

PENGARUH PREVENTIF EKSTRAK GAMBIR (*Uncaria gambir Roxb.*) PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL FIBROSIS HEPAR TERHADAP KADAR MALONDIALDEHID (MDA) DAN GAMMA-GLUTAMYL TRANSFERASE (GGT)

SKRIPSI

Oleh:
KHAIRUNI AMINI
135130100111043



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

PENGARUH PREVENTIF EKSTRAK GAMBIR (*Uncaria gambir Roxb.*) PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL FIBROSIS HEPAR TERHADAP KADAR MALONDIALDEHID (MDA) DAN GAMMA-GLUTAMYL TRANSFERASE (GGT)

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
KHAIRUNI AMINI
135130100111043



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Preventif Ekstrak Gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) pada Tikus
(*Rattus norvegicus*) Model Fibrosis Hepar terhadap Kadar
Malondialdehid (MDA) dan *Gamma Glutamyl
Transferase* (GGT)**

Oleh:

**KHAIRUNI AMINI
135130100111043**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 3 Januari 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Agung Pramana W. Marhendra, M.Si

NIP. 19650616 199111 1 001

drh. Analis Wisnu Wardhana, M.Biomed

NIP. 19800904 200812 1 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh. DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Khairuni Amini

NIM : 135130100111043

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Preventif Ekstrak Gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Fibrosis Hepar terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan *Gamma Glutamyl Transferase* (GGT)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termasuk di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Januari 2018

Yang menyatakan,

(Khairuni Amini)

NIM. 135130100111043

Pengaruh Preventif Ekstrak Gambir (*Uncaria gambir Roxb*) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Fibrosis Hepar Terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan *Gamma Glutamyl Transferase* (GGT)

ABSTRAK

Prevalensi kasus penyakit hepar pada hewan kecil mencapai kurang lebih 10% termasuk fibrosis hepar yang merupakan salah satu penyakit yang diakibatkan kerusakan hepar kronik. Fibrosis hepar ditandai dengan akumulasi berlebihan protein *Extracellular Matrix* (ECM) termasuk kolagen. Penelitian ini menggunakan ekstrak buah gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) sebagai terapi preventif pada hewan coba tikus model fibrosis hepar. Hewan coba tikus model fibrosis hepar penelitian ini dibuat dengan induksi CCl₄. Ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) digunakan untuk mengetahui efek preventif pada hewan model tikus fibrosis hepar. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh preventif pemberian ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) terhadap enzim malondialdehid (MDA) dan *gamma glutamyl transferase* (GGT) pada hewan coba tikus model fibrosis hepar. Dosis CCl₄ yang digunakan untuk hewan coba tikus model fibrosis hepar yaitu 2 mL/kg BB dengan pemberian injeksi intraperitoneal. Tikus (*Rattus norvegicus*) yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif (CCl₄), kelompok preventif dosis 130 mg/kg BB, 260 mg/kg BB, dan 390 mg/kg BB. Aktifitas GGT diukur menggunakan spektrofotometri dan pengukuran MDA dilakukan menggunakan uji TBA. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak gambir secara signifikan dapat mencegah peningkatan kadar MDA dan GGT pada tiap kelompok perlakuan yang diinduksi CCl₄ dan dosis terbaik yang efektif untuk mencegah kenaikan kadar MDA dan GGT adalah dosis 390 mg/kg.

Kata kunci: Gambir, fibrosis hepar, CCl₄, MDA, dan GGT.

Preventive Effects of Gambir Extract (*Uncaria gambir Roxb.*) in Liver Fibrosis Rats (*Rattus norvegicus*) Model on Malondialdehyde (MDA) and Gamma Glutamyl Transferase (GGT)

ABSTRACT

The prevalence of hepatic disease cases in small animals rising about approximately 10%, including liver fibrosis which is one of the diseases caused by chronic hepatic damage that characterized by an excessive accumulation of Extracellular Matrix (ECM) proteins including collagen. Symptoms of liver fibrosis appear with increased severity of fibrosis. In this study extract of gambir fruit (*Uncaria gambir Roxb.*) as a preventive in animal trial rats liver fibrosis model. The experimental rats model of liver fibrosis model was made with CCl₄ induction. Gambier extract (*Uncaria gambir Roxb.*) can be used as a preventive effect in animals model of liver fibrosis. This study aims to determine the effect of preventive gambier extract (*Uncaria gambir Roxb.*) on malondialdehyde (MDA) and gamma glutamyl transferase (GGT) enzyme in rats of liver fibrosis model. The CCl₄ dosage used for animal models of liver fibrosis model is 2 mL/kg by administration intraperitoneal injection. Rats (*Rattus norvegicus*) were divided into five groups: the negative control group, positive control group, preventive group doses of 130 mg/ kg, 260mg/ kg, 390 mg/ kg. GGT activity was measured using spectrophotometry and MDA measurements were performed using the TBA test. The result of this study indicate gambir extract significantly prevents elevated levels of MDA and GGT in each treatment group induced CCl₄ and the best effective dose to prevent elevated is 390 mg/ kg.

Keywords: Gambir, Liver fibrosis, CCl₄, MDA, dan GGT.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan segala nikmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini yang berjudul **“Pengaruh Preventif Ekstrak Gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Fibrosis Hepar terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan *Gamma Glutamil Transferase (GGT)*”**. Sholawat dan salam semoga tetap tercurah kepada Nabi Muhammad SAW.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini, yaitu:

1. Dr. Agung Pramana Warih M, M.Si selaku pembimbing I dan drh. Analis Wisnu Wardhana, M.Biomed selaku pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, nasehat dan arahan kepada penulis.
2. Dhita Evi Aryani, S.Farm, Apt dan drh. Albiruni Haryo, M.Sc selaku dosen penguji atas tanggapan dan saran yang diberikan.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh. DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya (FKH UB).
4. Secara khusus penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Ayah yaitu bapak GH. Lukman dan Ibu Mega Rosida tercinta yang telah banyak memberikan dukungan, doa dan pengorbanan baik secara moril maupun materil, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
5. Secara khusus juga penulis mengucapkan terima kasih kepada kakak yaitu M. Khairul Amin dan adik Aulia Ramadani yang selalu memberikan

semangat dan dukungan yang luar biasa kepada penulis dalam menyelesaikan tugas akhir ini.

6. Serta penulis juga menyampaikan terima kasih kepada teman-teman seperjuangan dalam penelitian ini, yaitu Veppy Yulanda , Sari Mentari, dan Ahmad Basori atas semangat dan kerja sama yang diberikan.
7. Terima kasih kepada sahabat tercinta yaitu Astri Ocvitasari, Dwiyana Marta Afrida, dan Arnes Mardasella yang telah memberikan dukungan kepada penulis.
8. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada dr. Silananda Cahya yang telah memberikan banyak saran, dukungan dan motivasi kepada penulis.
9. Seluruh staf dan karyawan FKH UB, yang telah membantu proses administrasi dalam membuat tugas akhir.
10. Keluarga besar DEXA (2013-D) dan angkatan 2013 FKH UB yang telah memberikan semangat dan dukungan kepada penulis.

Penulis berharap tugas akhir ini dapat diterima, sehingga dapat memberikan pengalaman, serta wawasan baru terhadap penulis. Penulis menyadari bahwa tugas akhir ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis memohon maaf atas kekurangan tersebut.

Malang, Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Hepar	6
2.2 Fibrosis Hepar	7
2.2.1 Patofisiologi	8
2.3 Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	9
2.4 Fibrosis Hepar Induksi Karbon Tetraklorida (CCl ₄)	11
2.5 Gambir (<i>Uncaria gambir Roxb.</i>)	13
2.6 <i>Gamma Glutamyl Transferase</i> (GGT)	15
2.7 Malondialdehid (MDA)	16
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	18
3.1 Kerangka Konseptual	18
3.2 Hipotesis Penelitian	22



BAB IV METODE PENELITIAN	23
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	23
4.2 Alat Dan Bahan Penelitian	23
4.2.1 Alat Penelitian	23
4.2.2 Bahan Penelitian	24
4.3 Tahapan Penelitian	24
4.3.1 Rancangan Penelitian.....	24
4.3.2 Sampel Penelitian	24
4.3.3 Variabel Penelitian.....	26
4.4 Prosedur Kerja	26
4.4.1 Persiapan Hewan Coba.....	26
4.4.2 Pembuatan Ekstrak Gambir	27
4.4.3 Pemberian Ekstrak Gambir sebagai Preventif	27
4.4.4 Pemberian CCl ₄ untuk Pembuatan Hewan Coba Fibrosis Hepar	28
4.4.5 Pengukuran Enzim Malondialdehid (MDA)	28
4.4.6 Pengambilan Jaringan pada Organ Hepar.....	29
4.4.7 Pengukuran Kadar <i>Gamma Glutamyl Transferase</i> (GGT).....	30
4.5 Analisis Data	30
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	31
5.1 Pengaruh Preventif Ekstrak Gambir (<i>Uncaria gambir Roxb.</i>) Terhadap Kadar Malondialdehid (MDA).....	31
5.2 Pengaruh Preventif Ekstrak Gambir (<i>Uncaria gambir Roxb.</i>) Terhadap Kadar Enzim <i>Gamma Glutamyl Transferase</i> (GGT)	37
BAB VI PENUTUP	42
6.1 Kesimpulan	42
6.2 Saran.....	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	48



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Gambaran Normal Hepar Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>).....	7
2.2 Gambaran Histopatologi Fibrosis Hepar Tikus dengan Pewarnaan HE (Perbesaran 100x)	9
2.3 Proses konversi CCl ₄ menjadi CCl ₃	12
2.4 Gambir (<i>Uncaria gambir Roxb.</i>).....	14
3.1 Kerangka Konseptual	18
5.1 Penurunan Kadar MDA Pengaruh Pemberian Ekstrak Gambir	32
5.2 Mekanisme CCl ₄	36
5.3 Penurunan Aktivitas GGT Pengaruh Pemberian Ekstrak Gambir..	38



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Kelompok Penelitian	25
5.1 Hasil Uji <i>Tukey</i> Kadar MDA Terhadap Kelompok Perlakuan.....	31
5.2 Hasil Uji <i>Tukey</i> Kadar GGT Terhadap Kelompok Perlakuan.....	37



DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

Simbol/ Singkatan	Keterangan
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
CCl ₃	: Triklorometil
CCl ₃ O ₂	: Triklorometil Peroksil
CCl ₄	: <i>Carbon Tetrachlorida</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
GGT	: <i>Gamma Glutamyl Transferase</i>
HE	: <i>Hematoxylin-Eosin</i>
IP	: Intraperitoneal
MDA	: Malondialdehid
MES	: Matriks Ekstraseluler
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
NBF	: <i>Netral Buffer Formalin</i>
PUFAs	: Asam lemak rantai panjang tak jenuh
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
TAA	: <i>Thioacetamide</i>
HSC	: <i>Hepatic Stellate Cells</i>



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Surat Keterangan Laik Etik.....	48
2. Surat Keterangan Ekstrak Tanaman Gambir.....	49
3. Uji Fitokimia Katekin dari Ekstrak Gambir.....	50
4. Kerangka Operasional.....	51
5. Pembuatan Ekstrak Gambir.....	52
6. Diagram Tahapan Penelitian.....	53
7. Perhitungan Dosis Gambir.....	54
8. Perhitungan Dosis Induksi CCl ₄	56
9. Pengukuran Kadar Malondialdehid (MDA).....	59
10. Pengukuran Kadar <i>Gamma Glutamyl Transferase</i> (GGT).....	60
11. Hasil Uji Kadar MDA Menggunakan Spektrofotometri.....	61
12. Hasil Perhitungan Statistik Kadar MDA.....	63
13. Hasil Perhitungan Statistik Aktivitas GGT.....	66

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hepar merupakan organ metabolisme terpenting dalam proses sintesis, penyimpanan dan metabolisme. Hepar memiliki fungsi utama yaitu untuk memproduksi dan mensekresikan empedu ke dalam saluran pencernaan, metabolisme lemak, karbohidrat, dan protein (Widjaja, 2008). Salah satu fungsi hepar adalah detoksifikasi (menawarkan racun tubuh), sehingga hepar sangat mudah menjadi sasaran utama toksikasi (Diaz, 2006). Hal ini menyebabkan hepar rentan mengalami kerusakan karena berbagai zat toksik yang masuk ke tubuh akan dimetabolisme oleh hepar.

Salah satu contoh penyakit kronis yang terjadi karena kerusakan hepar adalah fibrosis hepar. Prevalensi kasus penyakit hepar pada hewan kecil mencapai kurang lebih 10% termasuk fibrosis hepar dari total penyakit sistemik pada hewan kecil (Williams, 2005). Fibrosis hepar merupakan hasil dari respon penyembuhan luka terhadap lesi berulang. Jika hepar terpapar jejas terus menerus, akhirnya proses regenerasi gagal terjadi, selanjutnya sel hepar akan digantikan oleh protein matriks ekstraseluler, termasuk kolagen fibriliar (Andhika, 2009).

Hepatoprotektor merupakan suatu senyawa yang dapat melindungi sel hepar dari kerusakan dan banyak digunakan karena memiliki peran sebagai antioksidan. Gambir adalah tanaman yang memiliki potensi sebagai hepatoprotektor untuk menurunkan reaksi oksidasi lipid. Ekstrak gambir

mengandung antioksidan dari katekin yang merupakan golongan flavonoid dan termasuk ke dalam senyawa fenolik serta bersifat sebagai antioksidan (Fahrudin, 2015). Hal ini menjadikan gambir diharapkan dapat mencegah proses peroksidasi lipid sehingga tidak terjadi kerusakan membran dan struktur sel hepar.

Penelitian fibrosis hepar pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) sering dilakukan dengan induksi menggunakan CCl_4 , hasil metabolisme dari CCl_4 adalah senyawa yang berupa radikal bebas yang bersifat reaktif, sehingga menimbulkan kerusakan pada membran sel hepar (Venukumar dan Latha, 2002). Zat yang dapat menyebabkan kerusakan pada hati yang disebabkan oleh radikal bebas. CCl_4 memerlukan aktivasi metabolisme terutama oleh enzim sitokrom P450 di hepar yang akan mengubah CCl_4 menjadi metabolit yang lebih toksik, sehingga dapat menyebabkan berbagai jenis kerusakan hepar, termasuk fibrosis hepar (Rohmatin, 2015). Parameter untuk mengetahui fungsi hati dapat dengan mengukur kadar bilirubin dan albumin karena kerusakan hati yang berat dapat mengganggu sekresi bilirubin dan albumin. Parameter kerusakan hati atau cedera hati dapat diukur dengan analisis enzim hati dalam darah yaitu alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), dan alkaline phosphatase (ALP). Indikasi lain ketika kerusakan hati adalah terjadi reaksi peroksidasi lipid yang menyebabkan kadar malondialdehid (MDA) meningkat, kadar glutathion (GSH) menurun, serta degradasi terhadap struktur sel hati (Fahrudin, 2015). Pada keadaan stress oksidatif yang tinggi, kadar MDA hepar meningkat secara signifikan. Bila keadaan stress oksidatif teratasi, kadar MDA akan kembali normal. Pemeriksaan enzim *Gamma Glutamyl Transferase* (GGT) dalam klinis dilakukan

untuk diagnosa hepatitis kronik, deteksi kelainan hepar dini, deteksi kelainan hepar karena alkohol dan deteksi kelainan hepar infiltratif. Hal ini menunjukkan bahwa pemeriksaan enzim GGT tidak spesifik untuk membedakan jenis-jenis penyakit hepatic, namun pemeriksaan GGT mempunyai kelebihan berupa sensitivitas yang lebih baik daripada enzim penanda hepar lainnya (Whitfield, 2001).

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui efek preventif ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) pada hewan model fibrosis hepar untuk mengetahui peningkatan kadar MDA dan GGT.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh preventif ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) terhadap kadar Malondialdehid (MDA) pada tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis hepar?
2. Bagaimana pengaruh preventif ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) terhadap kadar *Gamma Glutamyl Transferase* (GGT) pada tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis hepar?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar umur 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya (Achmad, 2012).
2. Pembuatan fibrosis hepar pada tikus dilakukan dengan induksi CCl₄ secara intraperitoneal. Dosis yang digunakan adalah 2 mL/kg BB 3 kali seminggu selama 4 minggu menggunakan spuit 1 cc dengan konsentrasi bertingkat setiap minggunya (Achmad, 2012).
3. Ekstraksi gambir (*Uncaria gambir Roxb*) dilakukan di Materia Medica Batu dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1: 4 (Fahrudin, 2015).
4. Dosis ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*) yang digunakan yaitu 130 mg/kg BB (dosis 1), 260 mg/kg BB (dosis 2), dan 390 mg/kg BB (dosis 3) diberikan secara peroral. Penentuan dosis ekstrak gambir berdasarkan modifikasi pada penelitian (Fahrudin, 2015).
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah nilai dari enzim *Gamma Glutamyl Transferase* (GGT) dan Malondialdehid (MDA) menggunakan spektrofotometer.

1.4 Tujuan

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, adapun tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. Mengetahui pengaruh preventif ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) terhadap kadar Malondialdehid (MDA) pada tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis hepar.
2. Mengetahui pengaruh preventif ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) terhadap kadar *Gamma Glutamyl Transferase* (GGT) pada tikus (*Rattus norvegicus*) fibrosis hepar.

1.5 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah diharapkan dapat menjadi sumber informasi dalam kajian ilmiah tentang manfaat dari gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) sebagai preventif fibrosis hepar terhadap pencegahan meningkatnya kadar MDA dan GGT.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

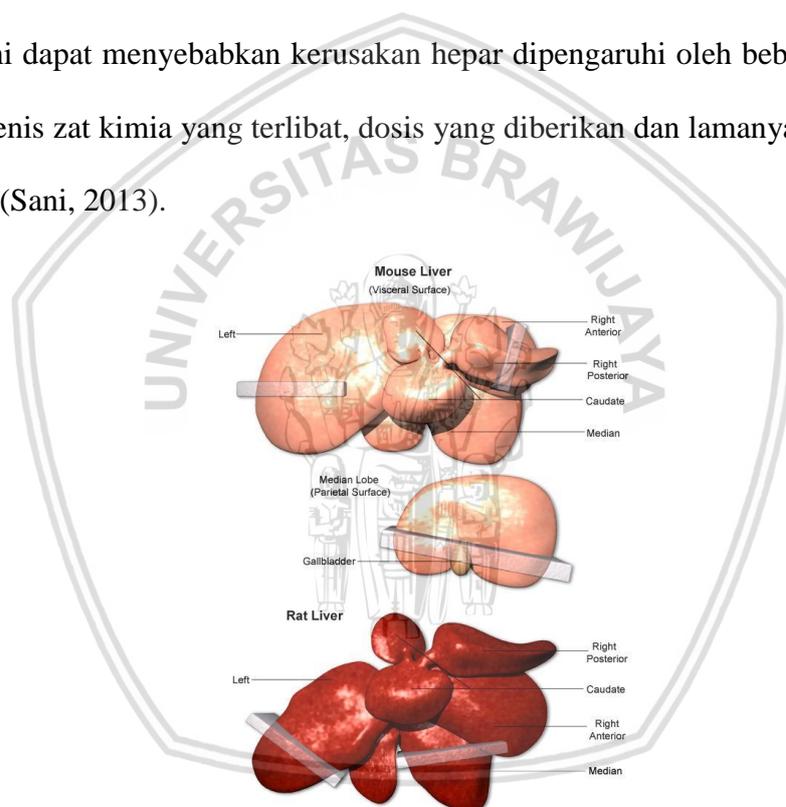
2.1 Hepar

Hepar merupakan suatu organ yang memiliki berbagai macam aktivitas metabolisme (Bredo, 2011). Dalam sistem pencernaan, hepar berperan sebagai kelenjar yang mensekresikan getah empedu yang berperan dalam digesti dan absorpsi lemak. Hepar juga berperan dalam metabolisme nutrien (karbohidrat, protein, dan lipid) setelah diabsorpsi oleh saluran pencernaan. Selain itu, hepar juga berfungsi dalam proses detoksifikasi atau degradasi produk buangan tubuh, hormon, obat-obatan, dan berbagai xenobiotik yang masuk ke tubuh (Sherwood, 2004).

Hepar tikus terbagi menjadi empat lobus yaitu lobus kiri, lobus median, lobus kanan, dan lobus caudatus (Boorman, 2006). Dalam hepar terdapat tiga jenis jaringan yang penting yaitu sel parenkim hati, susunan pembuluh darah dan susunan saluran empedu (Darmawan, 2003). Secara mikroskopis, setiap lobus hati terbagi menjadi struktur-struktur yang disebut sebagai lobulus, yang merupakan unit mikroskopis dan fungsional organ. Diantara sel hati terdapat kapiler-kapiler yang disebut sinusoid. Sinusoid dibatasi oleh sel fagositik atau sel *kupffer* yang berfungsi menelan bakteri dan benda asing dalam darah (Price dan Lorraine, 2006).

Hepar menerima pasokan darah rangkap, sekitar 20% dari aliran darah merupakan darah kaya oksigen dari arteri hepatica dan 80% merupakan darah kaya nutrien dari vena porta yang berasal dari lambung, usus, pankreas dan limpa

(Harrison, 2013). Melalui vena porta, darah yang berasal dari saluran pencernaan dan rongga abdomen lain yaitu limpa, pankreas, dan kantung empedu masuk ke hepar sehingga sebagian besar zat toksik yang memasuki tubuh melalui sistem gastrointestinal dibawa ke vena porta ke hepar sehingga bahan-bahan toksik dari saluran pencernaan seperti yang berasal dari tumbuhan, fungi dan produk bakteri akan diabsorpsi kedalam pembuluh darah portal dan ditransfer ke hepar. Bahan toksik ini dapat menyebabkan kerusakan hepar dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti jenis zat kimia yang terlibat, dosis yang diberikan dan lamanya paparan zat tersebut (Sani, 2013).



Gambar 2.1 Gambar Normal Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) (Bredo, 2011)

2.2 Fibrosis Hepar

Fibrosis hepar merupakan akumulasi berlebihan protein matriks ekstraseluler termasuk kolagen yang terjadi pada sebagian besar jenis penyakit hepar kronis (Bataller dan Brenner, 2005). Pada fibrosis hepar terbentuknya jaringan ikat yang terjadi sebagai respon terhadap cedera hati, diawali oleh cedera

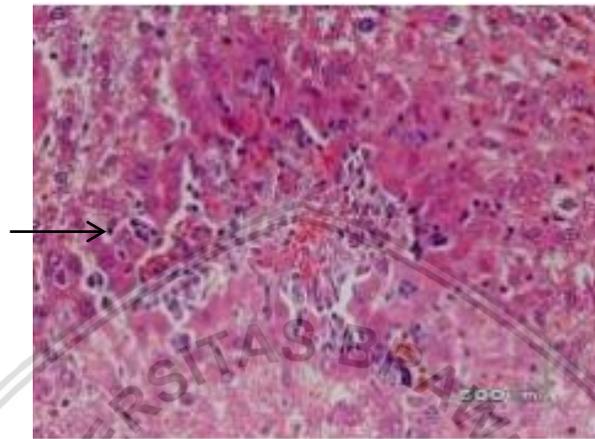
hati kronis ditandai oleh aktivasi Hepatic Stellate Cells (HSC) dan produksi berlebih komponen Matriks Ekstraseluler (MES). Penumpukan protein matriks ekstraseluler yang berlebihan akan menyebabkan gangguan struktur hati, terbentuk jaringan ikat yang diikuti regenerasi sel hepatosit. Bila fibrosis berjalan secara progresif, dapat menyebabkan sirosis hati (Amirudin, 2007). Fibrosis hepar disebabkan terjadi karena adanya infeksi virus, bakteri, protozoa, ataupun jamur. Beberapa agen toksik dan penggunaan obat-obatan terapikal tertentu juga dikenal dapat menimbulkan fibrosis hepar yang parah (Ijzer, 2008).

2.2.1 Patofisiologi

Fibrosis hepar terjadi akibat dari respon penyembuhan luka pada hepar terhadap cedera berulang. Setelah cedera hepar akut (seperti hepatitis virus), sel parenkim beregenerasi dan menggantikan sel yang nekrosis atau apoptosis. Proses ini berkaitan dengan respon inflamasi dan deposisi terbatas pada matriks ekstraseluler (MES) jika cedera hepar menetap, regenerasi hepar gagal dan hepatosit distribusi MES, termasuk kolagen (Walace dkk., 2008). Distribusi materi fibrous ini tergantung pada penyebab cedera hepar, pada hepatitis virus kronis jaringan fibrous awalnya berlokasi disekitar traktus portal. Fibrosis hepar juga dapat berkembang cepat menjadi sirosis pada beberapa keadaan klinis, misalnya karena reinfeksi hepatitis virus (Ramon dkk., 2005).

Fibrosis hepar dimulai dengan aktivasi HSC yang meliputi 3 fase yaitu fase inisiasi, fase pengekatan dan fase resolusi, sampai terjadinya akumulasi jaringan ikat patologis. Prosesnya meliputi interaksi antara HSC dengan sel-sel pertahanan tubuh seperti leukosit dan sel Kupffer, pelepasan berbagai mediator

inflamasi, sitokin dan growth factors terutama TGF- β 1, berbagai oksidan dan peroksida lipid, perubahan komposisi matriks ekstraselular dan degradasinya, dan diakhiri inaktivasi HSC serta apoptosis (Amiruddin, 2007).



Gambar 2.2 Gambaran Histopatologi Fibrosis Hepar Tikus dengan Pewarnaan HE (perbesaran 100x) (Achmad, 2012)

Pada **Gambar 2.2**, terlihat terjadi nekrosis, pada hal ini ditunjukkan dengan warna inti sel yang hitam. Daya toksisitas seperti pada zat toksik CCl₄ pada hepar dapat menyebabkan nekrosis sel yang kerusakannya terlihat jelas pada lobulus zona sentral. Gambar histopatologi tersebut termasuk pada tahap awal fibrosis hepar (Achmad, 2012).

2.3 Tikus (*Rattus norvegicus*)

Tikus merupakan hewan yang mempunyai peranan penting dalam kehidupan manusia, baik bersifat menguntungkan maupun merugikan. Sifat menguntungkan terutama dalam hal penggunaannya sebagai hewan percobaan di laboratorium. Sifat merugikan yaitu dalam hal posisinya sebagai hama pada komoditas pertanian, hewan pengganggu, serta penyebar dan penular (vector) dari beberapa penyakit manusia (Priyambodo, 2007). Tikus telah diketahui sifat-

sifatnya dengan sempurna, mudah dipelihara, merupakan hewan yang relatif sehat dan cocok untuk berbagai macam penelitian (Pramono, 2005).

Tikus (*Rattus norvegicus*) digunakan sebagai hewan model karena memiliki kemiripan fungsi dan bentuk organ serta proses biokimia dan biofisik dengan mamalia sehingga penelitian yang dilakukan dapat diaplikasikan pada anjing dan kucing (Hedrich, 2006). Selain itu tikus putih juga memiliki homogenitas metabolik yang mirip manusia. Tikus putih memiliki organ dan fisiologi sistemik yang sama, serta memiliki gen yang mirip dengan manusia. Tikus putih juga memiliki kemiripan yang baik bagi patogenitas suatu penyakit. Kemiripan inilah yang menjadi salah satu alasan mengapa tikus putih digunakan dalam meneliti patogenitas penyakit maupun proses penuaan pada manusia (Olayaki, 2008).

Tikus wistar (*Rattus norvegicus*) memiliki panjang ekor yang lebih pendek daripada panjang badan, sedangkan tikus Sprague Dawley memiliki panjang ekor yang sama atau lebih dari panjang badan. Panjang badan tikus diukur dari ujung hidung sampai anus, sedangkan panjang ekor diukur dari pertengahan anus sampai ujung ekor. (Krinke, 2000). Tikus wistar memiliki panjang mencapai 40 cm yang diukur dari hidung sampai ujung ekor dengan berat 140-500 gram. Tikus betina biasanya memiliki ukuran tubuh yang lebih kecil dibandingkan tikus jantan, dan memiliki kematangan seksual pada umur 4 bulan dan dapat hidup selama 4 tahun. (Purwaningtyas, 2016).

Menurut Sirois (2005), klasifikasi dari tikus *Rattus norvegicus* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Mamalia
Ordo : Rodentia
Sub Ordo : Myomorpha
Famili : Muridae
Sub Famili : Murinae
Genus : Rattus
Spesies : *Rattus norvegicus*

Pada penelitian ini digunakan tikus jantan (*Rattus norvegicus* L.) dengan bobot badan 150-200 gram dengan umur sekitar 8-12 minggu. Tikus putih jantan digunakan karena tikus putih jantan dapat memberikan hasil penelitian yang lebih stabil dikarenakan tikus jantan tidak dipengaruhi oleh adanya siklus menstruasi seperti pada tikus putih betina (Ngatidjan, 2006).

2.4 Fibrosis Hepar Induksi Karbon Tetraklorida (CCl₄)

Karbon tetraklorida (CCl₄) merupakan senyawa yang bersifat stabil dan merupakan polutan lingkungan yang persisten. Karbon tetraklorida (CCl₄) merupakan senyawa yang berupa cairan bening dan tidak berwarna yang memiliki aroma menyerupai eter. Karbon tetraklorida (CCl₄) banyak digunakan sebagai bahan model eksperimental toksisitas hepar. (Boyer dkk., 2012).

Rute intraperitoneal merupakan rute parenteral yang paling banyak digunakan pada tikus, permukaan cavitas abdomen yang luas dan banyaknya pembuluh darah di daerah cavitas abdomen menyebabkan absorpsi yang cepat.

Kecepatan absorpsi pada intraperitoneal umumnya mencapai $\frac{1}{2}$ hingga $\frac{1}{4}$ kali lebih cepat dari kecepatan absorpsi pada rute intravena. Untuk pengaruh jangka panjangnya pengulangan injeksi intraperitoneal dapat menyebabkan reaksi pada jaringan dan dapat menyebabkan adhesi. Volume yang dapat diinjeksikan melalui rute intraperitoneal umumnya cukup besar (Krinke, 2000).

Karbon tetraklorida sebagai toksikan hepar menyebabkan degradasi lipid melalui reaksi lipid peroksidasi pada membran sel. Reaksi lipid peroksidasi tersebut merupakan salah satu prinsip terpenting penyebab hepatotoksisitas. Efek toksikasi CCl_4 tergantung pada dosis dan durasi pemberiannya terhadap hepar sehingga memunculkan manifestasi histologis seperti hepatik steatosis, fibrosis, nekrosis hepatosit atau bersifat karsinogenik. Pemberian CCl_4 dengan dosis tinggi dapat menyebabkan kerusakan retikulum endoplasma, mengakumulasi lipid, mengurangi sintesis protein, mengacaukan proses oksidasi, menurunkan bobot badan, menyebabkan pembengkakan hepar, dan pemberian CCl_4 dalam jangka panjang dapat menyebabkan nekrosis sentrilobular serta degenerasi lemak di hepar (Chang dkk., 2013).

Dampak racun tetraklorida (CCl_4) tidak oleh molekul CCl_4 tetapi oleh bentuk konversinya, yaitu radikal bebas karbon tetraklorida (CCl_3). Proses konversi CCl_4 menjadi CCl_3 dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 2.3 Proses konversi CCl_4 menjadi CCl_3 (Kumar dkk., 2005)

Setelah masuk ke dalam hati karbon tetraklorida (CCl_4) diaktivasi oleh enzim sitokrom P_{450} , (enzim fase I metabolisme xenobiotik hati) menjadi radikal

triklorometil (CCl_3) dan selanjutnya CCl_3 yang terbentuk dapat bereaksi dengan oksigen membentuk triklorometil peroksida (CCl_3O_2) yang merupakan pencetus utama peroksidasi lemak (Murray dkk., 2003).

Radikal bebas yang dihasilkan akan menyebabkan autooksidasi asam lemak polienoik yang terdapat dalam fosfolipid. Kemudian terjadi dekomposisi oksidatif lemak, dan terbentuk peroksida-peroksida organik setelah bereaksi dengan oksigen (peroksidasi lemak). Peroksidasi lemak ini akan memicu terjadinya peroksidasi lemak lebih lanjut (Murray, 2000).

Peroksidasi lemak menyebabkan kerusakan membran plasma yang dapat mengakibatkan influx massif ion kalsium. Peningkatan ion kalsium merupakan salah satu efek sitotoksik dari karbon tetraklorida yang akan mengaktifkan sejumlah enzim seperti *ATPase* (mengurangi ATP), *phospholipase* (merusak membran), *protease* (merusak membran dan protein sitoskeleton), dan *endonuclease* (memfragmentasi DNA dan kromatin). Selain itu, peningkatan ion kalsium intraseluler juga menyebabkan peningkatan permeabilitas mitokondria dan menginduksi terjadinya apoptosis dan kematian sel (Kumar dkk., 2005).

2.5 Gambir (*Uncaria gambir Roxb.*)

Menurut Haryanto (2009), berdasarkan ilmu taksonomi, adapun klasifikasi tumbuhan gambir adalah:

Kingdom : Plantae
 Divisi : Magnoliophyta
 Kelas : Magnoliopsida
 Ordo : Rubiales

Familia : Rubiaceae
Genus : Uncaria
Spesies : *Uncaria gambir* Roxb



Gambar 2.4 Gambir (Badan POM RI, 2007)

Gambir adalah ekstrak kering dari ranting dan daun tanaman *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. Gambir termasuk family Rubiaceae dan komoditas perkebunan rakyat. Ekstrak gambir mengandung katekin sebagai komponen utama serta beberapa komponen lain seperti asam kateku tanat, kuersetin, kateku merah, gambir flouresin, lemak dan lilin. Gambir tumbuh pada area terbuka di dalam hutan, kawasan hutan yang lembab, area terbuka bekas perladangan atau pinggir hutan (BPOM RI, 2007). Berdasarkan penelitian beberapa produk gambir yang diolah masyarakat dari berbagai daerah sentra produksi gambir di Indonesia, diperoleh kandungan katekin bervariasi dari 35% sampai dengan 95%. Gambir Sumatera Barat memiliki kandungan katekin terbanyak 40% sampai 80% (Amos, 2010).

Kandungan utama gambir adalah flavonoid, katekin (sampai 51%), zat penyamak (22%-50%), dan sejumlah alkaloid. Gambir mengandung bermacam-macam senyawa kimia lain yaitu: Asam katekutannat 20%-55%, pyrocatechol 20-

30%, gambir fluoresensi 1%-3%, kateku merah 3%-5%, quersetin 2%-4%, fixed oil 1%-2% dan lilin 1%-2%. Kandungan katekin merupakan salah satu parameter mutu gambir dan menjadi penentu utama dari kualitas gambir (Friadi, 2016).

Gambir mengandung flavonoid yaitu katekin dan kuersetin yang dapat meringankan penyakit hepatitis. Gambir berpotensi sebagai hepatoprotektor dengan menurunkan reaksi oksidasi lipid (Fahrudin, 2015). Aktivitas antioksidan dari katekin dapat menurunkan kadar malodialdehid (MDA). Pemberian ekstrak gambir dapat memproteksi kerusakan hepar dari radikal bebas triklorometil dengan bekerja sebagai antioksidan (BPOM RI, 2010).

Katekin merupakan kandungan utama dalam gambir yang bersifat antioksidan, sehingga dapat menetralkan radikal bebas. Pemusnahan radikal bebas dalam tubuh berhubungan dengan aktivitas flavonoid yang memiliki gugus OH. Atom H yang berasal dari gugus OH dapat mendonorkan elektron dan mengikat ion logam dari molekul radikal bebas, sehingga radikal bebas menjadi netral atau tidak reaktif (Fahrudin, 2015).

2.6 *Gamma-Glutamyl Transferase (GGT)*

Enzim *Gamma-glutamyl transferase* (GGT) merupakan enzim yang terikat membran plasma yang situs katalitiknya menghadap lingkungan ekstraseluler. Peningkatan enzim ini di dalam darah lebih disebabkan oleh adanya proses di dalam hepar. Aktivitas tertinggi dijumpai pada penyakit hepar yang disertai pembendungan saluran empedu dan kelainan akibat hepatotoksis sehingga sintesis enzim pada membran sel meningkat. Enzim GGT muncul paling awal dan

bertahan lebih lama dibandingkan dengan enzim penanda hepar lainnya (Sulaiman dkk., 2012).

Stress oksidatif dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma melalui peroksidasi lipid. Kerusakan pada membran plasma, membran organel dan kematian sel, dapat menyebabkan terlepasnya GGT yang terikat pada membran ke dalam sirkulasi sistemik. Hal ini menyebabkan kadar enzim GGT meningkat dalam serum. GGT yang terlepas dari membran sel menjadi tidak fungsional dan stress oksidatif menjadi sulit diminimalisir (Haurissa, 2014).

2.7 Malodialdehid (MDA)

Malondialdehid (MDA) merupakan senyawa dialdehida dengan rumus molekul $C_3H_4O_2$ yang dapat dihasilkan dari oksidasi asam lemak tidak jenuh oleh radikal bebas. Konsentrasi MDA yang tinggi menunjukkan adanya proses oksidasi dalam membran sel (Winarsi, 2007). MDA merupakan suatu produk akhir peroksidasi lipid, yang biasanya digunakan sebagai biomarker biologis peroksidasi lipid dan menggambarkan derajat stress oksidatif (Hendromartono, 2000).

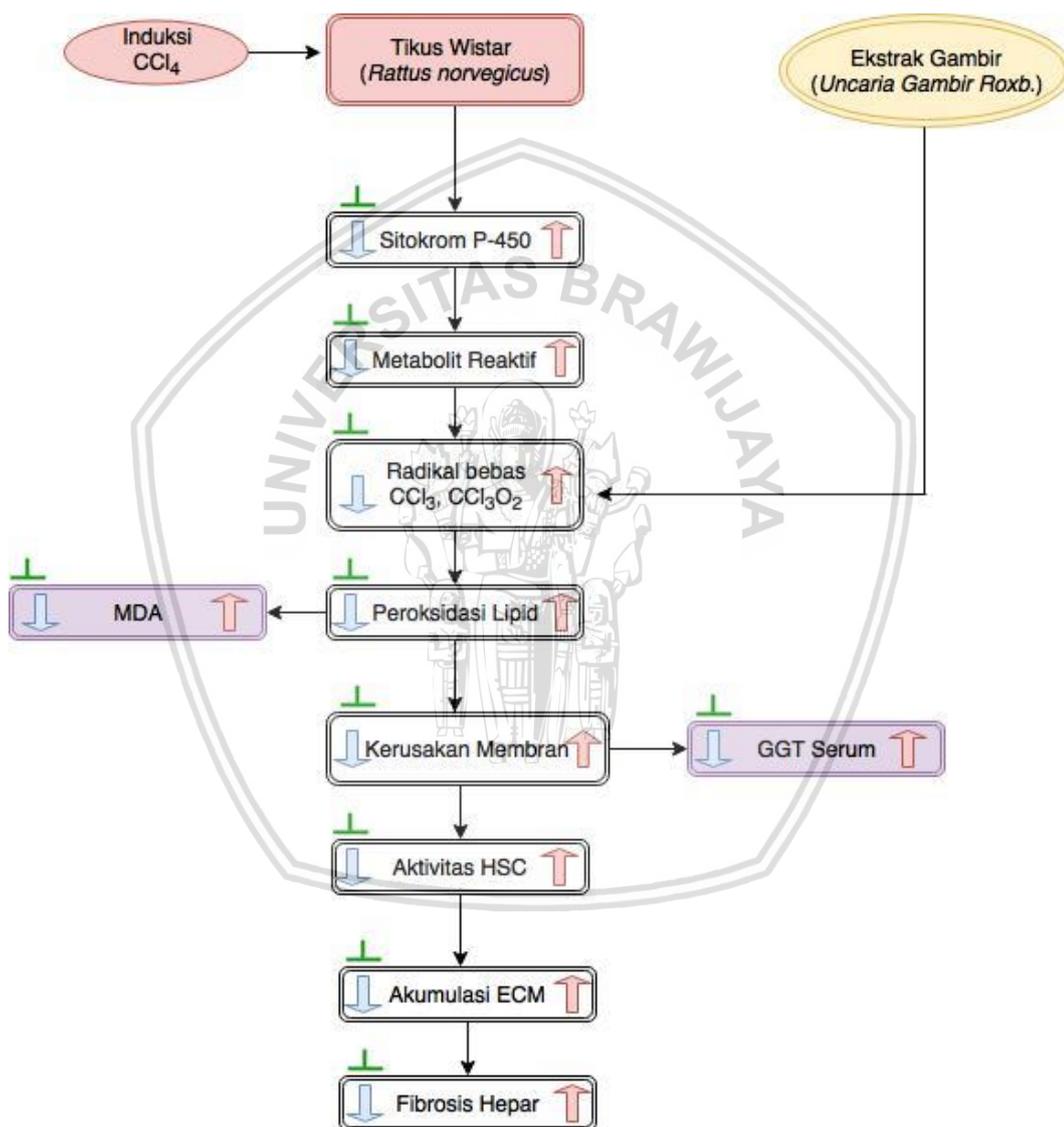
Oksidasi lipid merupakan hasil kerja radikal bebas yang diketahui paling awal dan paling mudah pengukurannya karena itu, reaksi ini paling sering dilakukan untuk mempelajari stress oksidatif. Peroksidasi lipid merupakan inisiasi reaksi berantai oleh radikal hidrogen atau O_2^- , jembatan metilen yang dimiliki PUFA merupakan sitokrom utama dari radikal bebas. Pembentukan radikal bebas dari peroksidasi lipid merupakan petunjuk penting dari kerusakan sel yang diakibatkan oleh ROS. Reaksi jenis ini disebut autooksidasi radikal bebas yang

memerlukan inisiator seperti radikal hidroksil untuk memulai reaksi tersebut. Peroksidasi biasanya terjadi dengan adanya penarikan atom hidrogen yang berisi 1 elektron dari ikatan ganda pada asam lemak, terjadinya degradasi lipid menyebabkan terbentuknya MDA. Malondialdehid terdapat dalam darah dan urin sebagai indikator kerusakan radikal. Peroksida dari molekul lipid berubah-ubah atau merusak struktur molekul lipid, pada saat lipid yang rusak merupakan konstituent dari membran biologis, maka susunan 2 lapis dari lipid dan strukturnya juga mengalami kerusakan. Peroksidasi lipid yang bersifat sangat reaktif menyebabkan kerusakan sel endotel melalui interaksi langsung dengan membran sel endotel maupun secara tidak langsung melalui aktivasi mediator lain oleh produk peroksidasi lipid (Eberhardt, 2001).

Mekanisme kerusakan sel atau jaringan akibat serangan radikal bebas yang paling awal diketahui dan terbanyak diteliti adalah peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid paling banyak terjadi di membran sel, terutama asam lemak tidak jenuh yang merupakan komponen penting penyusun membran sel. Pengukuran tingkat peroksidasi lipid diukur dengan mengukur produk akhirnya, yaitu malondialdehid (MDA), yang merupakan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh dan yang bersifat toksik terhadap sel. Pengukuran kadar MDA merupakan pengukuran aktivitas radikal bebas secara tidak langsung sebagai indikator stress oksidatif. Pengukuran ini dilakukan tes *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS *test*).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

Keterangan:

-  Variabel bebas
-  Variabel terkendali
-  Variabel tergantung
-  Penghambatan oleh ekstrak gambir
-  Efek induksi CCl₄
-  Efek pemberian ekstrak gambir
-  Penurunan

Hewan coba pada penelitian ini yaitu tikus wistar pada awalnya akan diinduksi ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) secara per oral dengan cara di sonde selama waktu 1 minggu. Ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) yang diberikan pada minggu pertama bertujuan untuk memberikan cadangan antioksidan dan memenuhi kebutuhan antioksidan tubuh sehingga persediaan antioksidan tubuh cukup untuk beredar secara sistemik maupun intraselular dan radikal bebas yang masuk dalam tubuh tidak dapat merusak sel karena langsung bereaksi dengan antioksidan. Antioksidan dalam tubuh diharapkan dapat mencegah kenaikan kadar MDA dan GGT. Selanjutnya pada 4 minggu berikutnya CCl₄ akan diinduksi pada tikus secara intraperitoneal selama 3 kali seminggu dan juga ekstrak gambir yang diberikan setiap hari.

Mekanisme antioksidan pada ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) dalam menetralkan reaksi radikal bebas, meliputi donor elektron dari atom hidrogen, pengikatan ion logam, dan inaktivasi *singlet oxygen*. Atom H pada

gugus OH yang terdapat pada flavonoid akan mendonorkan elektron pada radikal bebas, sehingga molekul radikal bebas memiliki atom terluar yang seimbang dan radikal bebas menjadi netral atau tidak reaktif. Keadaan stres oksidatif dapat dikendalikan dan proses peroksidasi lipid juga terhambat. Keadaan stres oksidatif yang terkendali atau terhambat peningkatannya akan membuat antioksidan endogen, seperti GSH dapat dicegah penurunannya, karena adanya suplai antioksidan eksogen dari ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb.*). Selain itu juga menghambat aktivasi dari mediator inflamasi, sehingga kerusakan struktur dan membran sel hepar juga terhambat dan jaringan ikat tidak terbentuk.

Senyawa CCl_4 yang diinduksi pada tikus (*Rattus norvegicus*) akan menyebabkan efek toksik pada organ hepar. Senyawa CCl_4 yang masuk ke dalam tubuh tikus akan dimetabolisme oleh sitokrom P_{450} dan akan dikonversikan menjadi radikal karbon triklorometil (CCl_3). Senyawa tersebut akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal karbon triklorometil peroksil (CCl_3O_2) yang merupakan bentuk dari ROS yang bersifat reaktif. Dalam keadaan normal terjadi keseimbangan antara pembentukan radikal bebas dan aktivitas antioksidan di dalam sel, jika keseimbangan tersebut terganggu akan menimbulkan stress oksidatif yang menyebabkan kerusakan komponen-komponen sel. Radikal bebas yang meningkat didalam tubuh melebihi jumlah antioksidan endogen akan menimbulkan terjadinya stress oksidatif.

Hepatotoksisitas disebabkan oleh metabolit reaktifnya, yaitu triklorometil (CCl_3). Adanya ini mengakibatkan peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang akan menyebar ke seluruh tubuh termasuk hepar. ROS adalah bagian dari

radikal bebas yang merupakan produk dari metabolisme sel normal. Radikal bebas merupakan salah satu produk reaksi kimia dalam tubuh berupa atom atau gugus yang mempunyai elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya, sehingga senyawa ini bersifat sangat reaktif (tidak stabil).

Timbulnya peroksidasi lipid merupakan salah satu kerusakan yang diakibatkan oleh stress oksidatif. Melalui reaksi peroksidasi lipid dihasilkan beberapa senyawa seperti hidrokarbon, aldehid, dan epoksida. MDA merupakan salah satu hasil dari senyawa aldehid. Peroksida dari molekul lipid merusak struktur molekul lipid seperti pada membran sel, sehingga membran sel yang tersusun dari dua lapis lipid mengalami kerusakan dan yang mengakibatkan terjadinya kematian sel. Peroksidasi lipid mempunyai sifat merusak membran sel yang disebut dengan efek detergen. GGT yang terikat membran akan meningkatkan aktifitasnya dengan memanfaatkan GSH ekstraseluler untuk membentuk GSH intraseluler. Ketika membran lipid bilayer dirusak oleh radikal bebas, GGT yang terikat membran akan terlepas menuju sirkulasi dan menjadi tidak fungsional. Pelepasan GGT dari membran menyebabkan kenaikan kadar GGT dalam serum.

Hal ini akan memicu terjadinya aktivasi sel inflamasi yang mengakibatkan adanya pelepasan mediator inflamasi. Mediator inflamasi ini bertanggung jawab menimbulkan reaksi radang untuk melindungi jaringan sekitar dari kerusakan. Produksi mediator inflamasi yang meningkat di dalam hepar akan menyebabkan inflamasi yang kemudian menyebabkan kerusakan struktur dan membran sel hepar. Jika struktur dari membran sel rusak, maka *Hepatic Stellate Cells* (HSC)

yang ada dalam membran yang semula pasif akan menjadi aktif. HSC merupakan sel penghasil MES utama pada hepar yang cedera. HSC yang teraktivasi bermigrasi dan berakumulasi pada lokasi perbaikan jaringan, mensekresikan sejumlah besar MES dan meregulasi degradasi MES. Akumulasi MES ini akan diatur oleh *Matrix Metalloproteinase* (MMP) yang merupakan mediator utama degradasi kolagen dan memainkan peranan dalam perbaikan dan remodelling jaringan.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rangkaian konseptual penelitian yang telah tercantum, maka hipotesis penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pemberian ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*) dapat memberikan pengaruh preventif terhadap penurunan kadar Malodialdehid (MDA) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar.
2. Pemberian ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb*) dapat memberikan pengaruh preventif terhadap penurunan *Gamma Glutamyl Transferase* (GGT) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model fibrosis hepar.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Pembuatan ekstrak gambir dilakukan di Materia Medika Batu (MMB) UPT Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur. Pemeliharaan hewan coba, induksi CCl_4 dan perlakuan pada hewan percobaan dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pengujian kadar enzim Malodialdehid (MDA) dilakukan di Laboratorium Fisiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya dan *Gamma Glutamyl Transferase* (GGT) dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilakukan selama 6 minggu dari bulan Juli- Agustus tahun 2017.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain kandang tikus, timbangan mikro, plastik klip, *aluminium foil*, sonde lambung, spuit, cawan petri, tabung reaksi, alat-alat bedah berupa gunting, scalpel dan blade, pinset, *ice box*, *freezer*, sentrifus, wrap, vortex, tabung eppendoft, mikropipet, spuit, papan bedah, desikator, kertas saring, inkubator, *vacutainer*, kapas steril, *tissue*, masker, glove, mikroskop dan alat uji *spektofotometer shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601*.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain tikus jantan galur wistar umur 8 sampai 12 minggu dengan berat badan 150-200 gram dan CCl_4 merk pro analysi, gambir, etanol 96%, serum darah, aquades, *olive oil*, dan PBS.

4.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian yang bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), karena media yang dipergunakan dalam penelitian sama atau dianggap seragam (Kusriningrum, 2008). Pada penelitian ini hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Kelompok (A) adalah kontrol negatif berisi tikus yang sehat, kelompok (B) adalah kontrol positif yang diinduksi CCl_4 dosis 2 ml/ kg BB intraperitoneal 3 kali seminggu selama 4 minggu, kelompok (C) tikus yang diberi ekstrak gambir dengan dosis 130 mg/kg BB + induksi CCl_4 , kelompok (D) tikus yang diberi ekstrak gambir dengan dosis 260 mg/kg BB + induksi CCl_4 dan kelompok (E) adalah tikus yang diberi ekstrak gambir 390 mg/kg BB + induksi CCl_4 .

4.3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar berumur 8 sampai 12 minggu dengan berat badan 150-200 gram, hewan coba yang digunakan sebanyak 20 ekor dan diadaptasikan selama tujuh hari untuk penyesuaian dengan kondisi laboratorium. Adapun

estimasi besar sampel berdasarkan rumus rancangan acak lengkap (RAL) (Kusriningrum, 2008):

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka dapat disimpulkan bahwa dalam 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah tikus sebanyak 4 kali ulangan dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan total 20 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan coba.

Tabel 4.1 Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok Perlakuan	Perlakuan
A (Kontrol negatif)	Tikus tanpa perlakuan
B (Kontrol positif, sakit)	Tikus yang diinduksi CCl ₄
C (Perlakuan 1)	Tikus diberi ekstrak gambir dosis 130 mg/kg BB + induksi CCl ₄
D (Perlakuan 2)	Tikus diberi ekstrak gambir dosis 260 mg/kg BB + induksi CCl ₄
E (Perlakuan 3)	Tikus diberi ekstrak gambir dosis 390 mg/ kg BB + induksi CCl ₄

4.3.3 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Variabel bebas : Ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb.*).

Variabel tergantung : Kadar MDA dalam organ hepar dan GGT dalam serum.

Variabel terkendali : CCl₄, homogenitas tikus (*Rattus norvegicus*) yang terdiri dari strain, jenis kelamin, berat badan, umur, pakan, suhu ruangan, dan kelembapan kandang.

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar umur 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram. Tikus yang digunakan dalam penelitian diadaptasikan atau diaklimatisasi selama tujuh hari terhadap lingkungan yang bertujuan untuk mengurangi stress pada hewan coba, serta tikus diberikan pakan berupa ransum basal pada semua tikus secara *ad libitum*. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi lima kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok terdapat 5 ekor tikus dan masing-masing kelompok dimasukkan ke dalam satu kandang. Kandang tikus yang digunakan harus berlokasi pada tempat yang bebas dari kebisingan, kegaduhan, dan terhindar dari asap industri beserta polutan lainnya. Lantai kandang yang dibuat harus mudah dibersihkan dan disanitasi, serta kandang sesuai dengan suhu ruang.

4.4.2 Pembuatan Ekstrak Gambir

Pembuatan ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Produk gambir dihaluskan dan dimaserasi (rendam) dengan menggunakan etanol 96% sebanyak 250 ml, lalu serbuk yang telah dibasahi dengan pelarut dimasukkan ke dalam toples dan dihomogenkan kemudian ditambahkan lagi pelarut etanol 96% sampai terendam lalu ditutup toples dengan rapat selama 24 jam. Selanjutnya di *shaker* digital dengan kecepatan 50 rpm dan disaring ekstrak cair dengan penyaring kain dan ditampung dalam erlenmeyer. Ampas dimasukkan lagi ke dalam toples dan ditambahkan lagi pelarut sampai terendam dan dibiarkan selama 24 jam di atas *shaker* digital dengan kecepatan 50 rpm. Remaserasi dilakukan selama 24 jam sampai filtrat atau ekstrak lebih jernih. Hasil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir dijadikan satu kemudian dievaporasi dengan rotary evaporator selama 3 jam. Ekstrak gambir selanjutnya dievaporasi dengan *waterbath* selama 2 jam dan ekstrak gambir disimpan pada refrigerator untuk pengawetan.

4.4.3 Pemberian Ekstrak Gambir sebagai Tindakan Pencegahan (Preventif)

Pemberian ekstrak gambir sebagai tindakan pencegahan (preventif) diberikan secara per oral dengan menggunakan sonde. Pemberian dilakukan setiap hari dari hari ke 8 sampai hari ke 42 hari (minggu ke 2-6). Pemberian ekstrak gambir dengan menggunakan dosis yang sudah ditentukan, yaitu: kelompok C menggunakan dosis 130 mg/kg BB, kelompok D dengan menggunakan dosis 260 mg/kg BB, dan kelompok E dengan menggunakan dosis 390 mg/kg BB (Fahrudin, 2015) (Lampiran 7)

4.4.4 Pemberian CCl₄ untuk Pembuatan Hewan Coba Fibrosis Hepar

Pembuatan hewan coba fibrosis hepar dilakukan dengan menggunakan Karbon tetraklorida (CCl₄) yang dilarutkan ke dalam *olive oil* yang diinduksikan secara intraperitoneal (IP) pada kelompok B (Kontrol positif), kelompok C, Kelompok D, dan kelompok E dengan dosis sebanyak 2 mL/kg BB dengan konsentrasi bertingkat tiga kali seminggu selama 4 minggu yaitu dari minggu ke 3 sampai 6.

4.4.5 Pengukuran Malodialdehid (MDA)

Pada pemeriksaan enzim Malodialdehid (MDA), langkah awal yang dilakukan adalah dengan melakukan euthanasia pada tikus dengan cara dislokasi *vertebrae cervicalis*, kemudian dilakukan nekropsi. Tikus disiapkan pada papan bedah, dengan posisi rebah dorsal lalu disisi mulai dari rongga abdomen hingga ke rongga thoraks sehingga organ jantung dapat terlihat. Lalu ambil darah melalui jantung tikus untuk koleksi serum darah dengan menggunakan *sprit* 3 cc. Sampel darah ditempatkan di dalam tabung venoject tanpa anti koagulan dan dibiarkan selama kurang lebih 60 menit pada suhu ruangan dengan cara memiringkan tabung 45 derajat agar serumnya keluar dan diambil serumnya. Lalu dipindahkan dalam tabung sentrifus dan disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 30 menit. Setelah serum diambil, dimasukkan ke dalam tabung *microtube* dan disimpan di lemari pendingin.

Setelah dilakukan pengambilan sampel darah, kemudian dilakukan pengambilan sampel organ hati. Organ yang telah diambil lalu dibilas dengan NaCl fisiologis 0,9% kemudian direndam larutan *Phosfat Buffer Saline* azida

(PBS azida) dengan pH 7,4 dalam pot, diberi label dan disimpan dalam lemari pendingin.

Kadar peroksidasi lipid (MDA) dianalisis menggunakan uji TBA metode Capeyon *et al.* (2002). Prinsip metode ini berdasarkan kepada kemampuan pembentukan kompleks berwarna merah jambu antara MDA dan asam thiobarbiturat (TBA) dengan prosedur sebagai berikut: sebanyak 1 g hati digerus dalam kondisi dingin dan ditambahkan 1 ml NaCl 0,9% fisiologis. Homogenat disentrifugasi pada 8000 rpm selama 20 menit. Kemudian sebanyak 100 μ L homogenat ditambahkan dengan 550 μ L aquades. Setelah itu ditambahkan 1 ml NaCl 0,9% ditambah 100 μ L TCA 10% dihomogenkan dengan *vortex*. Ditambah 250 μ L HCl 1 M. Ditambah 100 μ L Na-Thio 1%, dihomogenkan dengan *vortex*. Larutan homogen dipanaskan dalam waterbath suhu 100° selama 20 menit. Setelah itu diangkat dan didinginkan pada suhu ruangan. Absorbansi supernatan diukur pada 533 nm.

4.4.6 Pengambilan Jaringan pada Organ Hepar

Pengambilan jaringan organ hepar pada hewan coba tikus dilakukan pada hari ke-42 setelah perlakuan. Sebelum pengambilan organ hepar, lakukan euthanasia pada tikus dengan cara dislokasi *vertebrae cervicalis*, kemudian lakukan pembedahan. Untuk pengambilan organ hepar, pembedahan dilakukan pada bagian peritoneum, tikus diposisikan rebah dorsal pada papan pembedahan. Lalu dilakukan insisi pada bagian peritoneum, kemudian diambil dan disimpan hepar yang berada dibawah diafragma didalam rongga abdomen untuk diamati.

4.4.7 Pengukuran Kadar GGT Serum

Pemeriksaan kadar GGT serum diukur dengan menggunakan metode spektrofotometri. Serum dikeluarkan dari lemari pendingin, dibiarkan hingga mencapai suhu ruang. Diambil 20 μL serum lalu dicampur dengan 1000 μL reagen GGT. Dihomogenkan dan didiamkan pada suhu ruang selama 1 menit. Sampel dimasukkan ke dalam kuvet lalu dibaca pada panjang gelombang 405 nm (Jong, 2003).

4.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dengan pengukuran aktivitas Malondialdehid (MDA) dan *Gamma Glutamyl Transferase* (GGT) dengan menggunakan spektrofotometri dianalisa dengan menggunakan ragam *analysis of variance* (ANOVA) dengan menggunakan program SPSS (*Statistic Product of Service Solution*) 24.0 for windows dengan tujuan untuk melihat signifikansi pengaruh pemberian ekstrak gambir. Apabila terdapat perbedaan yang nyata, maka dilanjutkan dengan uji Tukey atau Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan taraf kepercayaan sebesar 95% ($\alpha = 5\%$) untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dengan terapi yang diberikan.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Preventif Ekstrak Gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) pada Tikus Fibrosis Hepar Terhadap Kadar Malondialdehid (MDA)

Pengukuran kadar MDA pada hepar tikus dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) terhadap kenaikan kadar Malondialdehid (MDA) akibat pemberian CCl_4 dengan konsentrasi bertingkat setiap minggunya.

Tabel 5.1 Hasil Uji Tukey Kadar MDA Terhadap Kelompok Perlakuan

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Kadar MDA ($\mu\text{g/ml}$)	Peningkatan Kadar MDA(%) Terhadap Kontrol Negatif	Penurunan Kadar MDA(%) Terhadap Kontrol Positif
Kontrol negatif	103 \pm 6,61 ^d	-	-
Kontrol positif	161,75 \pm 6,77 ^a	36,32 %	-
Perlakuan 1 (130 mg/kgBB)	146,75 \pm 7,36 ^b	-	10,22%
Perlakuan 2 (260 mg/kgBB)	124,25 \pm 3,54 ^c	-	30,18%
Perlakuan 3 (390 mg/kgBB)	105,50 \pm 6,61 ^d	-	53,31%

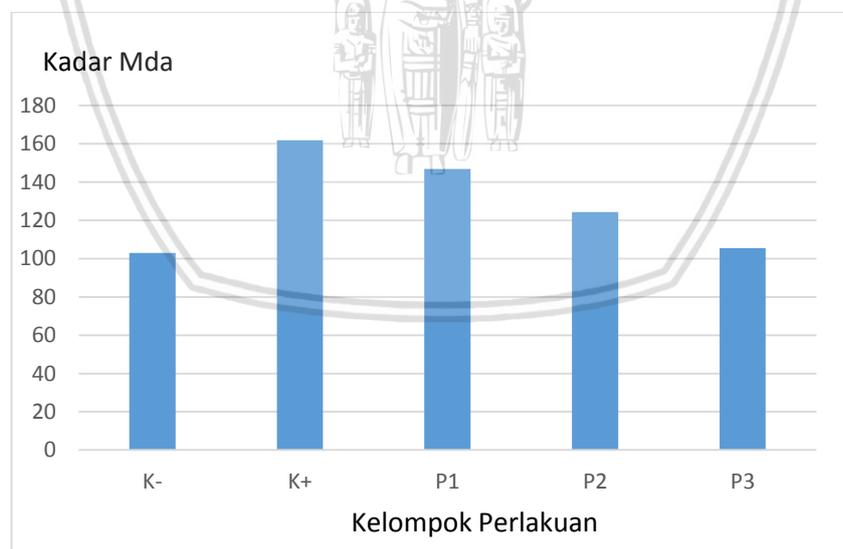
Keterangan: Notasi a, b, c, dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar perlakuan.

Hasil uji menunjukkan kelompok perlakuan 3 (dosis 390 mg/kg BB) yang memiliki penurunan terhadap kontrol positif sebesar 53,31% tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kontrol negatif. Perbedaan yang signifikan terdapat pada kelompok perlakuan 1 (dosis 130 mg/kg BB) terhadap kontrol

positif sebesar 10,22% dan kelompok perlakuan 2 (dosis 260 mg/kgBB) sebesar 30,18% terhadap kelompok kontrol positif (**Tabel 5.1**).

Kelompok kontrol positif memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol negatif yang peningkatannya sebesar 36,32%. Pada kelompok kontrol positif yang diinduksi dengan CCl_4 menunjukkan bahwa terdapat kenaikan kadar MDA secara signifikan ($p < 0,05$) (**Tabel 5.1**).

Pemberian ekstrak gambir pada kelompok perlakuan 1 (130 mg/kg BB) dan kelompok perlakuan 2 (260 mg/kgBB) menyebabkan penurunan kadar MDA terhadap kontrol positif. Hal ini menunjukkan ekstrak gambir dapat menurunkan kadar MDA jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif walaupun penurunannya masih berbeda signifikan dan belum mendekati kadar MDA pada kelompok kontrol negatif.



Gambar 5.1 Penurunan Kadar MDA Pengaruh Pemberian Ekstrak Gambir

Pada kelompok perlakuan 3 menunjukkan hasil penurunan kadar MDA terhadap kontrol positif sebesar 53,31%. Pemberian ekstrak gambir dengan dosis

390 mg/kg BB mampu menurunkan kadar MDA secara signifikan, kadar MDA pada kelompok perlakuan 3 tidak berbeda nyata dengan kadar MDA pada kontrol negatif. Sehingga kelompok perlakuan 3 diasumsikan dapat mencegah terjadinya fibrosis hepar pada tikus. Sehingga ada indikasi perlindungan dan penghambatan peroksidasi lipid yang berlanjut oleh ekstrak gambir.

Karbon tetraklorida (CCl_4) merupakan salah satu zat kimia yang bersifat reaktif dan dapat merusak hepar. Peningkatan kadar MDA hati merupakan indikator adanya kerusakan sel hati yang disebabkan oleh peroksidasi lipid akibat induksi CCl_4 (Zuraida, 2015). Kelompok kontrol negatif pada penelitian ini menjadi standar untuk mengetahui adanya peningkatan kadar MDA hasil reaksi peroksidasi lipid dari induksi CCl_4 . Hasil dari kadar MDA kelompok kontrol negatif adalah $103 \pm 6,61 \mu\text{g/ml}$ yang merupakan hasil metabolisme secara normal.

Pada penelitian ini CCl_4 digunakan untuk menginduksi terjadinya fibrosis hepar. CCl_4 yang diinduksikan pada tikus putih menurut penelitian sebelumnya (Zuraida, 2015) dimetabolisme di hati oleh enzim sitokrom P450 membentuk radikal triklorometil. Kemudian radikal bebas triklorometil (CCl_3) akan segera bereaksi dengan oksigen membentuk radikal triklorometil peroksida (CCl_3O_2) yang jauh lebih reaktif dibanding radikal bebas triklorometil (CCl_3). Sifat triklorometil peroksida (CCl_3O_2) sangat reaktif terhadap biomolekul penyusun utama membran sel seperti lipid, triklorometil peroksida menyebabkan inisiasi lipid peroksidase oleh hidrogen. Malondialdehid merupakan salah satu senyawa yang dapat menggambarkan aktivitas oksidan (radikal bebas) dalam sel sebagai hasil akhir dari peroksidasi lipid. Peningkatan kadar lipid peroksidasi hepar

ditandai dengan meningkatnya kadar MDA (Zuraida, 2015). Jumlah radikal bebas yang berlebih mengakibatkan peningkatan proses peroksidasi lipid sehingga produksi MDA juga meningkat. Peningkatan itu berbanding lurus dengan kenaikan kadar MDA karena pemberian CCl_4 . Hal ini terlihat pada kelompok kontrol positif yang memiliki kadar MDA paling tinggi yaitu 161,75 jika dibandingkan dengan kelompok lainnya.

Olive oil yang digunakan sebagai pelarut CCl_4 memiliki kandungan polifenol yang berpotensi untuk mencegah terjadinya fibrosis hepar. Pada penelitian sebelumnya (Fang dkk., 2008) pemberian olive oil dapat mencegah terjadinya kenaikan kadar MDA. Pada penelitian ini pemberian olive oil bersamaan dengan CCl_4 masih menimbulkan terjadinya fibrosis hepar dilihat pada kelompok kontrol positif. Hal ini disebabkan dosis yang diberikan terlalu kecil sehingga tidak dapat menangkal radikal bebas yang akhirnya menimbulkan peroksidasi lipid.

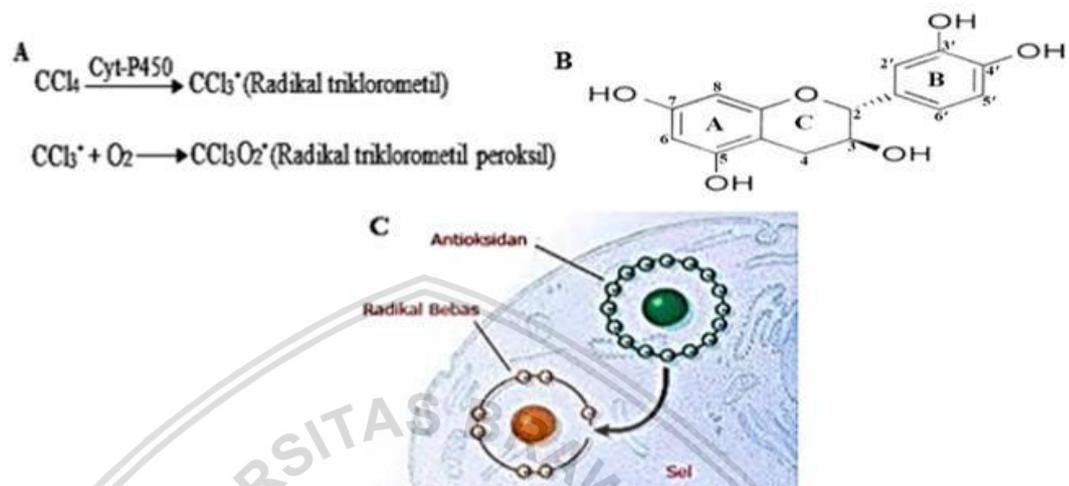
Penurunan kadar MDA pada kelompok perlakuan 1 sebesar 10,22% dan 2 sebesar 30,18% terjadi karena ekstrak gambir yang diberikan memiliki kandungan flavonoid sebagai antioksidan yang jumlahnya masih kurang mencukupi untuk mempertahankan keseimbangan antara oksidan dengan antioksidan didalam tubuh akibat induksi CCl_4 . Sehingga efek toksik dari CCl_4 yaitu radikal bebas belum mampu dinetralisir secara optimal oleh flavonoid yang ada dalam ekstrak gambir dengan dosis yang diberikan. Stress oksidatif terjadi karena rendahnya antioksidan sehingga tidak dapat mengimbangi reaktivitas senyawa oksidan, sehingga kadar MDA belum menurun mendekati kelompok kontrol negatif (Winarsi, 2007).

Ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan menyebabkan keadaan stress oksidatif yang mengakibatkan kerusakan sel, jaringan, hingga organ tubuh. Langkah tepat untuk mengurangi stress oksidatif adalah mengurangi paparan radikal bebas dan mengoptimalkan pertahanan tubuh melalui aktivitas antioksidan (Khaira, 2010). Hal ini terlihat pada kelompok perlakuan 3 yang memiliki dosis ekstrak gambir paling tinggi dengan induksi CCl_4 yang sama tetapi dapat menurunkan kadar MDA secara signifikan dibandingkan kelompok perlakuan 1 dan 2 yang juga dapat menurunkan kadar MDA tetapi penurunannya tidak signifikan.

Penurunan kadar MDA pada kelompok perlakuan 1 sebesar 10,22%, 2 sebesar 30,18% dan 3 sebesar 53,31% disebabkan oleh pengaruh ekstrak gambir yang berfungsi sebagai antioksidan. Menurut Septiani (2015) efek penghambatan peroksidasi lipid pada ekstrak gambir disebabkan oleh sifat antioksidan senyawa flavonoid yaitu katekin yang terkandung di dalamnya. Mekanisme kerja flavonoid termasuk katekin adalah menghambat pembentukan peroksidasi lipid pada tahap inisiasi dengan berperan sebagai peredam terhadap radikal bebas oksigen reaktif. Cara kerjanya adalah dengan memberikan donor atom H kepada radikal peroksil sehingga menjadi netral dan reaksi berantai peroksidasi lipid dapat dihentikan.

Radikal bebas yang merupakan molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan akan menarik atau mencari elektron dari molekul lain yang ada di dalam tubuh. Molekul yang pertama diserang oleh radikal bebas adalah lipid sebagai pelindung sel. Reaksi radikal bebas di dalam tubuh dapat dinetralisir atau

dihentikan dengan bantuan antioksidan alami yang berasal dari metabolit sekunder tanaman (Fahrudin, 2015).



Gambar 5.2 Mekanisme Reaksi CCl_4 Menjadi Radikal Bebas (A), Struktur Polifenol Katekin (B) dan Mekanisme Donor Elektron Antioksidan Dalam Menetralkan Radikal Bebas (C)

Peran bahan aktif gambir yaitu katekin memiliki struktur dengan banyak gugus fenol (OH) yang berikatan dengan radikal bebas dengan cara melepas gugus H pada gugus fenol yang akan berikatan dengan radikal bebas membentuk kompleks RH atau kompleks non radikal yang reaksinya $\text{R}^{\bullet} + \text{AH} \rightarrow \text{RH} + \text{A}^{\bullet}$ (**Gambar 5.2**), sehingga dapat menghambat proses inisiasi dan reaksi oksidasi tidak berlanjut serta menghindari tahapan propagasi dan terminasi seperti pada proses oksidasi radikal bebas secara normal (Hary, 2016).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat dilihat bahwa kelompok perlakuan 3 dengan dosis 390 mg/kg BB merupakan dosis terbaik dalam menghambat kenaikan kadar MDA dengan meningkatkan antioksidan dalam tubuh hingga kadar MDA mendekati kondisi normal (kontrol negatif). Pemberian ekstrak gambir secara signifikan menunjukkan manfaatnya untuk

menurunkan kadar MDA yang meningkat seiring dengan peningkatan dosis ekstrak gambir yang diberikan.

5.2 Pengaruh Preventif Ekstrak Gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) pada Tikus Fibrosis Hepar Terhadap Aktivitas *Gamma Glutamyl Transferase* (GGT)

Pengukuran aktivitas enzim *Gamma Glutamyl Transferase* (GGT) pada hepar tikus dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak gambir (*Uncaria gambir Roxb.*) terhadap kenaikan kadar enzim *Gamma Glutamyl Transferase* (GGT) akibat pemberian CCl_4 dengan konsentrasi bertingkat setiap minggunya.

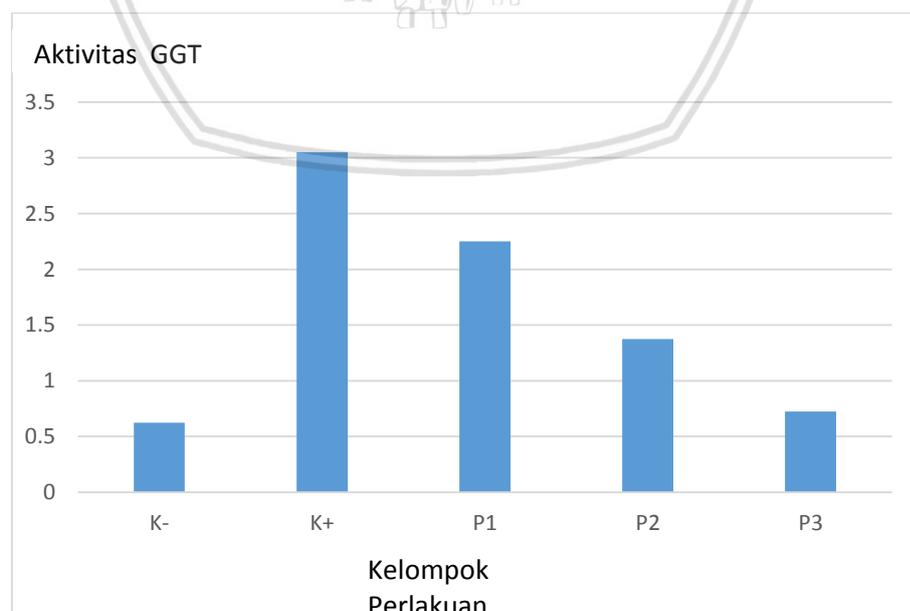
Tabel 5.2 Hasil Uji Tukey Aktivitas GGT Terhadap Kelompok Perlakuan

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Aktivitas GGT (U/L)	Peningkatan Aktivitas GGT (%) Terhadap Kontrol Negatif	Penurunan Aktivitas GGT (%) Terhadap Kontrol Positif
Kontrol negatif	0,63±0,22 ^d	-	-
Kontrol positif	3,05±0,31 ^a	79,34 %	-
Perlakuan 1 (130 mg/kgBB)	2,25±0,26 ^b	-	35,55%
Perlakuan 2 (260 mg/kgBB)	1,38±0,29 ^c	-	121,01%
Perlakuan 3 (390 mg/kgBB)	0,73±0,17 ^d	-	317,80%

Keterangan: Notasi a, b, c, dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar perlakuan. Notasi d menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan

Kelompok perlakuan 3 (dosis 390 mg/kg BB) tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap kontrol negatif tetapi memiliki penurunan yang signifikan terhadap kelompok kontrol positif sebesar 317,80% sehingga mendekati kadar ggt normal. Pada kelompok perlakuan 1 (dosis 130 mg/kg BB) terdapat penurunan terhadap kelompok kontrol positif sebesar 35,55% dan kelompok perlakuan 2 (dosis 260 mg/kg BB) sebesar 121,01. Perbedaan yang signifikan terdapat pada kelompok perlakuan 1 (dosis 130 mg/kg BB) dan kelompok perlakuan 2 (dosis 260 mg/kgBB) terhadap kelompok kontrol positif dan negatif (**tabel 5.2**).

Hasil penurunan aktivitas GGT tertinggi terlihat pada kelompok perlakuan 3 (317,80 %) terhadap kontrol positif sebesar 317,80% dan mampu menghambat peningkatan aktivitas GGT serum hingga mendekati kondisi normal seperti kelompok kontrol negatif dibanding kelompok perlakuan 2 (121,01 %) dan kelompok perlakuan 1 (35,55 %).



Gambar 5.3 Penurunan Aktivitas GGT Pengaruh Pemberian Ekstrak Gambir

Kelompok kontrol negatif pada penelitian ini digunakan sebagai standar untuk mengetahui peningkatan aktivitas GGT hasil induksi CCl_4 . Aktivitas GGT pada kontrol negatif adalah $0,63 \pm 0,22^d$ U/L yang merupakan hasil metabolisme secara normal. Ekspresi GGT merupakan salah satu mekanisme pertahanan antioksidan yang sangat sensitif terhadap stress oksidatif. Berdasarkan Giknis dan Clifford (2006) kadar GGT normal pada tikus jantan umur 2-3 bulan yakni berkisar 0 – 1 U/L. Kelompok kontrol negatif memiliki perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) dengan kelompok kontrol positif.

Kelompok kontrol positif memiliki peningkatan yang signifikan terhadap kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan 1, 2, dan 3. Kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 dengan ekstrak gambir dosis 130 mg/kg BB, 260 mg/kg BB, 390 mg/kg BB menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap penurunan kadar GGT pada kelompok kontrol positif sebesar 35,55%, 121,01% dan 317,80% (**Tabel 5.2**). Peningkatan aktivitas GGT serum pada kelompok kontrol positif yang mencapai 79,34 % terhadap kelompok kontrol negatif merupakan akibat dari induksi CCl_4 karena meningkatnya jumlah radikal bebas.

Aktivitas GGT yang mengalami peningkatan merupakan respon pertahanan dari detoksifikasi metabolik toksik hasil proses metabolisme CCl_4 . Induksi CCl_4 pada tikus putih menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dalam membran sel yang terjadi melalui senyawa oksigen reaktif (ROS) karena adanya metabolit reaktif yaitu CCl_3 dan CCl_3O_2 . Peroksidasi lipid dan ROS tersebut yang akan menyebabkan terjadinya kerusakan dan kematian sel (Pertiwi, 2015). Pemanfaatan glutation untuk oksidasi dan konjugasi dengan metabolit reaktif

menyebabkan penurunan kadar GSH sehingga metabolit reaktif terlibat dalam proses autooksidasi membentuk spesies oksigen reaktif. Aktivitas GGT dalam metabolismenya berkaitan dengan makromolekular GSH dimana GGT menghidrolisis GSH menjadi komponen asam amino diantaranya sistein untuk dimanfaatkan kembali pada sintesis GSH intraseluler (Roziana, 2015). Kerusakan membran sel sebagai situs terikatnya enzim GGT menyebabkan lepasnya ikatan GGT-membran menuju sirkulasi dan menjadikan GGT tidak lagi fungsional. Berkurangnya jumlah GGT fungsional menyebabkan menurunnya sintesis antioksidan GSH ke dalam sel sehingga sel akan semakin rentan terhadap kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas (Whitfield, 2001).

Penurunan kadar GGT terhadap kelompok kontrol positif terlihat pada kelompok perlakuan 1 dan 2 yang terjadi karena ekstrak gambir yang diberikan memiliki kandungan antioksidan, tetapi jumlah antioksidan kurang mencukupi untuk mempertahankan keseimbangan antara oksidan dengan antioksidan di dalam tubuh akibat induksi CCl_4 . Sehingga efek toksik dari CCl_4 yaitu radikal bebas belum mampu dinetralkan secara optimal oleh flavanoid yang ada dalam ekstrak gambir dengan dosis yang diberikan. Stress oksidatif terjadi karena rendahnya antioksidan sehingga tidak dapat mengimbangi reaktivitas senyawa oksidan (Winarsi, 2007). Adanya peningkatan stress oksidatif pada hepar, dapat diatasi dengan pemberian antioksidan yang bisa memperlambat proses peroksidasi lipid dan meningkatkan jumlah glutathion pada hepar yang mampu mengikat ROS. Dimana fungsi ini terganggu ketika kondisi hepar sedang mengalami kerusakan karena bahan toksik (Chicoz- Lach dkk., 2014).

Kadar GGT yang masih tinggi menunjukkan adanya penurunan kadar GSH yang merupakan indikasi terjadinya stress oksidatif. Bila tidak ada stress oksidatif, hampir semua glutathion yang dikeluarkan oleh sel hati ke plasma darah dan empedu dalam bentuk tereduksi, yaitu GSH. Berbeda dengan sintesis GSH yang terjadi di intraseluler, penurunan konsentrasi GSH terjadi secara khusus di ruang ekstraseluler dan hanya dalam sel yang mengekspresikan enzim GGT (Yuniastuti, 2016). Menurunnya kadar GGT sampai rata-rata 0,63 U/L pada kelompok perlakuan 3 yang mendekati kelompok kontrol negatif dapat diartikan bahwa stress oksidatif sudah tidak terjadi dan kadar GGT pada kelompok perlakuan 3 telah normal.

Menurunnya kadar GGT pada kelompok perlakuan yang diberi ekstrak gambir menunjukkan bahwa ada indikasi perlindungan dan penghambatan peroksidasi lipid yang berlanjut oleh ekstrak gambir. Mekanisme katekin sebagai antioksidan adalah dengan memberikan elektron pada radikal bebas. Antioksidan menghambat oksidasi atau menghentikan reaksi berantai pada radikal bebas dari lemak yang teroksidasi melalui empat mekanisme reaksi yaitu, pelepasan hidrogen dari antioksidan, pelepasan elektron dari antioksidan, adisi lemak ke dalam cincin aromatik pada antioksidan, dan pembentukan senyawa kompleks antara lemak dan cincin aromatik pada antioksidan (Sayuti, 2015).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan kelompok perlakuan 3 (390 mg/kgBB) merupakan dosis terbaik dalam menghambat peningkatan kadar GGT dengan meningkatkan antioksidan dalam tubuh hingga kadar GGT mendekati kondisi normal seperti kelompok kontrol negatif.

BAB 6 PENUTUP

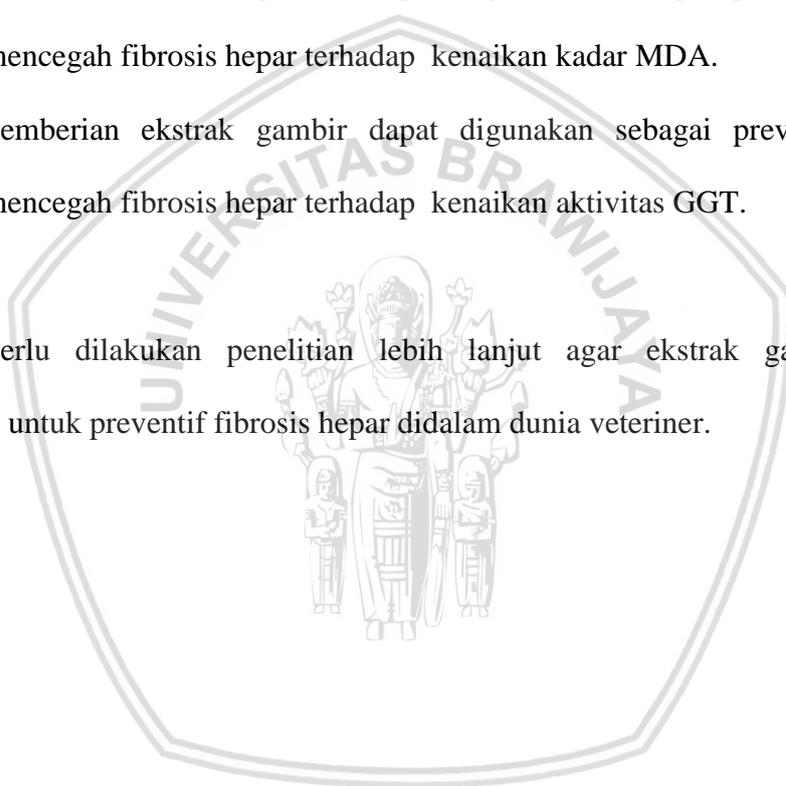
6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Pemberian ekstrak gambir dapat digunakan sebagai preventif dalam mencegah fibrosis hepar terhadap kenaikan kadar MDA.
2. Pemberian ekstrak gambir dapat digunakan sebagai preventif dalam mencegah fibrosis hepar terhadap kenaikan aktivitas GGT.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut agar ekstrak gambir dapat diaplikasikan untuk preventif fibrosis hepar didalam dunia veteriner.



DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, A. 2012. Uji Bioaktivitas Losartan Terhadap Jaringan Fibrosis Hati Tikus yang di Induksi Karbon Tetraklorida (CCl₄). *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, Vol. 17, No.2, 2012, halaman 92-97.
- Amirudin, R. 2007. *Fibrosis Hati*. Buku Ajar Ilmu Penyakit Hati Ed1. Jakarta: Jayabadi.
- Amos, 2010. *Kandungan Katekin Gambir Sentra Produksi Di Indonesia*. Pusat Pengkajian Teknologi Agroindustri Bahan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. *Jurnal Standarisasi* Vol. 12, No. 3 Tahun 2010: 149-155
- Andhika, O. A. 2009. Fibrosis Hati. *JKM*. 8(2) : 198-210.
- Badan POM RI. 2007. *Acuan Sediaan Herbal Volume Ketiga Edisi Pertama*. Direktorat Obat Asli Indonesia.
- Badan POM RI. 2010. *Acuan Sediaan Herbal Volume Kelima Edisi Pertama*. Direktorat Obat Asli Indonesia.
- Bataller, R dan Brenner, D. A. 2005. The Liver Fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*: 115 (2) 179-183.
- Bredo RM. 2011. *Anatomy of the Liver in Wistar Rat (Rattus norvegicus)*. *Jurnal International J. Morphol.* Hal 77
- Boyer, T.P. Manns, M.P Sanyal, A.J. 2012. *Zakim and Boyers Hepatology: A Text Book of Liver Disease*. Elsevier Saunders: USA
- Boorman, G.A. 2006. *Pathology of The Fischer Rat: Reference and Atlas*. Academic Press. California.
- Capeyon, MFM Julie, C, Eric B, Jean P, MR, Pierre B Claude LL, Benard D. 2002. A Diet Cholesterol and Deficient in Vit E Incudes Lipid Peroxidation But Does Not Enhance Antioxidant Enzyme Expression in Rat Liver. *J. Nutr Biochem* 13 : 296-301
- Chang, F.J., B., Shun, M.L., Raj, K.Y., Hyung, R.K and Han, J.C. 2013. Mechanism of The Inhibitory Effects of *Euconomia ulmoides* Oliv. Cortex Extracts (EUCE) in The CCl₄ – Induced Acute Liver Lipid Accumulation in Rats. *International Journal of Endocrinology*. 11
- Chicoz-Lach, Halina, Michalak, Agata. 2014. Oxidative Stress as a Crucial Factor in Liver Disease. *World Journal of Gastroenterology*. 20 (25): 8082-8091.
- Darmawan S. 2003. *Hati dan Saluran Empedu*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Diaz. 2006. Efek Hepatoprotektor Ekstrak Etanol 50% Jamur Lingzhi (*Ganoderma Lucidium*) pada Tikus Jantan yang diinduksi Paracetamol. *Skripsi*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta

- Eberhardt Manfred K. 2001. *Reactive Oxygen Metabolites*. 2nd Ed. CRC Press, Washington DC
- Fahrudin, F., D. D. Solihin, N. Kusumorini, S. Ningsih. 2015. Efektifitas Ekstrak Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) Sebagai Hepatoprotektor pada Tikus (*Rattus norvegicus* L.) yang Diinduksi CCl₄. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, Vol. 13, No. 2 ISSN 1693-1831. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.
- Fang Hsun Lang, Jinn Tsyay Lai, Wen Chuan Lin. 2008. Inhibitory Effect of olive oil on fibrosis induced by carbon tetrachloride in rat liver. *Clinical Nutrition* (2008) 27, 900-907
- Friadi, Agung. 2016. Pengaruh Berbagai Konsentrasi Ekstrak Gambir (*Uncaria gambir* Roxb) Terhadap *Candida albicans*. *Skripsi*. Makassar: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin
- Giknis, Mary L.A., Clifford, Charles B. 2006. *Clinical Laboratory Parameters for Rats. Charles River Lab*. Wilmington.
- Gumbira- Sa'id, E. K. Syamsu, E. Mardiyati, A.H. Brontoadie, N.A. Evalia, D.L. Rahayu, A.A.A.R. Puspitarini, A. Ahyarudin, dan A. Hadiwijoto. 2009. *Pengembangan Agroindustri Gambir Di Indonesia*. IPB Press. Bogor
- Hary. 2016. Uji Aktivitas Isolat Katekin Gambir (*Uncaria Gambir Roxb*) Pada Tikus Putih Jantan Galur Sprague Dawley Dengan Diberi Beban Aktivitas Fisik Maksimal. *Skripsi*. Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah
- Haryanto, Sugeng. 2009. *Ensiklopedi Tanaman Obat Indonesia*. Yogyakarta: Pallmal
- Harrison, longo L dkk. 2013. *Gastroentologi dan Hepatologi*. Jakarta: EGC
- Haurissa, Andreas Erick. 2014. *Gamma-Glutamyltransferase Sebagai Biomarker Risiko Penyakit Kardiovaskuler*. CDK-222/ vol. 41 no. 11, th. 2014
- Hendrich, H. J. 2006. *Taxonomy and stocks and strains*. In *The Laboratory Rat* M. Suckow, S. Weisbroth, and C. Franklin, eds, pp. 71-92. Elsevier Academic, Burlington, MA.
- Hendromartono S. 2000. Peran Radikal Bebas terhadap Komplikasi Vaskuler. *Majalah Penyakit Dalam*. Udayana
- Hernawati. 2012. *Gambaran Efek Toksik Etanol Pada Sel Hati*. Bandung
- Ijzer, J. 2008. Liver fibrosis and regeneration in dogs and cats : An immunohistochemical approach. *Veterinary Sciences Tomorrow*. The Netherlands, Uthrecht University.
- Jeharatnam, David koh. 2005. *Bahan Ajar Praktik Kedokteran Kerja ed 1*. Jakarta: EGC
- Jong, Weon Choi. 2003. Association Between Elevated Serum Hepatic Enzyme Activity and Total Body Fat in Obese Humans. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vol. 33, no. 3, 2003

- Junqueira LC and Carneiro J, 2007. *Histologi Dasar*, Penerjemah. A Dharma, Jakarta: EGC, Hal.318-331.
- Khaira, Kuntum. 2010. Menangkal Radikal Bebas Dengan Antioksidan. *Jurnal Sainstek*. Volume II No.2: 183- 187.
- Krinke, G. J. 2000. *Administration The Laboratory Rat*. Academic Press: USA
- Krinke, G. J. 2000. *The Laboratory Rat. The Handbook of Experimental Animals*. Academic Press. p. 3-56
- Kumar, dkk. 2004. *Buku Ajar Patologi Edisi 7*. Jakarta: EGC. Hal. 796.
- Kumar V., Abbas A.K, Fausto N. 2005. *Pathologic Basis of Disease 7th Edition*. Philadelphia: Elsevier Saunders, pp: 12-16.
- Kun Z, Chun FG, and Yun PZ. 2010. Simpler Score of Routine Laboratory Tests Predicts Liver Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis B. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. surabaya.
- Maulina Nora, Gusbakti Rusip, Betty. 2010. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Manggis (Garcinia mangostana L) terhadap Perubahan Kadar Enzim ALT, AST Hati Mencit Jantan (Mus musculus) strain DDW setelah diberi Monosodium Glutamate (MSG) dibandingkan dengan Vitamin E*. Sumatera
- Murray R.K, Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. 2003. *Biokimia Harper Edisi 25*. Jakarta: EGC,pp: 610-744
- Murray R. K. 2000. *Harper Illustrated Biochemistry 26th Edition*. Boston: Mc Graw Hill Co.,p: 416
- Natalia, Eka Dessy. 2013. Uji Toksisitas Tepung Glukomanan (*Amorphophalus blume*) Dengan Penentuan LETHAL DOSE(LD₅₀) Dan Pengaruhnya Terhadap Fungsi Hati Dan Ginjal Tikus Wistar. *Skripsi*. Malang: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya.
- Ngatidjan. 2006. *Metode Laboratorium dalam Toksikologi*. Metode Uji Toksisitas. Hal 86-135.
- Olayaki, I. A., Soladoye, A.O., Salman, T.M., & Joraiah, B. 2008. Effect of Photoperiod on Testicular Functions in Male Sprague-dawley Rats. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 23(1-2): 27-30
- Pertiwi, P dan Wahyu Widyaningsih. 2015. Efek Ekstrak Etanol Ganggang Hijau (*Ulva lactuca L*) Terhadap Aktivitas SGPT dan SGOT Pada Tikus. *Jurnal Pengobatan Tradisional*. Fakultas Farmasi. Universitas Ahmad Dahlan
- Pramono CSU. 2005. *Penggunaan Hewan-Hewan Coba Di Laboratorium*. Institut Pertanian Bogor
- Price SA, Lorraine MW. 2006. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Jakarta:EGC

- Priambodo S. 2007. *Pengendalian Hama Tikus Terpadu*. Jakarta: Penebar Swadaya
- Purwaningtyas B. 2016. *Pengaruh Ekstrak Kacang Tunggak (Vigna unguiculata) Terhadap Penurunan Kadar Maondialdehyde, Diameter Duktus dan Tebal Epitel Duktus Kelenjar Payudara Rattus Norvegicus Ovariectomi*. [Tesis]. Program Studi Magister Kebidanan. Universitas Brawijaya.
- Ramon B, and Daud AB, 2005. Liver Fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*.
- Rohmatin, A.R, susetyarini, E., Hadi, s. 2015. Kerusakan Sel Hepar Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Yang di Induksi Karbon Tetraklorida (CCl₄) Setelah Diberi Ekstrak Etanol Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia Merr.*). *Seminar Nasional XII Pendidikan Biologi FKIP UNS 2015* hal. 942-947.
- Roosmarianto. 2016. Kajian Aktivitas Antioksidan Kacang Gude (*Cajanus cajan*) dan Pengaruhnya Terhadap Aktivitas Enzim Hati Tikus yang Diinduksi Karbon Tetraklorida. *Jurnal Teknologi Kesehatan*. Volume 12 Nomor 2. Salasia SI, Bambang Hariono. 2010. *Patologi Klinik Veteriner*. Yogyakarta: samudra Biru
- Roziana, dkk. 2015. Pengaruh Suplementasi Vitamin E Terhadap Kadar Gamma Glutamil Transferase (GGT) dan Kadar Nitric Oxide (NO) pada Tikus (Studi pada tikus *Rattus Norvegicus* Strain Wistar Jantan Terpapar Inhalasi Uap Benzene). *Jurnal Gizi Indonesia*. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Sani, Robby Nasrul. 2013. Skrining Fitokimia Dan Uji Toksisitas (LD₅₀) Ekstrak Mikroalga (*Tetraselmis chuil*) Terhadap Hati Tikus Wistar Secara IN VIVO. *Skripsi*. Malang: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya.
- Sayuti.,Kesuma dan Rina Yenrina. 2015. *Antioksidan, Alami, dan Sintetik*. Andalas University Press. Padang
- Septiani, dkk. 2015. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Gambir (*Uncaria Gambir*) Dibandingkan Dengan Chlorhexidine Gluconate 0,2% Topikal Terhadap Penyembuhan Luka Mukosa Palatum Tikus Galur Wistar. *Dentika Dental Journal, Volume 18 Nomor 3*. Fakultas Kedokteran. Universitas Jendral Achmad Yani
- Sherwood, L. 2004. *Human physiology*. Thomson Learning. Inc., USA: xvii + 760 hlm.
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. Elsevier Press. Washington.
- Sulaiman, K., dkk. 2002. *Penentuan Kadar Glukosa dan Fruktosa Madu Randu dan Madu Kelengkeng 35 dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. *Jurnal Kimia 2 (2)*: 77-86
- Timbrell j. 2002. *Principle of Biochemical Toxicology*. USA(US): Taylor & Francis Inc. 2nd ed.
- Venukumar, M.R. and M.S. Latha. 2002. Hepatoprotective Effect of The Methanol Extract of *Curligo Orchioides* in CCl₄ Treated Mae Rats. *Indian Journal of Pharmacology 34*: 269-275.
- Walace K, Burt AD, and Wirght MC. 2008. Liver Fibrosis. *Biochemical Journal*

- Whitfield, J. B. 2001. *Gamma Glutamyl Transferase*. Department of Clinical Biochemistry, Royal Prince Alfred Hospital, and University of Sydney. Australia
- Widjaja, I. H., 2008. *Anatomi Abdomen*. Jakarta: EGC. hal.67, 72.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Williams, David A. 2005. *Roundtable Discussion: Diagnosing Liver Disease*. IDEXX Laboratories.
- Yuniastuti, Ari. 2016. *Dasar Molekuler Glutation dan Perannya sebagai Antioksidan*. FMIPA Press. Semarang
- Zuraida., Y. Eti, A. Eliza. 2015. Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Terhadap Kadar Malondialdehid dan Aktivitas Katalase Tikus yang terpapar Karbon Tetraklorida. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 2015; 4(3)

