



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PENGARUH ASPARTAM  
TERHADAP  
AKTIVITAS SIKLOOKSIGENASE TIKUS**

**TESIS**

**OLEH :  
MARINA ASTRID RUMAWAS  
NPM : 6104010074**

**KEKHUSUSAN FARMAKOLOGI  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA  
JAKARTA  
2007**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PENGARUH ASPARTAM  
TERHADAP  
AKTIVITAS SIKLOOKSIGENASE TIKUS**

**TESIS**

**OLEH :  
MARINA ASTRID RUMAWAS  
NPM : 6104010074**

**KEKHUSUSAN FARMAKOLOGI  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA  
JAKARTA  
2007**

**PENGARUH ASPARTAM TERHADAP  
AKTIVITAS SIKLOOKSIGENASE TIKUS**

**OLEH :  
MARINA ASTRID RUMAWAS  
NPM : 6104010074**

**TESIS  
untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar  
MAGISTER ILMU BIOMEDIK (M.Biomed)**

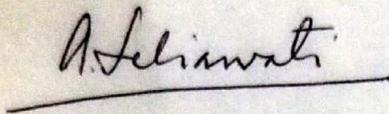
**pada**

**KEKHUSUSAN FARMAKOLOGI  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA  
JAKARTA  
2007**

**PENGARUH ASPARTAM TERHADAP  
AKTIVITAS SIKLOOKSIGENASE TIKUS**

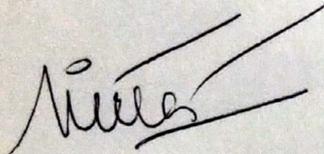
Marina Astrid Rumawas  
NPM : 6104010074

Telah disetujui :



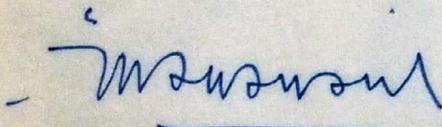
Prof. dra. Arini Setiawati, PhD

Pembimbing I



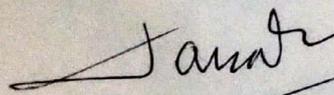
Dra. Metta Sintia Sari Wiria, MS

Pembimbing II



DR.rer.physiol.dr. Septelia Inawati Wanandi

KPS PMIB FKUI



Prof.DR.dr. Siti Aisah, SpKK(K)

Wakil Dekan I FKUI



Dr. Menaldi Rasmin, Sp.P(K), FCCP

Dekan FKUI

## ABSTRAK

**Latar belakang** : Aspartam adalah suatu pemanis sintetik yang telah dipergunakan secara luas sebagai *food additive* oleh lebih dari 6000 produk di dunia selama lebih dari 30 tahun. Sebagai pemanis sintetik, aspartam kira-kira 200 kali lebih manis dari sukrosa. Sebagai *food additive*, penggunaan aspartam di berbagai negara diawasi melalui penetapan *Acceptable Daily Intake* ( ADI ). Walau demikian, banyak kalangan masih mempertanyakan keamanannya. Belum lama ini, beberapa orang peneliti menemukan bahwa aspartam memiliki efek *aspirin-like* dan mengarahkan penelitian aspartam ke arah tersebut. Belum jelas benar bagaimana mekanisme kerja aspartam menimbulkan efek *aspirin-like*.

**Tujuan** : Meneliti efek aspartam terhadap aktivitas siklooksigenase dengan mengukur kadar serum tromboksan B<sub>2</sub> sebagai produk akhir reaksi yang diperantarainya dan melihat efeknya terhadap pertumbuhan granuloma sebagai bentuk inflamasi kronis pada tikus jantan galur *Sprague-Dawley*.

**Metode** : Tikus jantan normal galur *Sprague-Dawley* diinduksi udara dan karageenan 2% subkutan sehingga terbentuk granuloma subkutan. Tikus bergranuloma diberi aspartam 3 hari berturut-turut. Kadar tromboksan B<sub>2</sub> diukur sebelum dan sesudah pemberian aspartam menggunakan metode ELISA. Hambatan pertumbuhan granuloma diamati dengan menimbang granuloma segar.

**Hasil** : Aspartam murni yang diberikan selama 3 hari berturut-turut cenderung menghambat kenaikan kadar serum tromboksan B<sub>2</sub>, yaitu sebesar 51,26 % untuk kelompok dengan 10 kali dosis ADI (40 mg/kgBB) dan 48,77 % untuk kelompok dengan 20 kali dosis ADI, dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Dengan dosis yang sama, aspartam tidak mampu menahan pertumbuhan granuloma. Kedua uji tidak menunjukkan kemaknaan statistik.

**Kesimpulan** : Aspartam mungkin menekan aktivitas siklooksigenase, karena aspartam cenderung mengurangi kenaikan kadar tromboksan B<sub>2</sub>. Namun aspartam tampaknya tidak mempunyai efek terhadap pertumbuhan granuloma ( inflamasi kronis ).

**Kata kunci** : aspartam, *aspirin-like*, tromboksan B<sub>2</sub>, granuloma

## ABSTRACT

**Background :** Aspartame is a synthetic sweetener which has been widely used in more than 6000 products for more than 30 years. As a sweetener, it is about 200 folds sweeter than sucrose. The consumption of aspartame as a food additive is regulated by determining Acceptable Daily Intake ( ADI ) in many countries in the world. However, its safety has been questioned by many levels of communities.

Recently, some scientists have found that aspartame have an aspirin-like effect and some studies are directed to this finding. However, the mechanism of aspartame in producing the aspirin-like effect is not yet clear.

**Objectives :** To study the effect of aspartame on cyclooxygenase activity by measuring the serum thromboxane B<sub>2</sub> level as the end product of this enzymatic reaction. Additionally, the study is aimed to see the effect of aspartame on the growth of granuloma as a result of chronic inflammation at the *Sprague-Dawley* male rats.

**Methods :** Normal male Sprague-Dawley rats were subcutaneously injected with air and 2% of carageenan to induce subcutaneous granuloma. Aspartame was administered once daily for 3 days. The serum level of thromboxane B<sub>2</sub> was measured before and after aspartame administration by ELISA. The effect of aspartame on granuloma was measured by weighing the isolated fresh granuloma.

**Results:** Three days administration of pure aspartame 10 and 20 times of ADI (40 mg/kgBW) tended to inhibit the serum concentration of thromboxane B<sub>2</sub> by 51,26 % and 48,77 %, respectively, compared to the negative control. At the same dose, aspartame had no inhibition effect on the granuloma. Both results were not statistically significant.

**Conclusion :** Aspartame may have an inhibition effect on cyclooxygenase activity, since it tends to decrease the serum thromboxane B<sub>2</sub> level. However, aspartame seems to have no effect on the growth of granuloma (chronic inflammation)

**Key words :** aspartame, aspirin-like, thromboxane B<sub>2</sub>, granuloma

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah YME, atas segala kekuatan, berkat dan karunia yang diberikanNya sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian ini sebagai salah satu kelengkapan dalam menyelesaikan program pendidikan Magister Ilmu Biomedik Kekhususan Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini perkenankan saya menyampaikan rasa hormat dan terima kasih setulus-tulusnya kepada pihak berikut, atas bantuan yang selama ini saya terima dalam menempuh pendidikan di Kekhususan Farmakologi, Program Magister Ilmu Biomedik, FKUI.

Para Guru Besar dan staf pengajar di lingkungan Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI yang telah memberikan bimbingan dan teladan selama saya mengikuti pendidikan di Kekhususan Farmakologi.

Prof. dr. Hedi R. Dewoto, SpFK selaku Ketua Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI yang telah memberikan kesempatan menerima saya sebagai anak didik untuk menerima bimbingan dan teladannya.

Prof. dra. Arini Setiawati, PhD selaku Ketua Program Studi Kekhususan Farmakologi, Program Magister Ilmu Biomedik, FKUI dan pembimbing penelitian saya yang telah memberikan kesempatan kepada saya menyelesaikan pendidikan saya ini dan dengan penuh kesabaran dan ketulusan hati memberi bimbingan langsung dalam penelitian akhir ini, sejak awal hingga selesainya penelitian ini.

dra. Metta Sinta Sari Wiria, MS, Apt, selaku pembimbing penelitian saya yang dengan penuh kesabaran dan ketulusan hati memberi bimbingan langsung dalam penelitian akhir ini, sejak awal hingga selesainya penelitian ini.

Prof. dr. Moh. Sakidin, DSc, selaku Ketua Program Magister Ilmu Biomedik FKUI terdahulu yang telah memberikan bimbingan, dukungan dan teladannya.

Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi, selaku Ketua Program Magister Ilmu Biomedik saat ini, yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan di Program Magister Ilmu Biomedik FKUI.

Seluruh staf laboratorium Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI yang turut membantu penelitian ini sejak awal hingga selesainya penelitian ini.

Seluruh staf Makmal Terpadu FKUI yang turut membantu penelitian ini sejak awal hingga selesainya penelitian ini.

Kedua orang tua saya yang telah membesarkan, mendidik dan membimbing saya hingga saya dapat menjadi seperti sekarang ini serta dukungan moril dan materiil selama saya mengikuti pendidikan di Kekhususan Farmakologi Program Magister Ilmu Biomedik FKUI.

Kepada suami tercinta, dr. Agus Dharmawan Saldjani, MK3 dan kedua puteraku tercinta, Ariel Tristan Saldjani dan Adriel Mathias Saldjani yang telah begitu besar pengorbanannya merelakan istri dan ibunda tercinta mengikuti pendidikan Magister Ilmu Biomedik FKUI.

Kakak saya dan kedua adik saya tercinta yang senantiasa mendoakan dan mendukung saya selama mengikuti pendidikan di Program Magister Ilmu Biomedik FKUI.

Kepada almarhum dr. Charlie Hartadi, SpFK dan keluarga yang senantiasa mendukung saya mengikuti pendidikan di Program Magister Ilmu Biomedik FKUI.

Kepada rekan-rekan saya di Departemen Farmakologi FK UKRIDA yang telah memberikan kesempatan dan senantiasa memberi dukungan kepada saya selama mengikuti pendidikan.

Kepada Bapak Dekan dan staf serta rekan-rekan di FK UKRIDA yang telah memberikan kesempatan dan senantiasa memberi dukungan kepada saya selama mengikuti pendidikan.

Kepada Kepala Sekolah serta rekan-rekan guru di SMF BPK Penabur yang senantiasa memberi dukungan kepada saya selama mengikuti pendidikan.

Akhir kata saya senantiasa berdoa kepada Allah YME kiranya memberikan rahmat dan karunianya yang berlimpah kepada segala pihak tersebut, atas semua budi baik yang telah diberikan kepada saya. Saya senantiasa mengharapkan nasehat dan bimbingan selanjutnya.

Semoga bekal ilmu dan teladan yang telah saya dapatkan selama pendidikan ini serta hasil penelitian ini, berguna bagi kehidupan saya khususnya serta bagi masyarakat umumnya. Amin.

## DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK .....	i
ABSTRACT.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
DAFTAR SINGKATAN.....	xii
<b>BAB I        PENDAHULUAN</b>	
1. Latar belakang dan permasalahan .....	1
2. Rumusan masalah .....	3
3. Tujuan penelitian .....	4
4. Hipotesis .....	4
5. Kerangka teori .....	5
6. Kerangka konsep .....	6
7. Manfaat penelitian .....	6
<b>BAB II        TINJAUAN PUSTAKA</b>	
1. Aspartam .....	7
1.1. Sifat fisik dan kimia aspartam .....	7
1.2. Metabolisme aspartam .....	8
1.2.1. Metabolisme aspartat .....	8
1.2.2. Metabolisme fenilalanin .....	9

1.2.3. Metabolisme metanol .....	10
1.2.4. Metabolisme formaldehid .....	12
1.3. Toksisitas akut dan kronik aspartam .....	12
2. Metabolisme asam arakidonat .....	12
2.1. Jalur siklooksigenase .....	13
2.2. Jalur lipooksigenase .....	15
3. Inflamasi .....	16
3.1. Inflamasi akut .....	17
3.2. Inflamasi kronis .....	18
4. Mediator kemotaksis .....	18
5. Antiinflamasi nonsteroid ( AINS ) .....	19
5.1. Aspirin .....	21
5.2. Natrium diklofenak .....	23
5.3. Indometasin .....	24
6. Granuloma .....	25
7. Pemeriksaan kadar tromboksan B <sub>2</sub> dengan metode <i>Enzyme Immunoassay</i> ( EIA ) .....	27
8. Definisi-definisi dalam pemeriksaan kadar tromboksan B <sub>2</sub> dengan metode <i>Enzyme Immunoassay</i> ( EIA ) .....	28
<b>BAB III      METODE PENELITIAN</b>	
1. Bahan dan alat .....	29
2. Desain percobaan .....	30
3. Tempat dan waktu penelitian .....	32
4. Cara kerja .....	33
4.1. Induksi granuloma .....	33

4.2. Pemberian obat dan pengambilan sampel darah .....	33
4.3. Pemeriksaan kadar tromboksan B <sub>2</sub> .....	34
4.3.1. Preparasi pre-uji .....	34
4.3.1.1. Preparasi larutan dapar EIA .....	33
4.3.1.2. Preparasi larutan dapar pecuci .....	34
4.3.1.3. Preparasi sampel .....	35
4.3.1.4. Preparasi reagen khusus .....	35
4.3.2. Pemeriksaan dengan metode EIA .....	37
4.3.2.1. Tampilan plate .....	37
4.3.2.2. Mengisi <i>wells</i> .....	37
4.3.2.3. Inkubasi plate .....	37
4.3.2.4. Mengaktifkan plate .....	38
4.3.2.5. Membaca plate .....	39
4.4. Penimbangan granuloma .....	39
5. Analisis statistik .....	40
<b>BAB IV HASIL PENELITIAN</b>	
1. Kadar tromboksan B <sub>2</sub> dalam serum .....	42
2. Uji pengaruh aspartame terhadap granuloma hasil induksi .....	43
<b>BAB V PEMBAHASAN</b> .....	46
<b>BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
1. Kesimpulan .....	52
2. Saran .....	53

## DAFTAR GAMBAR

1. Rumus bangun aspartam .....	7
2. Metabolisme metanol, aspartat dan glutamat .....	10
3. Metabolisme asam arakidonat .....	13
4. Rumus bangun aspirin .....	22
5. Rumus bangun natrium diklofenak .....	23
6. Rumus bangun indometasin .....	24
7. Gambaran histologi granuloma .....	25
8. Klasifikasi proses inflamasi .....	26

## DAFTAR TABEL

1. Sel-sel pada inflamasi .....	16
2. Nilai rerata persentase kenaikan kadar tromboksan B <sub>2</sub> .....	42
3. Nilai rerata persentase kenaikan kadar tromboksan B <sub>2</sub> .....	44

## DAFTAR LAMPIRAN

1. Perhitungan dosis .....	59
2. Contoh data kurva standar .....	60
3. Data penelitian .....	61
4. Hasil analisis statistik .....	67
5. <i>Certificate of analysis</i> .....	68

## DAFTAR SINGKATAN

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ADI	<i>Acceptable Daily Intake</i>
VAS	<i>Visual Analog Scale</i>
COX	<i>Cyclooxygenase</i>
AINS	<i>Anti Inflamasi Non Steroida</i>
HPETE	<i>12-hydroperoxi-eicosatetraenoat acid</i>
HETE	<i>12-hydroxy-eicosatetraenoat acid</i>
PGG	<i>Prostaglandine G</i>
PGH	<i>Prostaglandine H</i>
PGI	<i>Prostaglandine I</i>
PGD	<i>Prostaglandine D</i>
PGF	<i>Prostaglandine F</i>
PGE	<i>Prostaglandine E</i>
TXA	<i>Thromboxane A</i>
TXB	<i>Thromboxane B</i>
PAH	<i>Phenylalanin hidroxylase</i>
BH <sub>4</sub>	<i>Tetrahydrobiopterin</i>
DKP	<i>Diketopiperazin</i>
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>
cAMP	<i>cyclic Adenosine Mono Phosphate</i>
H <sub>1</sub> -H <sub>4</sub>	<i>Histamin<sub>1</sub> – Histamin<sub>4</sub></i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

IL	<i>Interleukin</i>
OVLT	<i>organum vasculosum lamina terminalis</i>
Ig	<i>Immunoglobuline</i>
LT	<i>Leukotrien</i>
SRS-A	<i>Slow reacting substance of anaphylaxis</i>
IFN	<i>interferon</i>
EIA	<i>Enzyme Immunoassay</i>
AChE	<i>acetylcholine esterase</i>
Blk	<i>blanko</i>
AU	<i>absorbance unit</i>
TA	<i>total activity</i>
NSB	<i>non specific binding</i>
dtn	<i>determination</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1. Latar belakang

Aspartam ( *L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester* ) adalah suatu pemanis sintetis yang ditemukan secara tidak sengaja di laboratorium Searle Skokie, Illinois, Amerika Serikat, pada tahun 1965. Aspartam merupakan suatu bubuk kristal putih yang tidak berbau. Sebagai pemanis sintetis, aspartam kira-kira 200 kali lebih manis dari sukrosa. Selama lebih dari 30 tahun, aspartam telah digunakan secara luas sebagai *food additive* oleh lebih dari 6000 produk di dunia; digunakan dalam bentuk aspartam serbuk, dalam minuman berkarbonasi, permen karet dan gula-gula. Aspartam juga digunakan dalam sejumlah produk farmasi seperti vitamin dan obat batuk bebas gula. Aspartam diijinkan beredar pertama kali di dunia yaitu di Amerika Serikat oleh *Food and Drug Administration* ( FDA ) pada tahun 1974. <sup>1-3</sup>

Sebagai *food additive*, penggunaan aspartam di berbagai negara diawasi melalui penetapan *Acceptable Daily Intake* ( ADI ). ADI aspartam di Amerika Serikat 50 mg/kgBB dan di Eropa 40 mg/kgBB. Badan Pengawas Obat dan Makanan menetapkan ADI aspartam di Indonesia 50 mg/kgBB. Namun produk makanan dan minuman kemasan serta suplemen makanan di Indonesia menggunakan ADI aspartam yang beragam, 40 mg/kgBB atau 50 mg/kgBB. <sup>3,4</sup>

Penggunaan aspartam kemudian menimbulkan sejumlah pendapat pro dan kontra, diawali dengan publikasi Olney dkk, pada tahun 1996 berupa artikel bertajuk "*Increasing brain tumor rates : Is there a link to aspartame ?*" dalam *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* . <sup>5,6</sup>

Setelah publikasi tersebut, pro dan kontra berlanjut dengan penelitian, yang berusaha menunjukkan bahwa aspartam dapat menimbulkan keganasan, gangguan neurofisiologi, neuropsikologi dan fungsi perilaku seperti penelitian oleh Wolraich dkk (1994) , Spiers dkk (1998) dan Soffriti dkk ( 2006 ).<sup>5,7,8</sup>

Di luar pendapat pro dan kontra tentang penggunaan aspartam, sejumlah peneliti melakukan penelitian berdasarkan dugaan bahwa aspartam mempunyai efek “ *aspirin-like* “, yaitu efek analgetik, antiinflamasi, antipiretik dan antiagregasi trombosit. Penelitian yang dilakukan oleh Edmunson dkk ( 1998 ) ini dilatarbelakangi kebiasaan kaum manula di Amerika Serikat minum *diet coke* sewaktu menyaksikan pertandingan sepakbola melalui televisi. Seusai menonton pertandingan dan mengkonsumsi kira – kira 6 kaleng *diet coke* ( kira – kira mengandung 1,1 g aspartam ) maka kaum manula merasa kekakuan dan nyeri pada sendi yang sering timbul akibat rematik berkurang.<sup>9</sup>

Edmunson dkk mengukur penurunan persepsi nyeri menggunakan metode *Visual Analog Scale* ( VAS ) dan melihat efek terhadap agregasi trombosit melalui pengukuran waktu perdarahan. Sedangkan efek antipiretik menggunakan tikus yang diukur suhu tubuhnya setelah demam diinduksi menggunakan terpentin.<sup>9</sup>

Penelitian lain oleh Sharma dkk menghasilkan suatu kesimpulan bahwa ada efek sinergis antara sejumlah AINS dan analgetik opioid bila digunakan bersama-sama dengan aspartam.<sup>10</sup>

Mekanisme timbulnya nyeri dan inflamasi berhubungan erat dengan asam arakidonat, aktivitas enzim siklooksigenase ( COX ) dan produksi eikosanoid seperti prostaglandin dan tromboksan.<sup>11</sup>

Antiinflamasi nonsteroid ( AINS ) umumnya menghambat sintesis prostaglandin, tromboksan dan prostasiklin melalui mekanisme hambatan aktivitas siklooksigenase. Asam asetilsalisilat ( aspirin ) sebagai prototipe antiinflamasi nonsteroid, memiliki efek analgetik, antiinflamasi, antipiretik dan antiagregasi trombosit. <sup>12</sup>

Bila aspartam diduga memiliki aktivitas seperti aspirin maka aspartam diduga juga memiliki mekanisme penghambatan aktivitas enzim siklooksigenase.

Penelitian ke arah efek *aspirin – like* terhadap aspartam masih sangat terbatas. Belum jelas diketahui mekanisme kerja aspartam terhadap aktivitas enzim siklooksigenase sebagai jalur utama timbulnya nyeri, demam, inflamasi dan agregasi trombosit sehingga meneliti aspartam yang semakin luas penggunaannya di Indonesia sebagai *food additive* berbagai produk makanan dan minuman kemasan serta suplemen makanan adalah hal yang menarik.

## **2. Rumusan masalah**

Aspartam diduga mempunyai efek *aspirin-like*. Aspirin menurunkan produksi prostaglandin dan tromboksan melalui penekanan aktivitas enzim siklooksigenase. Jadi perlu dibuktikan apakah aspartam juga menekan aktivitas enzim siklooksigenase.

### 3. Tujuan Penelitian

a. Tujuan umum : melihat mekanisme kerja aspartam dalam menimbulkan efek antiinflamasi dan antiagregasi trombosit

b. Tujuan khusus :

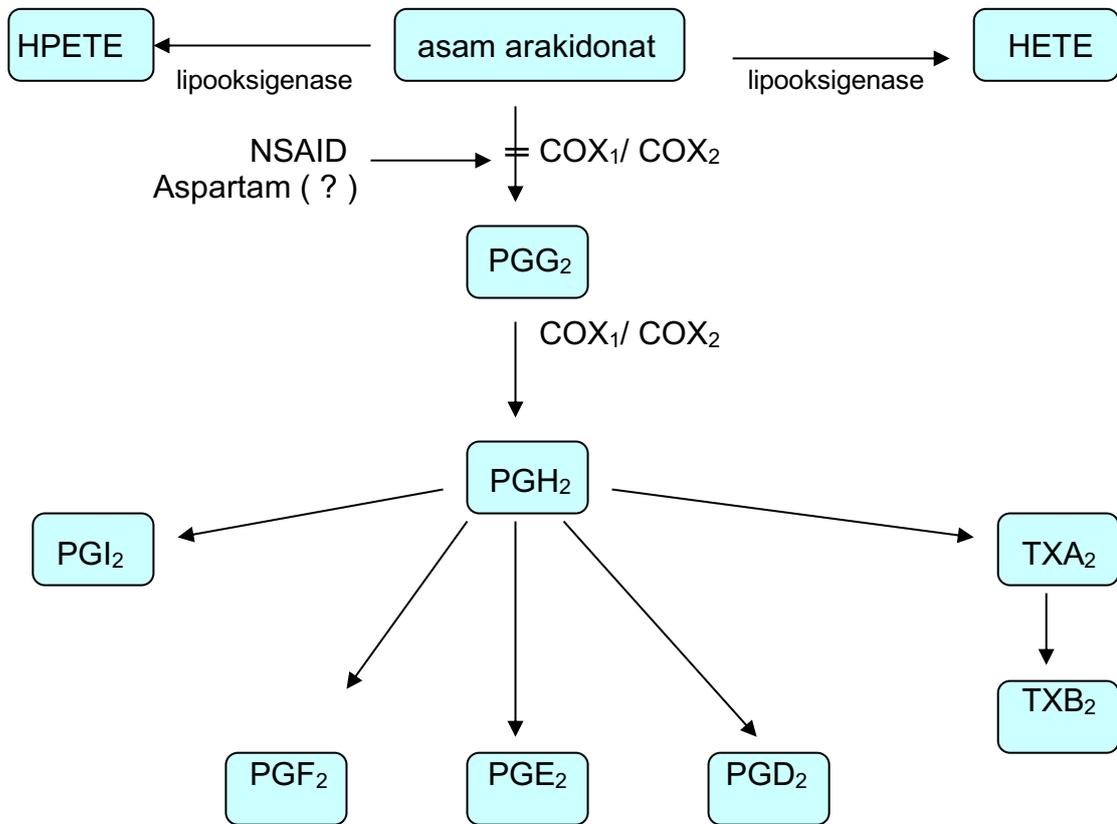
- Meneliti efek aspartam terhadap aktivitas siklooksigenase dengan mengukur kadar tromboksan B<sub>2</sub> dalam serum sebagai salah satu produk akhir reaksi enzimatik yang dikatalisis enzim tersebut pada tikus jantan galur *Sprague-Dawley* yang diinduksi nyeri dengan larutan karageenan 2 %

- Meneliti efek aspartam terhadap pertumbuhan granuloma pada tikus jantan galur *Sprague-Dawley* yang diinduksi larutan karagenan 2 % sebagai suatu model inflamasi kronis yang sering digunakan. <sup>13,14</sup>

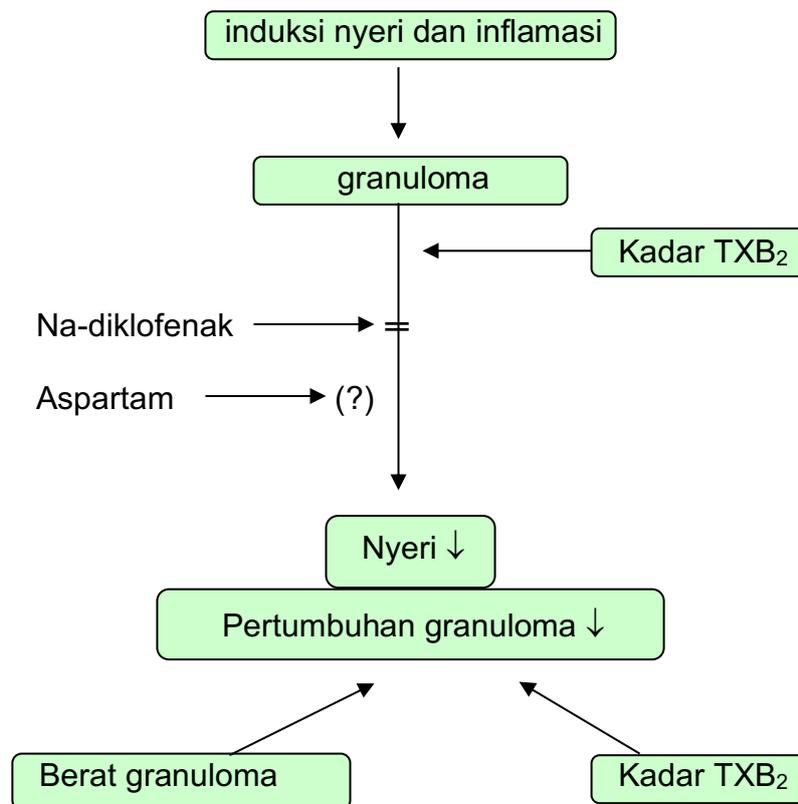
### 4. Hipotesis

Pemberian aspartam dapat menurunkan kadar serum tromboksan B<sub>2</sub> dan menghambat pertumbuhan granuloma pada tikus galur *Sprague-Dawley* yang diinduksi dengan larutan karageenan 2 %. <sup>13,14</sup>

## 5. Kerangka teori



## 6. Kerangka Konsep



## 7. Manfaat Penelitian

Jika terbukti bahwa aspartam mempengaruhi kadar tromboksan B<sub>2</sub> dalam darah maka hasil penelitian ini :

Bagi ilmu pengetahuan : menambah data interaksi obat, yaitu interaksi antara aspartam dengan obat-obat lain yang juga mempunyai efek anti agregasi trombosit.

## BAB II

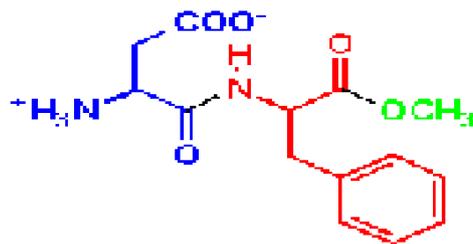
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 1. Aspartam

Aspartam ( *L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester* ) tergolong dalam pemanis buatan selain sakarin, siklamat, sukralose dan *acesulfame-K*.<sup>1,15</sup>

##### 1.1. Sifat fisik dan kimia aspartam

Aspartam adalah serbuk putih tidak berbau, mempunyai rasa manis 150 – 200 kali sukrosa dan tidak menimbulkan rasa pahit setelah itu ( *after taste* ) pada organ pengecap seperti halnya sakarin dan siklamat.<sup>2,15</sup>



L-aspartil-L-fenilalanil metil ester

**Gambar 1. Rumus bangun aspartam**<sup>16</sup>

Ada empat stereoisomer dari aspartam: LL, DD, DL dan LD, namun yang memberikan rasa manis adalah bila gugus aspartat maupun fenilalanin berada dalam bentuk konfigurasi LL.<sup>15</sup>

## 1.2. Metabolisme aspartam

Aspartam dimetabolisme dengan cepat di dinding usus halus menjadi aspartat, fenilalanin dan metanol dengan perbandingan 40 : 50 : 10. <sup>1,3</sup>

Aspartam adalah suatu dipeptida yang akan mengalami degradasi ekstensif sepanjang usus halus selama proses absorpsi. Mula-mula gugus metilnya dipecah oleh enzim usus seperti kimotripsin. Kemudian enzim peptida hidrolase yang terletak di membran mikrovili usus halus akan memecah bentuk dipeptida menjadi asam aminonya. Bentuk asam amino tersebut yang akan memasuki sirkulasi sistemik. <sup>17</sup>

### 1.2.1. Metabolisme aspartat

Aspartam terdiri dari aspartat sebanyak kira-kira 40 %. Membahas metabolisme aspartat tidak dapat terlepas dari metabolisme glutamat. Baik aspartat maupun glutamat bersama-sama memegang peranan penting pada 2 siklus berikut :

a. Siklus asam sitrat ( *Krebs` cycle* ) <sup>18</sup>

Baik aspartat maupun glutamat memasuki siklus asam sitrat melalui proses transaminasi; aspartat diubah menjadi oksaloasetat sedangkan glutamat menjadi  $\alpha$  – ketoglutarat.

b. Aspartat dan glutamat adalah komponen vital sintesis urea. <sup>18</sup>

Jadi singkatnya baik aspartat maupun glutamat berperan pada fungsi sel normal, pada metabolisme pembentukan energi dan sintesis urea.

### 1.2.2. Metabolisme fenilalanin

Kira-kira 50 % aspartam terdiri dari fenilalanin. Fenilalanin adalah asam amino esensial yang tidak dapat disintesis oleh tubuh mamalia maupun disimpan. Di dalam tubuh, fenilalanin akan diubah menjadi tirosin yang dapat disimpan oleh tubuh.<sup>19</sup>

Metabolisme fenilalanin berhubungan erat dengan suatu kelainan genetik yang disebut fenilketonuria yang ditemukan pertama kali oleh Folling pada tahun 1934. Fenilketonuria adalah suatu kelainan berupa tidak adanya enzim fenilalanin hidroksilase ( PAH ), dengan akibat fenilalanin terakumulasi di dalam darah dan jaringan sementara kadar tirosin dalam darahnya rendah.<sup>19-21</sup>

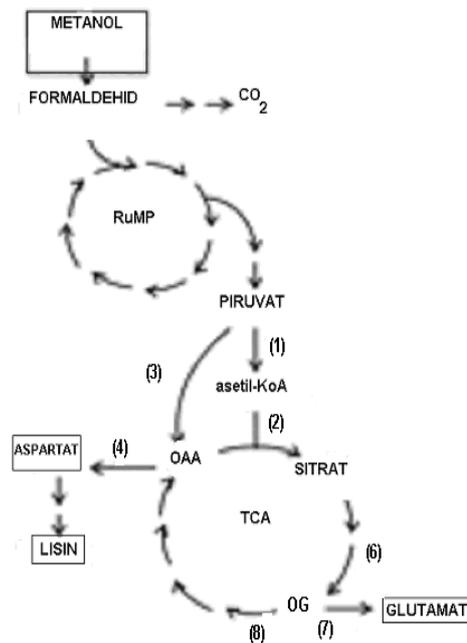
Selain itu 1-3 % penderita fenilketonuria mempunyai gen pembentuk PAH yang normal namun mempunyai *defect* pada gen yang membentuk kofaktor PAH yaitu tetrahidrobiopterin ( BH<sub>4</sub> ).<sup>20, 21</sup>

Akumulasi fenilalanin di dalam cairan tubuh dapat merusak pertumbuhan susunan saraf pusat dan mempengaruhi maturitas otak pada anak-anak usia sangat muda. Hal ini diakibatkan karena tirosin dibutuhkan untuk membentuk neurotransmitter dopamin, norepinefrin dan epinefrin melalui aktivitas enzim tirosin hidroksilase. Di samping itu BH<sub>4</sub> juga merupakan kofaktor tirosin hidroksilase dan triptofan hidroksilase. Triptofan hidroksilase merupakan enzim yang secara tidak langsung aktif dalam pembentukan serotonin dari triptofan.<sup>20,21</sup>

### 1.2.3. Metabolisme metanol

Sepuluh persen hasil metabolisme aspartam adalah metanol. Metanol adalah zat yang sangat banyak digunakan sebagai pelarut dalam industri.<sup>22</sup>

Metanol diabsorpsi sangat cepat di usus halus dan didistribusi ke dalam cairan tubuh. Kemudian metanol ini akan mengalami oksidasi dan katalisis dengan bantuan enzim alkohol dehidrogenase dan katalase sampai menghasilkan CO<sub>2</sub>.<sup>22, 23</sup>



**Gambar 2. Metabolisme metanol, aspartat dan glutamat<sup>2</sup>**

Buller dan Wood ( 1904 ) mengetengahkan hubungan 235 kasus kebutaan dan kematian dengan penggunaan metanol. Kebutaan disebabkan edema pembuluh darah retina. Penurunan kesadaran dan kematian terjadi akibat depresi nafas dan asidosis metabolik. Sebelumnya juga terjadi penekanan sistem susunan saraf pusat.<sup>22</sup>

Eliminasi metanol dari dalam darah tampak sangat lambat pada semua spesies bila dibandingkan dengan etanol. Penelitian Konvusalo mengemukakan bahwa kecepatan eliminasi metanol pada kelinci tergantung pada konsentrasi metanol dalam darah. Haggard dan Greenberg juga menemukan hal yang sama seperti pada penelitian Konvusalo. McMartin dkk ( 1975 ) menemukan bahwa pada konsumsi 3 g/kgBB metanol yang diberikan kepada kera akan terjadi peninggian kadar metanol dalam darah mencapai 300 mg/dL dan pemanjangan  $t_{1/2}$  dari 24 jam menjadi 49 jam bila dibandingkan dengan dosis pemberian sebesar 1 g/kgBB. <sup>22</sup>

Perbedaan mendasar keracunan metanol antara manusia dengan sejumlah hewan non-primata adalah tidak adanya asidosis metabolik dan gejala keracunan pada indera penglihatan pada spesies non-primata. Gejala yang tampak adalah ataksia, berkurangnya refleks normal dan gejala depresi susunan saraf pusat lainnya. <sup>22</sup>

Pada kera dan manusia ditemukan adanya akumulasi asam format sebesar 11-26 mEq/L setelah pemberian metanol, sedangkan pada tikus tidak ditemukan adanya akumulasi asam formiat, bahwa oksidasi metanol menjadi asam formiat terjadi lebih cepat pada kera dan manusia. Namun penelitian Watkins dkk ( 1970 ) dan Clay dkk ( 1975 ) memperlihatkan bahwa setelah pemberian metanol 1 g/kgBB maka kecepatan eliminasi metanol melalui ginjal pada tikus sebesar 3,7 mg/dL dan pada kera 3,9 mg/dL. Hal ini menunjukkan bahwa akumulasi asam formiat akibat perbedaan spesies tidak dipengaruhi oleh bersih ginjal. <sup>22</sup>

#### **1.2.4. Metabolisme formaldehid**

Asam formiat yang merupakan hasil metabolisme formaldehid diduga menjadi penyebab terjadinya asidosis metabolik. Namun penelitian Konvusalo (1956) serta Scott dkk, (1933) dapat membuktikan bahwa tidak ditemukan formaldehid dalam sirkulasi darah, urin dan jaringan pada intoksikasi metanol.<sup>22</sup>

#### **1.3 Toksisitas akut dan kronik aspartam**

Studi toksisitas aspartam dilakukan terhadap aspartam itu sendiri yaitu *L-aspartyl, L-phenylalanine methyl ester* dan produk dekomposisinya yaitu diketopiperazin (DKP).<sup>24</sup>

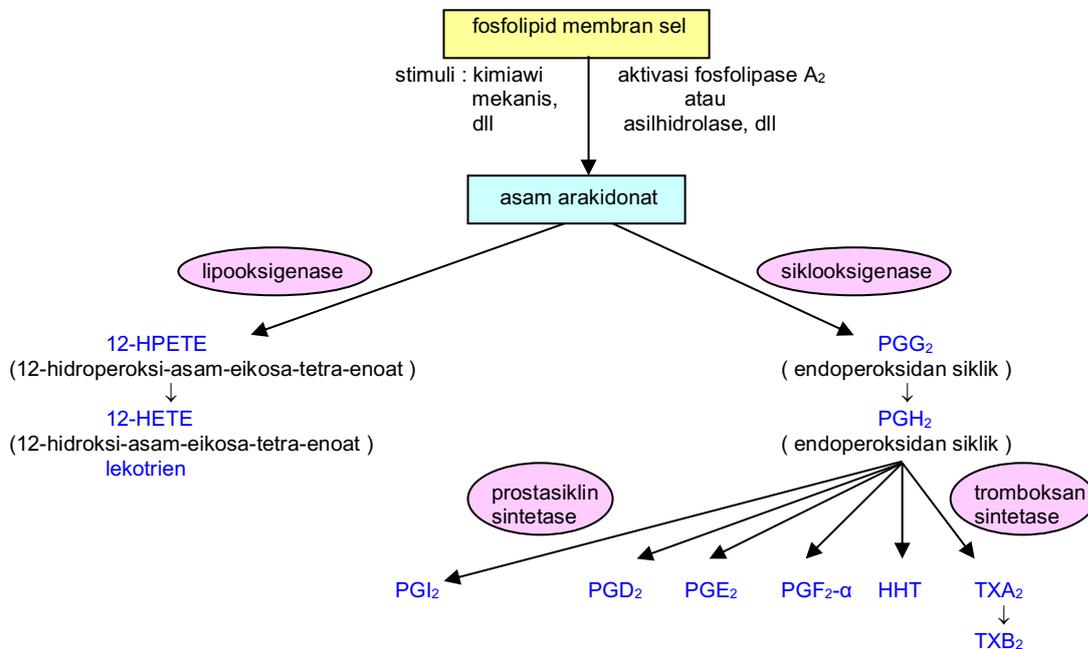
Studi toksisitas akut aspartam dan diketopiperazin menghasilkan kesimpulan bahwa dosis toksik akut minimumnya lebih besar dari 5000 mg/kgBB karena pada pemberian dosis tersebut kepada mencit, tikus dan kelinci tidak menimbulkan kematian atau kelainan perilaku.<sup>24</sup>

Studi toksisitas kronik yang terdiri dari studi toksisitas kronik jangka pendek dan jangka panjang mempergunakan hewan coba mencit, tikus, hamster, anjing dan monyet dengan dosis bertingkat juga tidak menemukan kelainan yang berarti seperti neoplasma. Data toksisitas diatas menjadi dasar ditetapkannya ADI aspartam sebesar 40 mg/kgBB dan ADI DKP sebesar 7.5 mg/kgBB.<sup>24</sup>

## **2. Metabolisme asam arakidonat**

Asam arakidonat adalah suatu asam lemak dengan 20 buah atom C dan 4 buah ikatan rangkap yang dilepaskan dari fosfolipid membran melalui aktivitas

fosfolipase C dan diasilgliserol lipase atau melalui aktivitas langsung fosfolipase A<sub>2</sub>. Setelah dilepas dari fosfolipid membran maka asam arakidonat akan dimetabolisme melalui jalur siklooksigenase atau jalur lipooksigenase.<sup>25</sup>



**Gambar 3. Metabolisme asam arakidonat**<sup>11</sup>

### 2.1. Jalur siklooksigenase

Prostaglandin dan tromboksan disintesis dari asam arakidonat melalui aktivitas enzim siklooksigenase ( COX ). Ada 2 isoform enzim tersebut yang diproduksi oleh gen yang berbeda. COX-1 pada dasarnya selalu bereksresi pada hampir semua jenis sel termasuk trombosit pada keadaan normal dan bertanggung jawab terhadap fungsi fisiologis dan hemostasis prostaglandin. Sebaliknya COX-2 umumnya tidak terdeteksi pada kondisi normal namun akan terinduksi cepat dan bereksresi pada tempat di mana terjadi peradangan atau kerusakan jaringan sebagai respon terhadap sitokin ( TNF- $\alpha$ , IL-1 ), mitogen dan faktor pertumbuhan ( GF ). COX-2 dapat dideteksi pada banyak

jaringan yang berbeda pada keadaan patologis, Ekspresi COX-2 juga meningkat akibat adanya radikal bebas, hormon dan hipoksia.<sup>8, 27, 28</sup>

Siklooksigenase ( prostaglandin H sintase ) mengkatalisis asam arakidonat menjadi prostaglandin endoperoksidase ( PGG<sub>2</sub> dan PGH<sub>2</sub> ) dengan penambahan 2 molekul oksigen. PGH<sub>2</sub> adalah prekursor prostaglandin dan tromboksan yang mempunyai aktivitas biologis. Kedua prekursor tersebut tidak stabil dan kemudian mengalami oksidasi enzimatik dan nonenzimatik menjadi PGE, PGF dan PGD. Selain itu oleh enzim prostasiklin sintase PGH<sub>2</sub> juga diubah menjadi prostasiklin ( PGI<sub>2</sub> ) dan oleh enzim tromboksan sintase diubah menjadi tromboksan ( TXA<sub>2</sub> ). PGI<sub>2</sub> ( t<sub>1/2</sub> = 3 menit dalam suhu 37<sup>0</sup> C dan pH 7,5) dan TXA<sub>2</sub> ( t<sub>1/2</sub> = 30 menit dalam suhu 37<sup>0</sup> C dan pH 7,5 ) juga tidak stabil. Prostasiklin dihidrolisis nonenzimatik menjadi 6-keto-PGF<sub>1</sub> – alfa yang stabil. TXA<sub>2</sub> diubah secara non enzimatik menjadi tromboksan B<sub>2</sub> ( TXB<sub>2</sub> ) yang lebih stabil.<sup>11, 28</sup>

PGG<sub>2</sub> dan PGH<sub>2</sub> mempunyai efek yang tidak tetap, kadang menimbulkan vasokonstriksi dan kadang menimbulkan vasodilatasi. Hal ini dimungkinkan karena PGG<sub>2</sub> dan PGH<sub>2</sub> sangat tidak stabil.<sup>11, 28</sup>

Pada saluran nafas PGF<sub>2</sub> – alfa, PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub> dan TXA<sub>2</sub> menimbulkan kontraksi sedangkan PGE<sub>2</sub> menimbulkan bronkodilatasi kuat. PGI<sub>2</sub> mempunyai efek bronkodilatasi lemah.<sup>11</sup>

PGE<sub>2</sub> dan PGF<sub>2</sub> – alfa menimbulkan kontraksi kuat pada rahim normal maupun gravid, sedangkan aktivitas ini diantagonis oleh PGI<sub>2</sub>.<sup>11</sup>

PGE<sub>2</sub> dan PGI<sub>2</sub> merupakan vasodilator sangat kuat. Reaksi yang ditimbulkan oleh PGE<sub>2</sub> atau PGI<sub>2</sub> intradermal adalah eritema, vasodilatasi, edema dan hiperalgesia yang timbul dalam waktu singkat dan akan

berlangsung sampai kurang lebih 10 jam. Hal ini membuktikan bahwa PGE<sub>2</sub> dan PGI<sub>2</sub> sangat berperan dalam mekanisme inflamasi atau peradangan. Di samping itu PGE<sub>2</sub> juga ditemukan pada area *organum vasculosum lamina terminalis* ( OVLT ) anterior hipotalamus yang merupakan organ yang berperanan mengontrol demam. <sup>11</sup>

PGD<sub>2</sub> merupakan mediator terjadinya dilatasi pembuluh darah setempat dan peningkatan permeabilitas vaskular ( *wheal and flare reaction* ) pada respon alergi yang juga dimediasi IgE. <sup>25</sup>

TXA<sub>2</sub> adalah produk terbanyak yang dihasilkan trombosit normal namun dapat pula dihasilkan oleh sel berinti seperti monosit. TXA<sub>2</sub> merupakan aktivator trombosit yang poten, vasokonstriktor dan mitogen otot polos. Sedangkan PGI<sub>2</sub> yang dihasilkan oleh endotel pembuluh darah dan sel otot polos pembuluh darah merupakan inhibitor trombosit dan vasodilator kuat. <sup>11, 27, 29, 30</sup>

Agregasi trombosit adalah suatu keadaan di mana trombosit saling melekat satu dengan yang lainnya. Agregasi trombosit terjadi dalam 2 fase. Fase pertama terjadi ketika ada stimulus yang menginduksi perubahan konformasi pada permukaan trombosit. Fase kedua membutuhkan sekresi granula- $\alpha$  dari trombosit yang tergantung pada produksi TXA<sub>2</sub> dari trombosit. <sup>31</sup>

## **2.2. Jalur lipooksigenase**

Produk jalur ini dihasilkan leukotrien : LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> dan LTE<sub>4</sub>. Leukotrien adalah metabolit asam arakidonat yang dihasilkan oleh mukosa sel mast. LTB<sub>4</sub> adalah suatu “ *chemoattractant* “ yang kuat. LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> dan LTE<sub>4</sub> secara bersama-sama dikenal sebagai sesuatu yang disebut sebagai *slow-*

*reacting substance of anaphylaxis* ( SRS-A ) yang menginduksi kontraksi otot polos, bronkokonstriksi serta sekresi mucus pada saluran nafas. <sup>25</sup>

### 3. Inflamasi

Inflamasi atau peradangan adalah suatu reaksi setempat dari jaringan hidup terhadap trauma atau rangsangan. Infeksi, perubahan suhu yang berlebihan ( panas atau dingin ), radiasi, asam maupun basa dapat menjadi rangsangan yang menimbulkan inflamasi atau peradangan. <sup>25, 26</sup>

Reaksi setempat yang timbul adalah berupa kemerahan, peningkatan suhu dan pembengkakan. Reaksi ini didasari oleh mekanisme yang terjadi dalam beberapa detik : konstriksi pembuluh darah kecil arteriol yang diikuti vasodilatasi sehingga terjadi perubahan volume, darah dalam kapiler dan vena menjadi penuh. Akibatnya sel-sel endotel pembuluh darah tersebut meregang satu dengan lainnya sehingga dinding pembuluh darah menjadi lebih permeabel. Protein plasma akan keluar ke jaringan dan terjadi penumpukan cairan di dalam jaringan. <sup>25, 26</sup>

Secara mikroskopis akan terlihat bahwa berbagai jenis sel akan berkumpul ke tempat terjadinya trauma atau perangsangan yang disebut sebagai infiltrasi selular. <sup>25</sup>

**Tabel 1. Sel-sel pada inflamasi<sup>25</sup>**

Sirkulasi	Jaringan
Limfosit Netrofil Eosinofil Basofil Trombosit	Sel mast Makrofag

Reaksi perubahan jaringan pada inflamasi umumnya hampir sama, perubahan ini sepertinya ditimbulkan melalui zat-zat perantara yang dilepaskan, yang disebut sebagai mediator inflamasi.<sup>25</sup>

Dikenal 4 kelompok zat yang berperan sebagai mediator peradangan :

1. Vasoaktif dan mediator kontraksi otot polos :
  - a. Histamin
  - b. Metabolit asam arakidonat
  - c. PAF ( *Platelet Activating Factor* )
  - d. Adenosin
2. Mediator kemotaksis
3. Mediator enzimatik
4. Proteoglikan<sup>25</sup>

Berdasarkan lama berlangsungnya proses maka inflamasi dibagi menjadi :

- a. Inflamasi akut
- b. Inflamasi kronis

### **3.1. Inflamasi akut**

Inflamasi akut adalah respon yang paling awal timbul akibat kerusakan jaringan, infeksi dan berbagai sebab lain. Baik COX-1 maupun COX-2 berperan pada inflamasi akut.<sup>32</sup>

PGE<sub>2</sub> dan PGI<sub>2</sub> yang merupakan produk reaksi enzimatik yang dikatalisis COX-1 dan COX-2 adalah jenis prostaglandin utama yang berperan dalam terjadinya nyeri, vasodilatasi dan edema pada inflamasi akut , namun diperlukan potensiasi dengan mediator lain yaitu histamin, bradikinin dan leukotrien.<sup>32</sup>

### **3.2. Inflamasi kronis**

Seperti pada inflamasi akut, produk reaksi enzimatik yang dikatalisis COX-1 dan COX-2 yang digolongkan sebagai prostanoid juga ditemukan dalam kadar tinggi pada inflamasi kronis.<sup>32</sup>

Hal yang membedakan antara inflamasi akut dan kronis adalah bahwa pada inflamasi kronis terdapat peranan beberapa sel yang memediasi reaksi imunologi seperti limfosit T dan makrofag yang lebih berperan dibandingkan dengan inflamasi akut. Dalam hal ini aktivasi makrofag dipromosi oleh beberapa jenis sitokin. Juga diketahui bahwa beberapa jenis antigen menginduksi sel-sel yang memediasi reaksi imunologi seperti makrofag, mengakibatkan terbentuknya granuloma. Dapat terbentuk granuloma pada beberapa jenis infeksi kronis seperti tuberkulosa, koksidioidomikosis berat serta sarkoidosis.<sup>25,</sup>

Makrofag yang memegang peranan penting pada inflamasi kronis ternyata mensekresi PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> dan TXA<sub>2</sub>.<sup>33</sup>

PGE<sub>2</sub> yang disekresi makrofag kemungkinan besar memegang peranan dalam mekanisme umpan balik negatif, menyebabkan terjadinya inhibisi fungsi imun. Hal ini didukung dengan didapatinya sejumlah bukti bahwa PGE<sub>2</sub> menghambat Th1, IL-2 dan IFN- $\gamma$ .<sup>32, 33</sup>

### **4. Mediator kemotaksis**

Mediator kemotaktis terpenting adalah kemokin. Kemokin adalah suatu peptida, merupakan suatu sitokin kemotaktik yang memediasi inflamasi dengan cara langsung menggerakkan leukosit di dalam sirkulasi ke tempat terjadinya inflamasi atau luka.<sup>25, 34</sup>

Sitokin sendiri adalah sekelompok molekul yang berperan dalam pengiriman signal antar sel pada respon imun. Semua sitokin adalah protein atau peptida, beberapa berikatan dengan molekul gula. Sitokin yang diproduksi oleh limfosit disebut limfokin. Yang tergolong sebagai sitokin antara lain adalah interferon ( IF ), interleukin ( IL ), *colony stimulating factor* ( CSF ) dan *tumor necrosis factor* ( TNF ).<sup>35</sup>

Mediator kemotaktis lainnya yaitu PAF dan LTB<sub>4</sub> adalah mediator peradangan nonpeptida. PAF dan LTB<sub>4</sub> bersama dengan C5a merupakan kemoatraktan netrofil kuat yang aktif pada konsentrasi sekecil 10<sup>-10</sup> M.<sup>26</sup>

## **5. Antiinflamasi nonsteroid ( AINS )**

Aspirin dan antiinflamasi nonsteroid yang lain pada dosis terapi memperlihatkan efek inhibisi produksi prostaglandin dengan menghambat aktivitas siklooksigenase secara langsung.<sup>36, 37</sup>

AINS mengatasi nyeri, pembengkakan dan gangguan fungsi gerak pada tempat terjadi peradangan. AINS juga mengurangi kerusakan sendi progresif pada radang sendi atau arthritis. Secara klinis AINS telah terbukti efektif pada peradangan akut maupun kronis seperti arthritis, tendinitis dan perikarditis. Efek analgetik dan antipiretik AINS adalah melalui mekanisme kerja secara langsung pada SSP; pada tempat yang merupakan pusat nyeri dan pengaturan suhu.<sup>37</sup>

AINS juga menghambat cAMP yang terkait aktivitas protein kinase, fosfolipase C serta asam amino yang berfungsi dalam transpor membran sel dan berbagai sel lainnya yang berkaitan dengan aktivitas membran sel. Semua AINS menghambat berbagai fungsi netrofil dan monosit seperti agregasi, degranulasi serta produksi anion superoksida.<sup>37</sup>

Selain aspirin yang merupakan penghambat ireversibel terhadap siklooksigenase maka jenis AINS lain umumnya merupakan penghambat reversibel terhadap siklooksigenase. Jenis inipun masih dibagi lagi menjadi :

a. Penghambat siklooksigenase non selektif

Jenis ini menghambat aiktivitas baik COX-1 maupun COX-2. Jenis ini masih dibagi lagi menjadi :

- Penghambat siklooksigenase “ *time-independent* ”

Jenis ini berikatan dan terlepas dalam waktu singkat pada *active site* reseptor siklooksigenase.

Contoh : ibuprofen <sup>33</sup>

- Penghambat siklooksigenase “ *time-dependent* “

Jenis ini berikatan dan terlepas secara lambat pada *active site* reseptor siklooksigenase.

Contoh : indometasin, diklofenak <sup>33</sup>

b. Penghambat selektif siklooksigenase

Jenis ini menghambat COX-2 secara selektif. Jenis ini lebih dianjurkan penggunaannya bila diindikasikan sebagai antiinflamasi untuk mengurangi efek samping AINS terhadap saluran cerna.

Jenis ini juga masih dibagi lagi menjadi :

- Penghambat siklooksigenase “ *time-independent* “

Jenis ini terbanyak pada jenis penghambat selektif siklooksigenase, mempunyai gugus karboksil yang dibutuhkan untuk berikatan pada reseptor. Jenis ini berikatan dan terlepas dengan cepat pada *active site* reseptor siklooksigenase.

Contoh : meloksikam, nimesulid, etodolak <sup>33</sup>

- Penghambat siklooksigenase “ *time-dependent* ”

Jenis ini lebih jarang, mempunyai gugus diaril. Stabilisasi ikatannya pada reseptor tidak memerlukan arginin pada posisi 120. Jenis ini berikatan dan terlepas secara lambat pada *active site* reseptor siklooksigenase.

Contoh : selekoksib, rofekoksib <sup>33</sup>

Pada banyak spesies, termasuk manusia, prostaglandin yang melindungi mukosa lambung disintesis melalui kerja COX-1, walaupun sejumlah kecil COX-2 juga bereksresi untuk menghasilkan prostaglandin tersebut. Insiden efek samping seperti gastritis, ulkus duodenum dan ulkus lambung umumnya kerap terjadi karena proses di bawah ini dihambat bila aktivitas siklooksigenase dihambat :

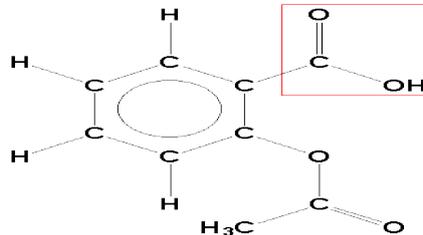
- a. PGE menghambat sekresi asam lambung melalui mekanisme umpan balik setempat.
- b. PGE melindungi sel-sel mukosa lambung terhadap sekresi asam lambung ( efek sitoprotektif ). <sup>36</sup>

Selain itu efek samping terhadap saluran cerna juga disebabkan bahwa umumnya AINS merupakan suatu asam organik yang dapat merusak fungsi sel saluran cerna sewaktu absorpsi serta peristiwa *uncoupling* proses fosforilasi oksidatif pada mitokondria. <sup>36</sup>

## 5.1 Aspirin

Ekstrak pohon willow ini telah digunakan ratusan tahun yang lalu oleh Hippocrates, Pliny, Galen dan ahli-ahli pengobatan pada jaman dahulu kala untuk mengatasi nyeri dan demam. Kemudian ekstrak batang pohon willow

( salisilat ) digunakan sebagai pengganti ekstrak batang pohon sinkona ( kina ). Aspirin akhirnya digunakan secara luas pada akhir abad ke-19 ketika metode sintesis aspirin yang mudah dan murah ditemukan. <sup>36</sup>



**Gambar 4. Rumus bangun aspirin<sup>38</sup>**

Aspirin dipergunakan sebagai standar untuk membandingkan dan mengevaluasi analgetik, antipiretik dan antiinflamasi nonsteroid lainnya karena aspirin memiliki ketiga efek tersebut di atas hampir sama kuatnya. <sup>35, 38</sup> Aspirin bekerja lebih selektif terhadap COX-1 daripada COX-2 ( 10 – 100 X ). Selain memiliki efek analgetik, antipiretik dan antiinflamasi; aspirin juga mempunyai peranan pada hemostasis yaitu menghambat agregasi trombosit. <sup>12, 34, 40</sup>

Efek penghambatan aktivitas COX-1 menyebabkan aspirin sampai sekarang digunakan sebagai obat utama untuk mencegah trombosis dan penyakit akibat penyumbatan pembuluh darah. <sup>34</sup>

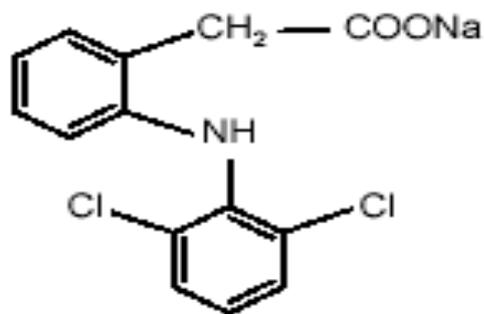
Aspirin menghambat COX-1 dan COX-2 secara ireversibel, yaitu dengan meng-asetilasi posisi residu serin pada posisi 529 dan 516 dari enzim prostaglandin G/II sintase ( siklooksigenase ). <sup>12, 37, 40, 41</sup>

Pada manusia aspirin menghambat aktivitas siklooksigenase pada trombosit dalam waktu 1 jam setelah pemberian oral. Akibatnya fungsi trombosit akan dihambat beberapa hari setelah pemberian aspirin dosis tunggal. Dosis

yang disarankan adalah sebesar 25 – 325 mg/hari namun konsensus yang ditetapkan sekarang adalah 75 - 150 mg/hari. <sup>42</sup>

## 5.2 Natrium diklofenak

Natrium diklofenak adalah suatu AINS dari golongan asam asetat heteroaril. Natrium diklofenak adalah suatu inhibitor siklooksigenase dengan potensi lebih kuat dari indometasin, naproksen maupun sejumlah AINS yang lain. <sup>37</sup>



**Gambar 5. Rumus bangun natrium diklofenak** <sup>43</sup>

Natrium diklofenak dapat mereduksi konsentrasi intraselular asam arakidonat bebas di dalam lekosit, kemungkinan karena mempengaruhi pelepasan atau ambilan asam lemak. <sup>37</sup>

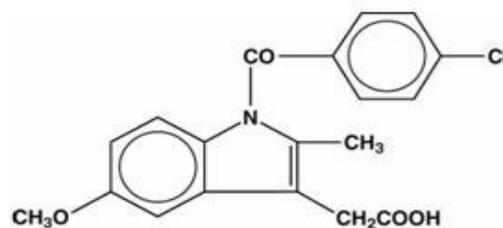
Natrium diklofenak diabsorpsi secara cepat dan lengkap setelah pemberian oral, kadar puncak dalam plasma dicapai dalam waktu 2-3 jam. Obat ini terikat kuat pada protein plasma ( 99 % ) dan waktu paruh dalam plasma antara 1-2 jam. Natrium diklofenak diakumulasi di cairan sinovial setelah pemberian oral. Hal ini dapat menjelaskan mengapa durasi efek terapi natrium diklofenak jauh lebih panjang dari waktu paruhnya dalam plasma. <sup>37</sup>

Dibandingkan dengan indometasin, aspirin dan piroksikam maka efek samping natrium diklofenak berupa gangguan saluran cerna jauh lebih kecil. Aktivitas inhibisi terhadap COX-1 dan COX-2 hampir sama, yang dibuktikan melalui penelitian Bennett dkk ( 1993 ) melalui kultur sel yang mendapatkan bahwa rasio  $IC_{50}$  COX-2/COX-1 dari natrium diklofenak adalah sebesar 0,7. <sup>27,43</sup>

Dosis yang disarankan adalah 100-200 mg/hari, diberikan dalam beberapa dosis terbagi. <sup>37</sup>

### 5.3 Indometasin

Indometasin adalah inhibitor siklooksigenase non selektif dan digolongkan sebagai AINS dari golongan indol dan asam asetat inden. <sup>37, 45</sup>



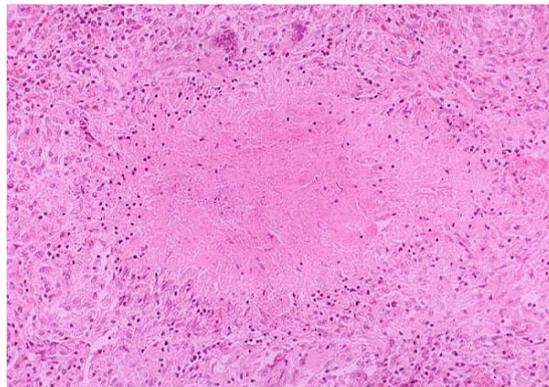
**Gambar 6. Rumus bangun indometasin** <sup>44</sup>

Indometasin adalah penghambat siklooksigenase yang poten. Indometasin juga menghambat motilitas lekosit PMN. Seperti juga AINS yang lain, indometasin juga mempengaruhi proses uncoupling fosforilasi oksidatif pada dosis yang lebih besar dari dosis terapi serta menekan biosintesis mukopolisakarida. <sup>37, 44, 45</sup>

Pada pengukuran kadar tromboksan B<sub>2</sub> dalam serum, indometasin akan mencegah terbentuknya tromboksan B<sub>2</sub> dan prostaglandin lainnya *ex vivo* yang tidak dapat dicegah bila menggunakan antikoagulan saja. <sup>49</sup>

## 6. Granuloma

Granuloma adalah suatu massa yang terbentuk sebagai suatu pola reaksi makrofag terhadap benda asing. Dengan kata lain granuloma merupakan suatu massa yang terbentuk akibat agregasi makrofag dan selalu disertai subpopulasi limfosit, fibroblas dan berbagai jenis sel lainnya termasuk juga kolagen.<sup>36,47</sup>



**Gambar 7. Gambaran histologi granuloma<sup>48</sup>**

Patogenesis pembentukan granuloma :

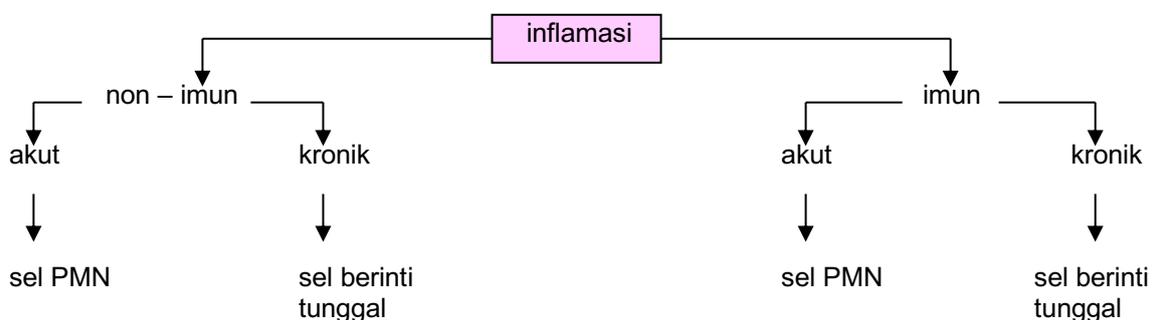
- a. Inisiasi respon imun
  - Tahap ini berlangsung dalam beberapa detik sampai menit setelah terpapar antigen.
  - Mediator inflamasi yang berperan antara lain TNF, IFN- $\gamma$ .
  - Akhir dari tahap ini adalah sewaktu sel dendrit bermuatan antigen yang teraktivasi bermigrasi ke kelenjar getah bening perifer melalui saluran kelenjar getah bening.
- b. Produksi sel T spesifik antigen
  - Terjadi beberapa jam setelah terjadi inisiasi respon imun.
  - Sel dendrit di kelenjar getah bening kemudian menginisiasi respon limfosit.

- Sel dendrit menghasilkan IL-2 dan memaparkan antigen kepada sel Th 1 CD 4+.

c. Pembentukan granuloma matang

- Terjadi dalam beberapa jam sampai beberapa hari setelah terpapar antigen, di mana sel Th 1 CD 4+ berpindah ke tempat yang penuh mikrosirkulasi.
- Peristiwa ini juga dipengaruhi TNF dan kemokin.
- Jika sumber antigen tidak tereradikasi, inflamasi menetap.
- Terjadi interaksi antara sel Th 1 CD 4+ dan makrofag aktif. Peristiwa ini mengawali produksi IFN- $\gamma$  dan TNF yang menyebabkan terjadinya maturasi makrofag lebih lanjut.
- Setelah melalui proses ini beberapa hari sampai beberapa minggu, granuloma matang terbentuk.
- Sel-sel lain termasuk netrofil dan sel B ditemukan dalam berbagai proporsi di dalam granuloma matang.<sup>49</sup>

Sebagai suatu bentuk respon inflamasi, dilihat dari jenis sel yang membentuknya maka granuloma tergolong sebagai suatu inflamasi kronis.<sup>14, 47</sup>



**Gambar 8. Klasifikasi proses inflamasi<sup>14</sup>**

Granuloma yang sengaja dibentuk dengan beberapa model induksi seperti *cotton pellet granuloma* dan *six days air pouch* adalah model dari inflamasi kronik non-imun. Di sini makrofag yang terbentuk adalah akibat reaksi terhadap kapas maupun larutan karageenan sebagai benda asing terhadap sel tubuh. <sup>14, 36, 47</sup>

## 7. Pemeriksaan kadar tromboksan B<sub>2</sub> dengan metode *Enzyme Immunoassay* ( EIA ) <sup>49</sup>

Pemeriksaan ini didasarkan pada kompetisi antara tromboksan B<sub>2</sub> ( TXB<sub>2</sub> ) dan konjugat TXB<sub>2</sub> – AchE ( TXB<sub>2</sub> *tracer* ) untuk sejumlah tertentu TXB<sub>2</sub> – *specific rabbit antiserum binding sites*. Karena konsentrasi *tracer* TXB<sub>2</sub> tetap konstan sementara konsentrasi TXB<sub>2</sub> bervariasi, jumlah *tracer* TXB<sub>2</sub>, jumlah *tracer* TXB<sub>2</sub> yang dapat berikatan pada antiserum kelinci dapat menjadi berbanding terbalik terhadap konsentrasi TXB<sub>2</sub> di dalam *well*. Kompleks antiserum - TXB<sub>2</sub> kelinci ini berikatan dengan *IgG mouse monoclonal anti – rabbit* yang sebelum itu sudah ditempelkan pada *well*. *Plate* tersebut dicuci untuk menghilangkan semua reagen yang tidak terikat, lalu reagen Ellman ( yang mengandung substrat terhadap AChE ) ditambahkan pada *well*. Produk dari reaksi enzimatik ini memperlihatkan warna kuning yang jelas dan mempunyai serapan kuat pada  $\lambda$  412 nm. Intensitas warna ini, yang dideterminasi secara spektrofotometri, adalah sebanding dengan jumlah *tracer* TXB<sub>2</sub> yang terikat pada *well*, yang mana berbanding terbalik terhadap jumlah TXB<sub>2</sub> bebas yang terlihat dalam *well* selama inkubasi; atau :

$$\text{serapan} \approx [\text{ikatan tracer TXB}_2] \approx 1/[\text{TXB}_2]$$

## 8. Definisi-definisi dalam pemeriksaan kadar tromboksan B<sub>2</sub> dengan metode *Enzyme Immunoassay* ( EIA )<sup>49</sup>

- a. Blanko ( Blk ) : serapan latar belakang yang disebabkan oleh reagen Ellman. Setiap reagen Ellman yang disiapkan dalam keadaan segar mempunyai beberapa serapan yang dapat diukur, kira-kira 0.1 Absorbance Units ( A.U ). Serapan blanko harus dikurangi dari serapan yang dibaca dari semua *wells* yang lain.
- b. Aktivitas total ( TA ) : total aktivitas enzimatik dari AChE-terikat *tracer*. Ini merupakan analog dari aktivitas spesifik *tracer* radioaktif.
- c. Ikatan nonspesifik ( NSB ) : ikatan *tracer* secara non-imun pada *well*. Setiap ketiadaan antiserum spesifik, sejumlah kecil *tracer* selalu terikat pada *well*; NSB tersebut adalah ukuran dari ikatan yang sedikit jumlahnya.
- d. Ikatan maksimum ( B<sub>0</sub> ) : jumlah ikatan maksimum *tracer* di mana antiserum dapat berikatan pada keadaan tidak ada analit bebas.
- e. % B / B<sub>0</sub> : rasio serapan dari sebagian sampel atau *well* standar terhadap ikatan maksimum *well*.
- f. Kurva standar : sekelompok nilai % B/B<sub>0</sub> vs konsentrasi dari serangkaian *wells* yang mengandung berbagai jumlah analit yang diketahui.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **1. Bahan dan alat**

##### **A. Hewan percobaan**

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus galur Spague-Dawley sebanyak 50 ekor berumur 4-5 bulan dengan berat badan antara 225-275 gram, berjenis kelamin jantan, berasal dari BPOM – Jakarta.

2. Makanan tikus standar ( BPOM – Jakarta )
3. Aspartam ( Sigma – Aldrich )
4. Sodium diklofenak ( Yung Zip Chemical Ind. Co., Ltd )
5. Indometasin ( Sigma – Aldrich )
6. Larutan dietil eter teknis
7. Larutan povidon iodine
8. Larutan NaCl 0.9 %
9. Air *ultra pure*
10. Karageenan serbuk ( Serva feinbiochemica Heidelberg )

##### **B. Alat**

1. Sungkup kaca anestesia
2. Papan fiksasi
3. Bisturi dan mata pisau bedah sekali pakai
4. *Anatomy set*
5. Spuit 5 mL, 10 mL
6. Needle 18G, 21G
7. Tabung mikrosentrifus

8. Tabung reaksi
9. Kertas alumunium dan parafilm
10. Mikrosentrifus
11. Lemari pendingin 4<sup>0</sup>C, -20<sup>0</sup>C, -80<sup>0</sup>C
12. Vorteks *mixer*
13. Mikropipet dan tips
14. Timbangan analitik
15. Timbangan mikrosentrifus
16. Sonde
17. Alat-alat gelas penunjang
18. Pot plastik
19. Thromboxane B<sub>2</sub> EIA kit strip plate ( Cayman Chemical, Ann Arbor, MI ) no. catalog 519031
20. Otoklaf

## **2. Desain percobaan**

Tikus jantan galur *Sprague – Dawley* berumur 12 – 16 minggu dengan berat 225-275 gram diaklimatisasi selama seminggu dalam ruangan khusus pada suhu 25<sup>0</sup>C dengan siklus harian 12 jam terang/gelap dan mendapat makanan tikus standar (*rodent chow*) dan air secukupnya.

Tikus direncanakan untuk dibagi menjadi 4 kelompok. Kemudian setiap kelompok mendapat perlakuan sebagai berikut :

- Kelompok kontrol negatif :

mendapat akuades 2 mL, diberikan 1 kali / hari

- Kelompok kontrol positif :

mendapat Na-diklofenak dalam akuades 2 mL dengan dosis

1 mg/kgBB dikalikan faktor 10, diberikan 1 kali / hari

- Kelompok dosis (D)-1 :

mendapat aspartam dalam akuades 2 mL dengan dosis 40

mg/kgBB dikalikan faktor 10, diberikan 1 kali / hari.

- Kelompok dosis (D)- 2 :

mendapat aspartam dalam akuades 2 mL dengan dosis 40

mg/kgBB dikalikan faktor 20, diberikan 1 kali / hari

Dosis aspartam ditentukan berdasarkan ADI sebesar 40 mg/kgBB dikalikan faktor 10 dan 20.

Tikus yang tersedia dibagi menjadi beberapa kelompok, yang masing-masing terdiri dari 6-8 ekor. Setiap kelompok dibagi secara random ke dalam 4 perlakuan.

Digunakan rumus *Federer* untuk menentukan jumlah minimal perkelompok perlakuan :

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

dimana : t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah hewan coba per-kelompok perlakuan

Penetapan kadar tromboksan B<sub>2</sub> dalam serum dan uji pengaruh aspartam terhadap berat granuloma hasil induksi mula-mula menggunakan jumlah kelompok perlakuan = 4, maka jumlah hewan coba perkelompok perlakuan ≥ 6. Pada penelitian ini digunakan n=7 berdasarkan keterbatasan jumlah sampel yang dapat diperiksa dengan Thromboxane B<sub>2</sub> EIA kit strip plate (Cayman

chemical, Ann Arbor, MI) no. catalog 519031, adanya tikus yang mati selama induksi dan sampel serum yang lisis.

Kemudian karena pada kelompok kontrol positif tidak menunjukkan perbedaan berat granuloma yang berarti dibandingkan terhadap kelompok kontrol negatif maka kelompok kontrol positif ditambah lagi 1 kelompok dan mendapat perlakuan sebagai berikut :

kelompok kontrol positif – 2 mendapat Na-diklofenak dengan dosis 1 mg/kgBB dikalikan faktor 20, diberikan dalam 2 dosis terbagi.

Dengan demikian, untuk uji pengaruh aspartam terhadap berat granuloma hasil induksi dipergunakan 5 kelompok perlakuan, maka berdasarkan rumus Federer jumlah hewan coba per-kelompok perlakuan  $\geq 5$ . Digunakan  $n = 8$  berdasarkan keterbatasan jumlah dan sumber tikus serta adanya tikus yang mati selama induksi atau ada tikus yang tidak dapat digunakan lagi karena tidak memenuhi kriteria inklusi mengenai berat badan tikus. Kelompok tambahan kontrol positif-2 sebanyak 10 ekor tikus dibagi 2 menjadi 2 kelompok namun tidak lagi menggunakan sistem undian menggunakan tabel random karena hanya terdiri dari satu macam perlakuan untuk tiap kelompoknya. Pada kelompok tambahan ini 1 ekor mati karena pembiusan, 1 ekor lagi tidak digunakan karena tidak memenuhi kriteria inklusi mengenai berat badan tikus.

### **3. Tempat dan waktu penelitian**

Penelitian dilakukan di Bagian Farmakologi dan Terapeutik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia serta Laboratorium Makmal Terpadu. Penelitian berlangsung dari Desember 2006 sampai Oktober 2007.

#### **4. Cara kerja**

##### 4.1. Induksi granuloma

- 4.1.1. Bulu punggung tikus dicukur habis terlebih dahulu seluas  $\pm 8 \times 4$  cm.
- 4.1.2. 6 mL udara disuntikkan subkutan pada punggung semua tikus setelah sebelumnya dianestesi dengan eter ( hari pertama ).
- 4.1.3. Hari ketiga disuntikkan kembali 3 mL udara secara subkutan pada punggung semua tikus setelah sebelumnya dianestesi dengan eter.
- 4.1.4. Keesokan harinya ( hari keempat ) 4 mL larutan karageenan 2 % dalam NaCl fisiologis yang telah disterilkan dalam otoklaf disuntikkan pada gelembung udara yang telah terbentuk setelah sebelumnya dianestesi dengan eter..
- 4.1.5. 3 hari kemudian besarnya gelembung diukur. Dipakai gelembung yang bentuk dan ukurannya kira-kira sama.

##### 4.2. Pemberian obat dan pengambilan sampel darah

Obat mulai diberikan pada hari ke-7, 8 dan 9, yaitu aspartam atau N-diklofenak, setelah lebih dahulu diambil darah untuk pemeriksaan kadar tromboksan B<sub>2</sub>, kecuali pada kelompok kontrol positif-2 yang hanya dipergunakan granulomanya saja. Setelah pemberian obat selama 3 hari, tikus percobaan dimatikan dengan eter dan didekapitasi untuk diambil darahnya guna pemeriksaan kadar tromboksan B<sub>2</sub> kembali; kecuali kelompok kontrol positif – 2 yang tidak didekapitasi untuk diambil darahnya.

#### 4.3. Pemeriksaan kadar tromboksan B<sub>2</sub>

##### 4.3.1. Preparasi pre-uji :

##### 4.3.1.1. Preparasi larutan dapar EIA :

Isi dari 1 vial larutan dapar EIA pekat ( vial no. 4 ) diencerkan dengan 90 mL air *ultrapure*. Vial dibilas untuk memindahkan semua garam-garam yang mungkin mengendap.

Komposisi dan preparasi larutan dapar EIA pekat ( konsentrasi 10 X ) :

- 133 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 32.15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + air *ultra pure* sampai dengan volume 1 L → dapar fosfat 1.0 M pH 7.4
- 100 mL larutan dapar fosfat 1.0 M pH 7.4 + 100 mg NaN<sub>3</sub> + 23.4 g NaCl + 370 mg Na<sub>4</sub>EDTA + 1 g BSA + air *ultra pure* sampai dengan volume 1 L <sup>48, 49</sup>

##### 4.3.1.2. Preparasi larutan dapar pencuci :

Sebanyak 5 mL larutan dapar pencuci pekat diencerkan menjadi volume total 2 L dengan air *ultrapure* dan tambahkan 2 mL Tween 20 ( vial no. 5a )

Komposisi dan preparasi larutan dapar pencuci pekat ( konsentrasi 400 X ) :

10 mL 1.0 larutan dapar fosfat + 0.5 mL Tween 20 ( C<sub>58</sub>H<sub>114</sub>O<sub>26</sub> ) + air *ultra pure* sampai dengan volume 1.0 L <sup>51, 52</sup>

#### 4.3.1.3. Preparasi sampel :

Sampel yang digunakan adalah serum darah tikus. Segera setelah pengambilan darah dalam tabung yang telah diberikan larutan indometasin 10  $\mu\text{M}$  sebanyak 2  $\mu\text{L}$  yang berfungsi menghentikan pembentukan tromboksan  $\text{B}_2$  dalam darah lebih lanjut. Kemudian darah segera disentrifus dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Serum yang terbentuk segera dipisahkan dan segera disimpan pada suhu  $-80^\circ\text{C}$ .

Umumnya serum, urin dan supernatan kultur sel boleh dilarutkan dengan larutan dapar EIA dan langsung ditambahkan pada *wells*.

Pada penelitian ini, dilakukan 2 kali orientasi pemeriksaan kadar tromboksan  $\text{B}_2$  dan 1 kali pengerjaan seluruh sampel serum tikus sebagai berikut :

- a. Orientasi pertama serapan serum tikus tidak dapat terbaca, diduga kadar tromboksan  $\text{B}_2$  terlalu tinggi.
- b. Orientasi kedua dilakukan pengenceran 50 X dan 100 X terhadap serum tikus, kadar tromboksan  $\text{B}_2$  sudah dapat terbaca tetapi masih agak tinggi.
- c. Pada pengerjaan seluruh sampel dilakukan pengenceran 100 X dan 200 X untuk tiap-tiap sampel.

#### 4.3.1.4. Preparasi reagen khusus :

##### a. Larutan standar tromboksan $\text{B}_2$ :

- 100  $\mu\text{L}$  larutan standar  $\text{TXB}_2$  ( vial no. 3 ) dipindahkan ke dalam tabung reaksi bersih berkode stok standar lalu

diencerkan dengan 900  $\mu\text{L}$  air *ultrapure*. Konsentrasi larutan ini ( standar terbesar ) adalah 10 ng/mL.

- 8 tabung bersih disiapkan dan diberi kode 1 sampai dengan 8.

- Kemudian dimasukkan sejumlah 900  $\mu\text{L}$  larutan dapar EIA pada tabung 1 dan 500  $\mu\text{L}$  larutan dapar EIA pada tabung-tabung 2 - 8. Lalu 100  $\mu\text{L}$  dari standar terbesar (10 ng/ mL) dipindahkan ke dalam tabung 1, dicampur dengan baik. Secara berseri standar dibuat pengenceran dengan memindahkan 500  $\mu\text{L}$  dari tabung 1 dan ditempatkan pada tabung 2, dicampur dengan baik. Kemudian 500  $\mu\text{L}$  dari tabung 2 dipindahkan dan ditempatkan pada tabung 3, dicampur dengan baik. Ulangi proses ini untuk tabung 4 - 8. Konsentrasi standar yang diharapkan adalah 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 dan 7.8 pg/mL.

b. *Tracer* tromboksan B<sub>2</sub> – AChE

- 100 dtn ( *determination* ) tracer TXB<sub>2</sub> diencerkan dengan 6 mL larutan dapar EIA. Tracer TXB<sub>2</sub> yang telah diencerkan tersebut disimpan pada suhu 4<sup>0</sup>C dan dapat digunakan dalam waktu 4 minggu.

c. Pembilas *tracer* (opsional)

- Pembilas ini boleh ditambahkan pada *tracer*, jika diinginkan, untuk membantu visualisasi *tracer* di dalam *wells*. Pembilas ditambahkan untuk mengencerkan *tracer*

sampai terjadi kelarutan akhir 1 : 100 ( tambahkan 60  $\mu$ L pada 6 mL *tracer* ).

d. Antiserum tromboksan B<sub>2</sub>

- 100 dtn antiserum TXB<sub>2</sub> diencerkan dengan 6 mL larutan dapar EIA. Antiserum TXB<sub>2</sub> yang telah diencerkan tersebut disimpan pada 4<sup>0</sup>C. Akan stabil sekurang-kurangnya 4 minggu.

e. Pembilas antiserum ( opsional )

- Pembilas ini dapat ditambahkan pada antiserum untuk membantu visualisasi antiserum yang telah diencerkan dengan konsentrasi akhir 1 : 100 ( ditambahkan 60  $\mu$ L pembilas pada 6 mL antiserum )

4.3.2. Pemeriksaan dengan metode EIA

4.3.2.1. Contoh tampilan plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Blk	S <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	1	1	9	9	17	17	25	25	33
<b>B</b>	Blk	S <sub>2</sub>	S <sub>2</sub>	2	2	10	10	18	18	26	26	33
<b>C</b>	NSB	S <sub>3</sub>	S <sub>3</sub>	3	3	11	11	19	19	27	27	34
<b>D</b>	NSB	S <sub>4</sub>	S <sub>4</sub>	4	4	12	12	20	20	28	28	34
<b>E</b>	B <sub>0</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>5</sub>	5	5	13	13	21	21	29	29	35
<b>F</b>	B <sub>0</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>6</sub>	6	6	14	14	22	22	30	30	35
<b>G</b>	B <sub>0</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>7</sub>	7	7	15	15	23	23	31	31	36
<b>H</b>	TA	S <sub>8</sub>	S <sub>8</sub>	8	8	16	16	24	24	32	32	36

Keterangan :

Blk = blanko

TA = aktivitas total

NSB = ikatan non-spesifik

$B_0$  = ikatan maksimum

$S_1$ - $S_8$  = standar 1-8

1-36 = sampel

#### 4.3.2.2. Mengisi *wells* :

a. Larutan dapar EIA : 100  $\mu$ L larutan dapar EIA ditambahkan pada *wells* NSB.

50  $\mu$ L larutan dapar EIA ditambahkan pada *wells*  $B_0$ .

b. Larutan standar  $TXB_2$  : 50  $\mu$ L larutan standar  $TXB_2$  dari tabung 8 pada 2 *wells* dengan standar terendah (  $S_8$  ). 50  $\mu$ L larutan standar  $TXB_2$  dari tabung 7 pada 2 *wells* standar berikutnya (  $S_7$  ).

Prosedur ini diteruskan sampai semua standar ditambahkan sejumlah tersebut. Tip pipet yang sama harus digunakan untuk menambahkan sejumlah zat tersebut pada seluruh standar. Sebelum mempipet masing-masing standar, tip pipet diseimbangkan pada standar tersebut.

c. Sampel : ditambahkan 50  $\mu$ L sampel per-*well*.

d. Tracer AChE tromboksen  $B_2$  : ditambahkan 50  $\mu$ L pada setiap *well* kecuali *well* TA dan Blk.

e. Antiserum  $TXB_2$  : ditambahkan 50  $\mu$ L pada setiap *well* kecuali *well* TA, NSB dan Blk.

4.3.2.3. Inkubasi *plate* : tiap *plate* ditutup dengan plastik film dan inkubasi 18 jam pada suhu ruangan.

#### 4.3.2.4. Mengaktifkan *plate* :

- Jika siap untuk mengaktifkan *plate*, sebuah “100 dtn” vial reagen Ellman diencerkan dengan 20 mL air *ultrapure* ( 20 mL reagen cukup untuk mengaktifkan 100 *wells* ).
- Reagen Ellman yang telah diencerkan tidak stabil dan harus digunakan pada hari yang sama dengan waktu preparasi; lindungi dari cahaya jika tidak digunakan.
- *Wells* dikosongkan dan dibilas 5 kali dengan bufer pencuci. 200µL reagen Ellman ditambahkan pada masing-masing *well* dan 5 µL *tracer* pada *well* TA. *Plate* ditutup dengan film plastik.
- Aktivitas optimum akan diperoleh dengan menggunakan *shaker orbital* yang dilengkapi dengan penutup yang besar dan datar untuk memungkinkan *plate* diaktifkan di dalam gelap. *Assay* ini secara tipikal aktif ( bila  $well B_0 \geq 0.3 \text{ A.U } / \text{blank subtracted}$  ) dalam 60 menit.

#### 4.3.2.5. Membaca *plate* :

- *Plate* dibaca pada panjang gelombang 405 nm. Sebelum membaca masing-masing *plate*, dasar *plate* dibersihkan dengan tissue bersih untuk menghilangkan sidik jari, kotoran dan sebagainya, sebagaimana setiap noda pada dasar *plate* dapat mempengaruhi pembacaan serapan secara signifikan.
- Yakinkan bahwa reagen Ellman tidak terpercik ke bagian atas penutup *plate* sebagaimana setiap berkurangnya reagen Ellman akan mempengaruhi pembacaan serapan. Jika hal ini terjadi, pipet digunakan untuk memindahkan reagen Ellman dari penutup dan

tempatkan ke dalam *well*. Jika terlalu banyak reagen Ellman yang terpercik pada penutup, untuk memudahkan meredistribusikan kembali ke dalam *wells*, *plate* dicuci 3 kali dengan bufer pencuci dan ulangi pengaktifan dengan reagen Ellman yang baru.

- *Plate* tersebut boleh diperiksa kembali secara periodik sampai *wells*  $B_0$  mencapai sekurang-kurangnya 0.3 A.U ( setelah dikurangi blanko ). *Plate* harus dibaca jika serapan *wells*  $B_0$  berada pada rentang 0.3-1.0 A.U ( setelah dikurangi blanko ). Jika serapan *wells* melebihi 1.5 A.U, *plate* dicuci, reagen Ellman segar ditambahkan dan biarkan diaktifkan kembali.

#### 4.4. Penimbangan granuloma

Granuloma yang terbentuk dipisahkan secara hati-hati dengan bantuan pinset dan skalpel setelah terlebih dahulu dilakukan insisi seputar benjolan granuloma yang terbentuk. Granuloma yang telah diinsisi, selama pengerjaan 1 kloter dimasukkan dulu ke dalam termos plastik yang diberi es batu. Setelah insisi 1 kloter selesai dilakukan ( $\pm$  1 jam), granuloma dibawa ke laboratorium untuk ditimbang dalam keadaan segar.

### 5. Analisis statistik

Nilai rerata selisih kadar tromboksan  $B_2$  dan nilai rerata berat granuloma dikelompokkan menurut kelompok perlakuan. Selanjutnya data yang diperoleh diuji kemaknaannya. Mula-mula dilakukan uji normalitas distribusinya menggunakan uji Kolmogorov – Smirnov dan homogenitas variansnya menggunakan uji  $F_{max}$ . Bila distribusi data normal dan variansnya homogen maka dilakukan uji analisis varians ( ANOVA ) pada ke-4 kelompok untuk data

jadar tromboksan B<sub>2</sub> dalam serum dan pada ke-5 kelompok untuk data berat granuloma perlakuan batas kemaknaan  $\alpha = 0,05$ . Untuk setiap parameter yang menunjukkan perbedaan bermakna pada uji ANOVA akan dilanjutkan dengan uji perbandingan multipel Tukey.

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN

#### 1. Kadar tromboksan B<sub>2</sub> dalam serum

Persentase kenaikan kadar tromboksan B<sub>2</sub> dalam serum dihitung berdasarkan selisih kadar tromboksan B<sub>2</sub> antara sebelum dan sesudah pemberian obat, dibagi kadar tromboksan B<sub>2</sub> sebelum pemberian obat, kemudian dikalikan 100.

Nilai rerata persentase kenaikan kadar tromboksan B<sub>2</sub> dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2. Nilai rerata persentase kenaikan kadar tromboksan B<sub>2</sub>**

Kelompok	n	Persentase kenaikan kadar tromboksan B <sub>2</sub> (%)	F	P
I ( akuades 2 mL )	7	140.49 ( 199.8 )	0.413	0.745
II ( Na-diklofenak 10 mg/kgBB )	7	69.54 ( 196.17 )		
III ( Aspartam 400 mg/kgBB )	7	51,26 ( 65.52 )		
IV ( Aspartam 800 mg/kgBB )	7	71.97 ( 146.9 )		

n = jumlah hewan uji per kelompok

Data disajikan sebagai nilai rerata ( ± SD )

Data terdistribusi normal dan homogen. Uji ANOVA 1 arah pada  $\alpha = 0.05$  menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antar kelompok. Uji perbandingan multipel Scheffe pada  $\alpha = 0.05$  menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok

Hasil analisis statistik ( dapat dilihat pada Lampiran 4 ) menunjukkan data setiap kelompok tersebut di atas terdistribusi normal dan variansnya homogen, karena itu dilakukan uji Anova terhadap keempat kelompok tadi. Ternyata tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara keempat kelompok tersebut ( $p=0.745$ ).

Nilai rerata persentase kenaikan kadar tromboksan B<sub>2</sub> kelompok kontrol positif (Na-diklofenak 10 mg/kgBB) adalah sebesar 69.54 % dari kadar tromboksan B<sub>2</sub> sebelum pemberian obat atau terjadi hambatan sebesar 50,02

% terhadap kelompok kontrol negatif (akuades). Demikian pula nilai rerata persentase kenaikan kadar tromboksan B<sub>2</sub> kelompok dosis aspartam 10 kali dosis ADI adalah sebesar 51.26 % dari kadar tromboksan B<sub>2</sub> sebelum pemberian obat atau terjadi hambatan sebesar 63,51 % terhadap kelompok kontrol negatif dan kelompok dosis aspartam 20 kali dosis ADI adalah sebesar 71.97 % dari kadar tromboksan B<sub>2</sub> sebelum pemberian obat atau terjadi hambatan sebesar 48,77 % terhadap kelompok kontrol negatif. Akan tetapi semuanya tidak berbeda bermakna secara statistik.

Antara kelompok kontrol negatif dan kelompok yang mendapat aspartam 10 kali dosis ADI (40 mg/kgBB ) terlihat perbedaan yang besar(63,51 % ), maka kedua kelompok tersebut dibandingkan dengan uji perbandingan multipel Scheffe. Ternyata tidak ada perbedaan bermakna antara kedua kelompok tersebut ( $p>0.05$ )

## **2. Uji pengaruh aspartam terhadap granuloma hasil induksi**

Berat granuloma yang digunakan adalah berat granuloma yang ditimbang setelah diinsisi dari lapisan sebelah dalam kulit punggung tikus, masing-masing granuloma dimasukkan ke dalam kantong plastik tertutup kemudian disimpan selama kira-kira 1 jam dalam termos berisi es batu sampai insisi untuk 1 set pengerjaan yang terdiri dari 6-8 ekor tikus selesai dilakukan. Karena berat tikus tidak benar-benar *homogen* maka digunakan data berat granuloma yang dihitung per 100 g BB tikus.

Nilai rerata berat granuloma per 100 g BB tikus dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3. Nilai rerata berat granuloma hasil induksi per 100 g BB tikus**

Kelompok	n	Berat ganuloma per 100 g BB tikus	F	P
I ( akuades 2 mL )	8	0.8503 (0.3531)		
II...( Na-diklofenak 10 mg/kgBB )	8	0.8320 (0.64)		
III ( Na-diklofenak 20 mg/kgBB )	8	0.5920 (0.1614)	0.447	0.774
IV ( Aspartam 400 mg/kgBB )	8	0.8378 (0.8378)		
V ( Aspartam 800 mg/kgBB )	8	0.9455 (0.4241)		

n = jumlah hewan uji per kelompok

Data disajikan sebagai nilai rerata (  $\pm$  SD )

Data terdistribusi normal dan homogen. Uji Anova 1 arah pada  $\alpha = 0.05$  menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antar kelompok ( Lampiran 4 )

Hasil analisis statistik ( dapat dilihat pada lampiran 4 ) menunjukkan data setiap kelompok tersebut di atas terdistribusi normal dan variansnya homogen, karena itu dilakukan uji Anova terhadap keempat kelompok tersebut. Ternyata uji Anova terhadap keempat kelompok tersebut tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna ( $p=0.774$ ).

Pengaruh antiinflamasi; dalam hal ini adalah Na-diklofenak, baru terlihat pada kelompok kontrol positif-2 (Na-diklofenak 20 mg/kgBB), di mana terdapat pengurangan nilai rerata berat granuloma per 100 g BB tikus sebesar 30,38 % bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (akuades) tetapi tidak berbeda bermakna. Pada kelompok kontrol positif-1(Na diklofenak 10 mg/kgBB) hanya terjadi pengurangan nilai rerata berat granuloma per 100 g BB tikus sebesar 1,47 % atau relatif sama besar bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

Sedangkan nilai rerata berat granuloma per 100 g BB tikus pada kelompok dosis aspartam 10 kali dosis ADI (40mg/kgBB) relatif sama dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif-1.

Nilai rerata berat granuloma per 100 g BB tikus pada kelompok dosis aspartam 20 kali dosis ADI justru lebih besar 11,2 % dan 13,64 % bila

dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif-1 namun juga tidak berbeda bermakna.

Nilai rerata berat granuloma per 100 g BB tikus pada kelompok aspartam 10 kali dosis ADI lebih besar 41,52 % bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif-2 namun juga tidak berbeda bermakna.

Nilai rerata berat granuloma per 100 g BB tikus pada kelompok dosis aspartam 20 kali dosis ADI lebih besar 59,71 % bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif-2 namun juga tidak berbeda bermakna.

## BAB V

### PEMBAHASAN

Walaupun belum ditemukannya bukti nyata bahwa aspartam dapat menginduksi timbulnya tumor atau neoplasma serta menyebabkan gangguan neuropsikiatrik yang berarti, sejumlah kecil peneliti yaitu Edmunson dkk melalui penelitiannya berpendapat bahwa aspartam memiliki efek *aspirin-like*, yaitu efek analgetik, antiinflamasi, antipiretik dan antiagregasi trombosit.<sup>9</sup>

Kelompok peneliti lain yaitu Sharma dkk melalui penelitiannya bahwa aspartam mempunyai efek sinergis terhadap analgetik opioid dan antiinflamasi nonsteroid.<sup>10</sup>

Penelitian ini didesain untuk melihat adanya pengaruh aspartam terhadap aktivitas enzim siklooksigenase. Siklooksigenase (COX) adalah suatu enzim yang memperantarai pembentukan prostaglandin dan tromboksan dari asam arakidonat. Jalur reaksi biokimiawi ini merupakan salah satu dari mediator inflamasi atau peradangan.<sup>26</sup>

Desain penelitian ini yang pertama adalah mengukur kadar tromboksan B<sub>2</sub> dalam serum. Kadar tromboksan B<sub>2</sub> dapat mencerminkan aktivitas siklooksigenase, baik COX-1 maupun COX-2 karena enzim ini mengkatalisis reaksi pembentukan tromboksan dari asam arakidonat. Selain itu tromboksan di dalam darah berperan dalam agregasi trombosit, kiranya dapat menguji kembali pendapat Edmunson dkk dalam penelitiannya bahwa aspartam dapat memperpanjang waktu perdarahan.<sup>9, 26, 37</sup>

Desain penelitian yang kedua adalah uji efek aspartam terhadap granuloma hasil induksi udara dan larutan karageenan 2 %. Granuloma, baik

hasil induksi maupun karena adanya infeksi merupakan suatu bentuk inflamasi kronis. Desain penelitian ini dipilih untuk menguji kembali pendapat Edmunson dkk dalam penelitiannya bahwa aspartam mungkin dapat digunakan untuk mengobati *osteoarthritis*, dimana *osteoarthritis* adalah suatu inflamasi kronis. <sup>9,14</sup>

Penelitian ini seyogianya juga sejalan dengan maraknya penggunaan aspartam di Indonesia pada berbagai produk makanan kemasan, minuman instan dan suplemen makanan dalam bentuk serbuk yang dipercaya dapat meningkatkan stamina dan daya tahan tubuh. Juga dengan maraknya penggunaan aspartam sebagai pengganti gula pasir pada penderita diabetes mellitus dan juga untuk mengurangi asupan kalori ke dalam tubuh pada orang normal guna mempertahankan berat badan ideal.

Natrium diklofenak dipilih sebagai obat pada kelompok kontrol positif karena sebagai suatu antiinflamasi nonsteroid mempunyai sifat sebagai berikut :

- a. Potensinya dalam menghambat baik aktivitas COX-1 maupun COX-2 hampir sama
- b. Dapat diakumulasi di cairan sinovial sehingga diharapkan juga dapat menembus granuloma dengan baik
- c. Efek samping berupa iritasi saluran cerna lebih kecil dibanding beberapa jenis AINS lain seperti misalnya dengan piroksikam <sup>36</sup>

Tanpa menyetujui kemungkinan efek samping yang merugikan dari aspartam, penelitian Edmunson dkk memperoleh data bahwa kemampuan berjalan kaki pada sejumlah penderita osteoarthritis berusia sekitar 70 tahun bertambah sejauh 13 kaki dari 1002 kaki bila mengkonsumsi aspartam tetapi

berkurang sejauh 30 kaki dari 1020 kaki bila hanya mendapatkan plasebo, bila dibandingkan kemampuan pada 1 jam pertama dengan 1 jam ketiga.<sup>9</sup>

Penelitian Edmunson dkk juga memperoleh data bahwa terjadi perpanjangan waktu perdarahan selama 30 detik pada subyek yang mendapatkan aspartam dibandingkan dengan yang mendapat plasebo.<sup>9</sup>

Walaupun tidak menunjukkan kemaknaan secara statistik, terjadinya pengurangan kenaikan kadar tromboksan B<sub>2</sub> pada kelompok tikus yang mendapat aspartam 10 kali dan 20 kali dosis ADI bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dan positif dapat memperkuat dugaan bahwa efek perpanjangan waktu perdarahan yang didapatkan pada penelitian Edmunson dkk disebabkan karena aspartam menghambat aktivitas enzim siklooksigenase.<sup>9, 11, 26</sup>

Penelitian Cook dkk menggunakan tikus yang diinduksi dengan *Salmonella enteritidis* sebagai endotoksin memperlihatkan kadar TXB<sub>2</sub> plasma < 375 pg/mL pada tikus normal dan kadar 2054±524 pg/mL dalam 30 menit setelah induksi dan kadar 1119±319 pg/mL dalam 120 menit setelah induksi. Kedua penelitian ini menunjukkan keragaman kadar TXB<sub>2</sub> hasil induksi.<sup>51</sup> Penelitian Klausner dkk yang melihat kadar TXB<sub>2</sub> plasma pada domba yang diinduksi iskemia memperlihatkan kadar yang meningkat dari 211 pg/mL menjadi 735 pg/mL dalam waktu 30 menit.<sup>52</sup>

Ketidakteraturan kadar tromboksan B<sub>2</sub> sesaat pada hari keenam sebelum tikus diberikan aspartam maupun hari kesepuluh setelah diberikan aspartam dimungkinkan karena merupakan hasil induksi dengan udara dan larutan karageenan 2 % dan kadar yang diukur adalah in vivo. Karena itu

parameter yang dipakai adalah persentase penurunan kadar tromboksan B<sub>2</sub> setelah pemberian akuades, Na-diklofenak dan aspartam.

Data pengaruh berat granuloma hasil induksi pada tikus yang mendapatkan aspartam sebenarnya diharapkan dapat menjadi data sekunder yang memperkuat kebenaran atas hipotesis bahwa aspartam mempunyai aktivitas menghambat kerja enzim siklooksigenase. Ternyata tidak didapatkan pengaruh terhadap berat granuloma atau hambatan pembentukan granuloma.

Penelitian Russo dkk menunjukkan efek hambatan pembentukan granuloma dengan memberikan ketotifen parenteral sebesar 25 mg/kgBB pada hari yang sama dengan dimulainya induksi.<sup>53</sup>

Penelitian Arosal dkk menunjukkan efek hambatan pembentukan granuloma yang lebih baik bila metilprednisolon intraperitoneal yang diberikan dalam bentuk senyawa dengan liposom.<sup>13</sup>

Prostaglandin E<sub>2</sub> diketahui diproduksi oleh berbagai *antigen presenting cell* ( APC ) seperti makrofag dan sel dendrit. Selain peranan enzim siklooksigenase, penelitian Kuroda dan Yamashita menemukan bahwa stimulasi yang sama pada mencit dengan galur yang berbeda menghasilkan jumlah PGE<sub>2</sub> yang diproduksi oleh makrofag juga berbeda. PGE<sub>2</sub> justru menekan respon Th 1.<sup>55</sup>

Kemungkinan tidak didapatkannya pengaruh terhadap berat granuloma pada pemberian aspartam 10-20 kali dosis ADI dapat disebabkan berbagai faktor.

Faktor yang pertama kemungkinan adalah karena aspartam diberikan secara peroral sehingga aspartam tidak dapat mencapai granuloma dalam jumlah yang cukup. Namun bagaimanapun juga desain penelitian ini dengan

memberikan aspartam peroral adalah karena penelitian pendahulu yang dilakukan oleh Edmunson dkk dan Sharma dkk juga memberikan aspartam kepada subyek peroral. <sup>9, 10</sup>

Yang kedua karena pembentukan granuloma melibatkan banyak faktor selain enzim siklooksigenase. Granuloma yang tergolong sebagai suatu inflamasi kronis terutama terbentuk akibat agregasi makrofag disertai subpopulasi limfosit, fibroblast dan berbagai jenis sel lainnya termasuk kolagen. <sup>51</sup>

Faktor ketiga adalah kalau aspartam diduga mempengaruhi aktivitas enzim siklooksigenase maka aspartam akan menurunkan jumlah produksi PGE<sub>2</sub> yang diproduksi oleh makrofag. Aspartam mempengaruhi reaksi yang disebabkan oleh PGE<sub>2</sub> berupa eritema, vasodilatasi, edema dan hiperalgesia yang timbul dalam waktu singkat atau dengan kata lain reaksi pada inflamasi akut. Namun pada inflamasi kronis PGE<sub>2</sub> justru memiliki mekanisme umpan balik negatif terhadap reaksi imunologis di mana PGE<sub>2</sub> menekan aktivitas Th1, TNF dan IFN- $\gamma$  yang sangat berperan pada pembentukan granuloma. <sup>33, 47, 50, 55</sup>

Bahwa Na-diklofenak pada dosis 1 mg/kgBB dikalikan faktor 20 memperlihatkan efek hambatan terhadap pertumbuhan granuloma kemungkinan karena Na-diklofenak juga menghambat mediator inflamasi yang lain. Na-diklofenak mempunyai aktivitas relatif antiinflamasi yang sama besar dengan aktivitas relatif terhadap sintesis prostaglandin. Sedangkan belum ada data tentang aktivitas relatif aspartam sebagai antiinflamasi maupun sintesis prostaglandin. <sup>39</sup>

Pada penelitiannya, Edmunson tidak membandingkan efek analgetik dan antiinflamasi aspartam terhadap AINS lain tetapi terhadap plasebo yang sama

sekali tidak mempunyai aktivitas relatif antiinflamasi dan aktivitas relatif terhadap sintesis prostaglandin. Demikian pula metode penelitian yang digunakan oleh Edmunson dkk, kemungkinan pada data yang diperoleh peranan efek analgesik lebih memegang peranan daripada efek antiinflamasi.<sup>9</sup>

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 1. Kesimpulan

1.1. Pemberian aspartam 10 kali dan 20 kali dosis ADI ( 40 mg/kgBB ) selama 3 hari berturut-turut pada tikus dengan granuloma subkutan hasil induksi cenderung mengurangi kenaikan kadar tromboksan B<sub>2</sub> serum bila dibandingkan dengan kelompok kontrol yang mendapat akuades. Karena pembentukan tromboksan B<sub>2</sub> dari asam arakidonat diperantarai oleh kedua jenis siklooksigenase berarti dapat diambil kesimpulan bahwa aspartam mempengaruhi aktivitas siklooksigenase.

1.2. Pengaruh aspartam terhadap kenaikan kadar tromboksan B<sub>2</sub> memperkuat pendapat bahwa aspartam memperpanjang waktu perdarahan melalui efek anti agregasi trombosit.

1.3. Pemberian aspartam dengan 10 kali dan 20 kali dosis ADI ( 40 mg/kgBB ) selama 3 hari berturut-turut pada tikus dengan granuloma subkutan hasil induksi tidak memperlihatkan efek hambatan pembentukan granuloma bila dibandingkan dengan kelompok kontrol yang mendapat akuades (aspartam tidak memperlihatkan efek terhadap inflamasi kronis).

1.4. Granuloma bukan model yang cocok untuk melihat pengaruh suatu obat atau zat terhadap aktivitas siklooksigenase.

## **2. Saran**

2.1. Perlu diteliti lebih lanjut pengaruh aktivitas aspartam terhadap aktivitas siklooksigenase pada dosis kecil dan pemberian jangka waktu lama.

2.2. Perlu diteliti lebih lanjut pengaruh aktivitas aspartam terhadap aktivitas siklooksigenase apabila diberikan bersama-sama dengan obat lain yang juga mempunyai efek antiagregasi trombosit.

2.3. Bagi industri produk makanan dan minuman kemasan, minuman instan dan suplemen makanan : mengkaji perlunya mencantumkan peringatan pada kemasan agar berhati-hati bila mengkonsumsi produk mengandung aspartam bersamaan dengan obat yang berefek antiagregasi trombosit

### Lampiran 1. Perhitungan dosis

Perhitungan dosis Na-diklofenak untuk kelompok kontrol positif-1 dan positif-2 :

50 mg/hari ( org dewasa 50 kgBB ) =

$$\frac{50 \text{ mg}}{50 \text{ kgBB}} = 1 \text{ mg/kgBB/hari}$$

Diberikan untuk tikus = 1 mg/kgBB/hari X faktor 10 = 10 mg/kgBB/hari

Diberikan 1 X/hari untuk kelompok kontrol positif-1

Diberikan untuk tikus = 1 mg/kgBB/hari X faktor 20 = 20 mg/kgBB/hari

Diberikan dalam 2 dosis terbagi untuk kelompok kontrol positif-2

## **Lampiran 2. Contoh data kurva standar**

### **1. Kurva standar kadar tromboksan B<sub>2</sub> metode ELISA**

**(Caymanchem, Ann Arbor, MI)**

## DAFTAR PUSTAKA

1. Inglet GE. Sweeteners : an overall perspective. Dalam : Stegink LD, Filer, JR. LJ; editor. Aspartame physiology and biochemistry. New York : Marcel Dekker Inc; 1984 : 11-25
2. Aspartame. British Nutrition Foundation 2006. Diunduh dari : <http://Britishnutritionfoundation.htm>
3. Puthrasingam S, Heybroek WM, Johnston A, Maskrey V, Swift CG. Aspartame pharmacokinetics – the effect of ageing. Age and Ageing 1996. Diunduh dari : <http://www.finarticles.com>
4. Direktorat Standarisasi Produk Pangan, Deputi Bidang Pengawasan Keamanan Pangan dan Bahan Berbahaya. Peraturan teknis penggunaan bahan tambahan pangan pemanis buatan dalam produk pangan. Dalam : Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. : HK. 00.05.5.1.4547 tentang persyaratan penggunaan bahan tambahan pangan pemanis buatan dalam produk pangan. Jakarta : BPOM. 2004
5. Soffriti M, Belpoggi F, Esposti DD, Lambertini L, Tibaldi E, et all. First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to Sprague – Dawley rat. Environmental Health Perspective. 2006; 144 (3) : 379-85
6. Olney JW, Farber NB, Spitznagel E, Robins LN. Increasing brain tumor rates : is there a link to aspartame ? J. Neuropathol Exp Neurol. 1996; 55: 1115 [ abstract ]
7. Wolraich ML, Lindgren SD, Stumbo PJ, Stegink LD, Appelbaum MI, et all. Effect of diets high in sucrose or aspartame on the behavior and cognitive performance of children. NEJM. 1994; 330 ( 5 ) : 301-7
8. Spiers PA, Sabounjian LA, Reiner A, Myers DK, Wurtman J, et all. Aspartame : neuropsychologic and neurophysiologic evaluation of acute and chronic effect. Am J Clin Nutr. 1998; 68 : 531 – 37
9. Edmunson AB, Manion CV. Treatment of osteoarthritis with aspartame. Clin Pharmacol Ther. 1998; 63 : 580-93
10. Sharma S, Jain NK, Kulkarni SK. Possible analgetic and antiinflamatory interaction of aspartame with opioid and NSAID. Indian J Exp Biol. 2005; 43 ( 6 ) : 498 – 502 [ abstract ]
11. Setiawan B. Farmakologi prostaglandin, tromboksan dan prostasiklin. Dalam : Prostaglandin dan implikasi klinis. Tjokronegoro A, Setiawan B; editor. Jakarta : FKUI. 1983 : 1-14

12. Ouellet M, Riendeau D, Percival MD. A high level of cyclooxygenase-2 inhibitors selectivity is associated with a reduced interference of platelet cyclooxygenase-1 inactivation by aspirin. PNAS. 2001; 98 ( 25 ) : 14583 – 8
13. Arozal W, Suyatna FD, Purwaningsih EH, Dewoto HR. Peningkatan efek antiinflamasi sediaan metilprednisolon dalam bentuk liposome : suatu studi pada tikus. MKI. 2005; 55 : 16 – 22
14. Sedgwick AD, Willoughby. Animal model for testing drugs on inflammatory and hypersensitivity reactions. Dalam : Dale MM, Foreman JC; editor. Immunopharmacology 2<sup>nd</sup> ed. London : Blackwell Scientific Publication; 1989 : 253 – 61
15. Mazur RH. Discovery of aspartame. In : Stegink LD, Filer, Jr LJ (editors). Aspartame : physiology and biochemistry. New York : Marcell Dekker Inc. 1984 : 3-9
16. Aspartame. Diunduh dari :  
<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/aspartame/aspartameh.html>
17. Opperman JA. Aspartame metabolism in animals. Dalam : Stegink LD, Filer, Jr LJ (editors). Aspartame : physiology and biochemistry. New York : Marcell Dekker Inc. 1984 : 141-159
18. Stegink LD. Aspartate and glutamate metabolism. Dalam : Stegink LD, Filer, Jr LJ (editors). Aspartame : physiology and biochemistry. New York : Marcell Dekker Inc. 1984 : 47-76
19. Harper AE. Phenylalanine metabolism. Dalam : Stegink LD, Filer, Jr LJ (editor). Aspartame : physiology and biochemistry. New York : Marcell Dekker Inc. 1984 : 77-110
20. Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. Genetics in medicine. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia : WB Saunders Company. 1991 : 271-316
21. Longo N. Inherited disorders of amino acid metabolism and storage. In : Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL et al ( editor ). Harrison's Principles of Internal Medicine. 15<sup>th</sup> ed. New York : McGraw-Hill Companies. 2001 : 2301-2309
22. Tephly TR, McMartin KE. Metanol metabolism and toxicity. Dalam : Stegink LD, Filer, Jr LJ (editors). Aspartame : physiology and biochemistry. New York : Marcell Dekker Inc. 1984 : 111-140
23. Molinary SV. Preclinical studies of aspartame in non primate animals. Dalam : Stegink LD, Filer, Jr LJ (editors). Aspartame : physiology and biochemistry. New York : Marcell Dekker Inc. 1984 : 289-306

24. Methanol metabolism. Diunduh dari :  
[http://www.bionewsonline.com/g//trygve\\_brautaset\\_2003\\_3986\\_002.gif](http://www.bionewsonline.com/g//trygve_brautaset_2003_3986_002.gif)
25. Nasution AR. Prostaglandin dan inflamasi pada rheumatoid arthritis. Dalam : Tjokronegoro A, Setiawan B (editor). Prostaglandin dan implikasi klinis. Jakarta : FKUI. 1993 : 75-99
26. Terr AI. Inflammation. Dalam : Stites DP, Terr AI, Parslow TG (editor). Medical Immunology. Connecticut : Appleton & Lange. 1997 : 182-195
27. Katzung BG. Histamin, serotonin & the ergot alkaloids. Dalam : Katzung BG. Basic & clinical pharmacology. 9<sup>th</sup>ed. Boston : The McGraw-Hill companies inc. 2001 : 259-280
28. Steinmeyer J. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Arthritis res. 2000 : 2 (5) : 379-385
29. Belton O, Byrne D, Kearny D, Leaky A, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase-1 and-2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. Circulation. 2000; 102 : 840-853
30. Mitchell JA, Warner TD. Cyclooxygenase-1 : pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. BJP. 1999; 128 : 1121 – 1132
31. McAdam BF, Lawson FC, Kapoor AM, Lawson JA, Fitzgerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2 : the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. PNAS. 1999; 96 (1) : 272-277
32. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. NEJM. 2006; 354 (6) : 610-21
33. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. 4<sup>th</sup> ed. London : Mosby; 1996 : 1.1-1.12
34. Goodwin JS. Anti-inflammatory drugs. In : Stites DP, Terr AI, Parslow TG (editors). Medical Immunology. Connecticut : Appleton & Lange. 1997 : 861-882
35. Roberts LJ II, Morrow JD. Analgetic-antipyretic and anti-inflammatory agents and drug employed in the treatment of gout. In : Hardman JG, Limbird LE (editors). Goodman & Gilman`s the pharmacological basis of therapeutics 10<sup>th</sup>ed. USA : The McGraw-Hill companies inc. 2001 : 687-731

36. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes : the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol rev.* 2004 ; 56 : 387-437
37. Aspirin. Diunduh dari :  
[http://www.users.utu.fi/cheluo/aspirin\\_complete.gif](http://www.users.utu.fi/cheluo/aspirin_complete.gif)
38. Dale MM, Forman JC. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Dalam : Dale MM, Foreman JC (editor). *Immunopharmacology*. UK : Blackwell Scientific Publication. 1989 : 290-299
39. Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM, Muhammad J, Zweifel BS, et al. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *PNAS*. 1998; 95 (22) : 13313 – 13318
40. Corazzi T, Leone M, Maucci R, Corrazi L, Gresele P. Direct and irreversible inhibition of cyclooxygenase-1 by nitroaspirin (NCX-4016). *JPET*. 2005 ; 315 : 1331-1337
41. Lawson FC, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, De Marro S, et al. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *NEJM*. 2001 ; 345 : 1809 -1817
42. Natrium diclofenac. Diunduh dari :  
<http://www.edoc.hu-berlin.de/...HTML/object 69.png>
43. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu rev pharmacol toxicol*. 1998; 38 : 97 – 120
44. Mucha K, Foronczewicz B, Kosiak K, Paczek BC, Paczek L. The effect of indomethacin on angiogenic factors mRNA expression in renal cortex of healthy rats. *J Physiol & Pharmacol*. 2007; 58 (1) : 165-178
45. Indomethacin. Available at :  
<http://www.dailymed.nlm.gov/dailymed/image.cfm?id=23>
46. Parslow TG, Bainton DF. Innate immunity. In : Stites DP, Terr AI, Parslow TG (editors). *Medical Immunology*. Connecticut : Appleton & Lange. 1997 : 25-42
47. Granuloma. Diunduh dari :  
<http://www.pathgu.com/lectures/granuloma.jpg>
48. COX activity assay kit catalog no. 760151. Diunduh dari :  
<http://www.caymanchem.com>
49. Sarraf P, Sneller MC. Patogenesis of granuloma formation. Dalam : *Expert review in molecular medicine*. Cambridge University Press. 2005; 7 (8).

50. Precoated ( Goat anti-mouse IgG ) EIA 96-well strip plates catalog no. 40009. Diunduh dari : <http://www.caymanchem.com>
51. Cook JA, Wise WC, Halushka PV. Elevated thromboxane levels in the rat during endotoxic shock. *J Clin Invest.* 1980; 65 : 227-230
52. Klausner JM, Anner H, Paterson IA, Kobzik L, Valeri CR, et al. Lower torso ischemia-induced lung injury is leukocyte dependent. *Ann surg.* 1988; 208 (6) : 761-7
53. Russo A, Russo G, Peticca M, Pietropaolo C, Di Rosa M, et al. Inhibition of granuloma-associated angiogenesis by controlling mast cell mediator release : role of mast cell protease-5. *BJP.* 2005; 145 : 24-33
54. Kuroda E, Yamashita U. Mechanisms of enhanced macrophage-mediated prostaglandin E<sub>2</sub> production and its suppressive role in Th 1 activation in Th2- dominant BALB/c mice. *J Immunology.* 2003; 170 : 757-64