sel PBMC viabel yang terpapar hydrogen peroksida.

SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat disampaikan adalah diperlukan penelitian lanjutan untuk menilai efek ekstrak etanol bawang putih tunggal secara *in vivo* dan dalam jangka waktu yang lebih panjang untuk menilai toksisitas yang dapat ditimbulkan. Selain itu, mekanisme pertahanan antioksidan dan toksisitas dari bawang putih tunggal pun belum terlalu dimengerti sehingga ada baiknya jika terdapat penelitian lanjutan yang berdasarkan pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pangkahila W. Anti-Aging: Tetap muda dan sehat. Jakarta: Kompas; 2011.
2. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* [Internet]. 2003 Oct 1;552(2):335–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7793.2003.00335.x>
3. Winarsi H. Antioksidan Alami dan Radikal. Kanisius; 2005.
4. Hernawan UE, Setyawan AD. Senyawa organo-sulfur bawang putih (*Allium sativum L.*) dan aktivitas biologinya. *Biofarmasi*. 2003;1(2):65–76.

5. Chekki RZ, Snoussi A, Hamrouni I, Bouzouita N. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of Tunisian garlic (*Allium sativum*) essential oil and ethanol extract. *Mediterr J Chem.* 2014;3(4):947–56.
6. Sun L, Wang X. Effects of allicin on both telomerase activity and apoptosis in gastric cancer SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol.* 2003;9(9):1930–4.
7. Ratnayanti IGAD. No Title. Unpublished data.
8. Marcon F, Siniscalchi E, Crebelli R, Saieva C, Sera F, Fortini P, dkk. Diet-related telomere shortening and chromosome stability. *Mutagenesis.* 2012 Jan;27(1):49–57.
9. Kim HK. Protective effect of garlic on cellular senescence in UVB-exposed HaCaT human keratinocytes. *Nutrients.* 2016;8(8):464.
10. Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr.* 2001 Mar;131(3s):1010S–5S.
11. Dasgupta P, Sengupta SB. Role of diallyl disulfide-mediated cleavage of c-Myc and Sp-1 in the regulation of telomerase activity in human lymphoma cell line U937. *Nutrition.* 2015;31(7–8):1031–7.