

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Asiatikosida yang terkandung di dalam ekstrak semanggi gunung adalah sebesar 9,986% (Fiddien, 2015). Kadar asiatikosida tersebut menjadi dasar perhitungan dosis ekstrak yang akan diberikan tikus. Berdasarkan hasil skrining fitokimia, ekstrak semanggi gunung mengandung beberapa senyawa yaitu: tanin, saponin, glikosida, dan flavonoid. Senyawa asiatikosida merupakan senyawa golongan glikosida triterpenoid yang merupakan salah satu jenis saponin (Reniza, 2003).

Pada penelitian ini, 30 tikus wistar jantan dibagi menjadi 5 grup yang terdiri dari grup plasebo, grup kontrol negatif, dan 3 grup perlakuan. Kontrol positif tidak dijadikan salah satu grup penelitian karena, penelitian ini lebih memfokuskan aktivitas farmakologi dari senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak semanggi gunung yang dalam hal ini masih jarang diteliti di Indonesia khususnya efek hepatoprotektornya. Selain itu, saat ini masih belum ada obat standar dari hepatotoksik yang dapat dijadikan pembanding hepatoprotektor dengan ekstrak semanggi gunung. Perlakuan pada tikus wistar jantan dimulai dari periode adaptasi selama 7 hari. Kemudian selama 30 hari dilakukan induksi OAT pada grup II, III, IV, dan V. Selanjutnya selama 20 hari dilakukan pemberian ekstrak dengan dosis 5, 10, dan 20 mg/kgBB/hari pada grup III, IV, dan V. Pada periode induksi OAT, terdapat 2 ekor tikus yang mati yaitu: tikus 3C dan 4A. Tikus yang mati tersebut kemudian dibedah dan diambil organ heparnya,

sedangkan untuk darahnya sudah tidak dapat diambil karena sudah membeku. Pada organ hepar tikus yang mati tersebut ditemukan adanya nodul (lampiran 13). Adanya nodul merupakan salah satu tanda adanya kerusakan hepar seperti sirosis pasca nekrotik. Sirosis pasca nekrotik akibat hepatotoksin adalah sirosis yang paling sering dijumpai. Nekrosis berat yang terjadi pada sirosis jenis ini dapat disebabkan oleh virus hepatitis. Pada sirosis ini, hepar akan mengecil dengan banyak nodul dan jaringan fibrosa (Baradero *et al.*, 2005).

Pemeriksaan biokimia hepar yang dilakukan terdiri dari ALT, AST, ALP, bilirubin total, bilirubin direk, dan bilirubin indirek. Setelah hasil pemeriksaan didapatkan, dilakukan analisis statistik dengan SPSS V 20-32 bit. Pertama-tama dilakukan uji normalitas, dilanjutkan dengan uji homogenitas, dan selanjutnya dilakukan uji *One Way ANOVA* atau *Kruskal Wallis* serta uji *post hoc*. Pada uji normalitas, dan homogenitas data ALT didapatkan hasil bahwa data berdistribusi normal dan bersifat homogen, sehingga pengujian hipotesis dilanjutkan ke uji *One Way ANOVA*. Pada uji *One Way ANOVA* data ALT didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelima grup karena, diperoleh nilai $p > 0,05$. Hasil uji *One Way ANOVA* tersebut membuktikan bahwa kadar ALT dari grup I, II, III, IV, dan V tidak berbeda secara bermakna. Dalam keadaan hepatotoksik, enzim ALT yang diproduksi pada sel parenkim hepar akan dikeluarkan ke aliran darah karena terjadi kerusakan sel hepar akibat radikal bebas yang dihasilkan oleh obat-obatan yang bersifat DILI (Saukkonen *et al.*, 2006). Peningkatan ALT mengindikasikan terjadi kerusakan sel dan hilangnya integritas fungsional dari membran di hepar (Lina *et al.*, 2012). Jika grup I dijadikan tolak ukur adanya peningkatan atau penurunan pada kadar ALT, maka dari itu dapat disimpulkan terjadi peningkatan sebesar 4,16% pada grup II;

peningkatan 4,16% pada grup III; peningkatan 7,79% pada grup IV; dan peningkatan 9,87% pada grup V. Pada penelitian ini didapatkan hasil yang tidak sesuai dengan hipotesis karena tidak terdapat perbedaan kadar ALT yang signifikan antara kelima grup sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak semanggi gunung tidak dapat memberi pengaruh dengan cara menurunkan kadar ALT pada keadaan hepatotoksik. H1 ditolak dan H0 diterima karena, pada hasil uji hipotesis grup III, IV, dan V tidak berbeda bermakna satu sama lain dan tidak berbeda bermakna dengan grup I maupun grup II.

Pada uji normalitas, dan homogenitas data AST didapatkan bahwa data AST berdistribusi normal dan bersifat homogen sehingga, uji hipotesis dilanjutkan pada uji *One Way ANOVA*. Pada analisis statistika data AST dengan *One Way ANOVA* menghasilkan nilai p sebesar 0,087 atau nilai $p > 0,05$. Hasil uji *One Way ANOVA* tersebut membuktikan bahwa kadar AST pada grup I, II, III, IV, dan V tidak berbeda secara bermakna. Keadaan hepatotoksik menyebabkan enzim AST yang terdapat pada sel parenkim hepar menjadi banyak terdapat pada aliran darah karena sel parenkim hepar lisis akibat radikal bebas yang dihasilkan oleh obat yang bersifat DILI (Saukkonen *et al.*, 2006). Peningkatan AST mengindikasikan terjadi kerusakan sel, dan hilangnya integritas fungsional dari membran di hepar (Lina *et al.*, 2012). Jika grup I dijadikan tolak ukur adanya peningkatan atau penurunan pada kadar AST, maka dari itu dapat disimpulkan terjadi penurunan sebesar 0,89% pada grup II; peningkatan 17,75% pada grup III; peningkatan 42,47% pada grup IV; dan peningkatan 34,83% pada grup V. Pada penelitian ini didapatkan hasil yang tidak sesuai dengan hipotesis karena ekstrak semanggi gunung tidak dapat memberi pengaruh dengan cara menurunkan kadar AST pada keadaan hepatotoksik. H1 ditolak dan H0 diterima

karena, pada hasil uji hipotesis grup III, IV, dan V tidak berberda bermakna satu sama lain, dan tidak berbeda bermakna dengan grup I maupun grup II.

Biokimia hepar lainnya yang diukur adalah ALP (*Alkaline Phosphatase*). Dalam keadaan hepatotoksik, peningkatan ALP merupakan salah satu penanda terjadinya kerusakan hepar (Pagana, 2014). Peningkatan ALP mengindikasikan terjadinya peningkatan sintesis enzim ini oleh lapisan sel *canaliculi* yang terjadi pada intra hepatik dan ekstra hepatik, serta menyebabkan peningkatan patologis aliran empedu (Lina *et al.*, 2012). Pada penelitian ini didapatkan hasil ALP sebesar -1, 0, dan 1 sehingga tidak bisa dianalisis dengan statistika. Hasil seperti itu muncul dikarenakan antikoagulan yang digunakan yaitu EDTA mengikat ion Mg^{2+} dan Zn^{2+} yang dibutuhkan dalam reagen ALP sehingga akan mempengaruhi reaksi yang terjadi (Tate and Ward, 2004). Jumlah sampel darah yang sedikit juga berperan karena semakin sedikit sampel darah maka EDTA akan semakin banyak mengikat ion Mg^{2+} dan Zn^{2+} (Bowen and Remaley, 2013). Antikoagulan yang lebih sesuai untuk digunakan pada pemeriksaan ALP adalah heparin.

Pengukuran bilirubin pada penelitian ini meliputi bilirubin total, direk, dan indirek. Pada pengujian normalitas, dan homogenitas data bilirubin direk didapatkan hasil bahwa data bilirubin direk berdistribusi normal dan homogen sehingga, uji hipotesis dilanjutkan pada uji *One Way ANOVA*. Pada uji *One Way ANOVA* data bilirubin direk dihasilkan nilai p sebesar 0,287 sehingga dapat dikatakan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelima grup. Jika grup I dijadikan tolak ukur adanya peningkatan atau penurunan pada kadar bilirubin direk, maka dari itu dapat disimpulkan terjadi peningkatan sebesar 25% pada grup II, peningkatan 50% pada grup III, peningkatan 25% pada grup IV, dan

peningkatan 25% pada grup V. Pada penelitian ini didapatkan hasil yang tidak sesuai dengan hipotesis karena tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada rata-rata nilai bilirubin direk antara kelima grup sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak semanggi gunung tidak dapat memberi pengaruh dengan cara menurunkan kadar bilirubin direk pada keadaan hepatotoksik. H1 ditolak dan H0 diterima karena, pada hasil uji hipotesis grup III, IV, dan V tidak berbeda bermakna satu sama lain dan tidak berbeda bermakna dengan grup I maupun grup II.

Bilirubin indirek juga diukur dalam penelitian ini namun menghasilkan hasil yang negatif oleh karena itu, tidak dapat dilakukan analisis statistik. Hasil negatif seperti itu didapat karena, bilirubin yang langsung diukur adalah bilirubin total dan bilirubin direk, sedangkan bilirubin indirek diperoleh dari hasil pengurangan bilirubin total dengan bilirubin direk. Pada laboratorium klinik hanya dilakukan pengukuran bilirubin total dan bilirubin direk. *Unconjugated hyperbilirubinaemia* atau peningkatan bilirubin indirek ditetapkan jika rasio antara bilirubin direk dengan bilirubin total adalah sebesar 20-30%. *Conjugated hyperbilirubinaemia* atau peningkatan bilirubin direk ditetapkan jika rasio antara bilirubin direk dengan bilirubin total adalah $> 70\%$. *Unconjugated hyperbilirubinaemia* dan *conjugated hyperbilirubinaemia* dapat terjadi secara bersamaan jika rasio antara bilirubin direk dan bilirubin total adalah 30-60% (Fevery, 2008). Pada penelitian ini tidak dapat ditentukan jenis *hyperbilirubinaemia* yang terjadi karena kadar bilirubin indirek bernilai negatif.

Pada pengujian normalitas dan homogenitas didapatkan hasil bahwa data bilirubin total tergolong data yang homogen dan tidak berdistribusi normal sehingga, uji hipotesis dilanjutkan pada uji *Kruskal Wallis*. Hasil dari uji *Kruskal*

Wallis data bilirubin total adalah diperoleh nilai p sebesar 0,024 atau $p < 0,05$ sehingga dapat dikatakan terdapat perbedaan yang signifikan diantara kelima grup. Kemudian dilakukan uji *post hoc* dengan uji *Mann Whitney* untuk melihat perbedaan diantara perbandingan masing-masing grup. Perbandingan grup yang menunjukkan perbedaan yang signifikan adalah antara grup I dan III, grup I dan V, grup II dan V serta grup III dan V karena keempat perbandingan tersebut menghasilkan nilai $p < 0,05$. Perbandingan antara grup I dan III jika dilihat dari grafik aktivitas bilirubin total pada gambar 5.3, terlihat bahwa grup III (grup dengan dosis ekstrak 5 mg/kgBB/hari) memiliki median yang lebih tinggi dari grup I (plasebo). Pada grafik juga terlihat bahwa median grup I (plasebo) lebih tinggi dari grup V (grup dengan dosis ekstrak 20 mg/kgBB/hari). Selain itu, median grup II (kontrol negatif) juga lebih tinggi dari grup V (grup dengan dosis ekstrak 20 mg/kgBB/hari). Grup III (grup dengan dosis ekstrak 5 mg/kgBB/hari) memiliki median yang lebih tinggi dari grup V (grup dengan dosis ekstrak 20 mg/kgBB/hari). Berdasarkan empat pasang perbandingan tersebut, perbandingan yang sesuai dengan hipotesis penelitian adalah antara grup II dengan V sehingga, dapat dikatakan bahwa asiatikosida dosis 20 mg/kgBB/hari dapat menurunkan bilirubin total secara signifikan jika dibandingkan dengan grup kontrol negatif. Jika grup I dijadikan tolak ukur adanya peningkatan atau penurunan pada kadar bilirubin total, maka dari itu dapat disimpulkan tidak terjadi peningkatan atau penurunan pada grup II, peningkatan 100% pada grup III, penurunan 25% pada grup IV, dan penurunan 50% pada grup V. Bilirubin total merupakan penjumlahan dari bilirubin direk dan bilirubin indirek maka perbedaan yang signifikan pada data bilirubin total ini tidak dapat membuktikan bahwa H_1 diterima dan H_0 ditolak karena, tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada

uji hipotesis bilirubin direk dan hasil bilirubin indirek bernilai negatif sehingga tidak dapat dianalisis secara statistika.

Berdasarkan hasil penelitian, tidak terdapat peningkatan biokimia hepar yang signifikan karena grup II (kontrol negatif) tidak berbeda secara signifikan dengan grup I (plasebo). Peningkatan kadar biokimia hepar di aliran darah disebabkan oleh adanya kerusakan dan gangguan fungsi sel hepar. Kerusakan sel dan gangguan fungsi sel hepar ditandai dengan adanya nekrosis sel. Menurut keadaan histopatologi hepar pada penelitian Taqiyya (2015), nekrosis yang terjadi pada grup I adalah 1 sampel dengan skor 1 dan 4 sampel lainnya dengan skor 2. Hasil pengamatan nekrosis sel pada grup II adalah 1 sampel dengan skor 1, 3 sampel dengan skor 2, dan 1 sampel dengan skor 3. Pada grup III, nekrosis sel dengan skor 1 terdapat pada 1 sampel dan skor 2 terdapat pada 4 sampel. Semua sampel pada grup IV memiliki skor 2 nekrosis sel. Pada grup V, 3 sampel dengan nekrosis skor 1, dan 2 sampel dengan nekrosis skor 2. Berdasarkan data pengamatan histopatologi hepar, semua sampel dalam masing-masing grup mengalami nekrosis ringan-sedang. Nekrosis pada setiap grup yang tidak tergolong tinggi ini mengakibatkan biokimia hepar yang berada pada aliran darah juga tidak tinggi sehingga tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelima grup.

Semua biokimia hepar pada penelitian ini tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada uji hipotesis. Salah satu faktor yang mempengaruhi hasil penelitian adalah dosis dan lama pemberian OAT yang diinduksikan menghasilkan keadaan hepatotoksik yang masih ringan sehingga, belum mampu meningkatkan kadar biokimi hepar karena berdasarkan hasil biokimia hepar, grup II (kontrol negatif) tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan grup I

(plasebo). Kadar biokimia hepar pada grup II tidak meningkat secara signifikan menandakan bahwa masih banyak sel hepar yang belum mengalami nekrosis atau nekrosis yang terjadi tidak tinggi sehingga kadar biokimia hepar tidak terlalu tinggi dalam darah. Faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil penelitian ini adalah dosis dan lama pemberian ekstrak semanggi gunung belum mampu menghasilkan efek hepatoprotektif karena grup III, IV, dan V tidak memiliki perbedaan yang signifikan jika dibandingkan dengan grup II (kontrol negatif). Berdasarkan kedua faktor tersebut, dapat dikatakan bahwa keadaan hepatotoksik di awal penelitian masih ringan sehingga hipotesis penelitian tidak dapat dibuktikan melalui penurunan kadar biokimia hepar akibat efek hepatoprotektor dari asiaticosida. Selain itu, sebaiknya cara pemberian ekstrak dapat divariasikan dengan cara memberikan ekstrak sebelum induksi OAT, bersamaan dengan induksi OAT, dan setelah induksi OAT sehingga dapat dilihat perbedaan efek hepatoprotektornya. Kandungan senyawa lain pada ekstrak juga mungkin dapat mempengaruhi efek hepatoprotektif dari asiaticosida karena yang diberikan pada tikus adalah ekstrak semanggi gunung, tidak dalam bentuk asiaticosida murni.

6.2 Implikasi terhadap Bidang Kefarmasian

Manfaat penelitian ini adalah untuk mengembangkan hepatoprotektif dalam pengobatan DILI. Seperti diketahui bahwa OAT yang terdiri dari isoniazid, rifampin, dan pirazinamid tergolong dalam DILI. Banyak pasien TBC yang menghentikan pengobatan karena mengalami hepatotoksik yang merupakan efek samping dari OAT. Oleh karena itu diperlukan adanya hepatoprotektor yang dapat meminimalisir efek samping OAT pada pasien TBC. Implikasi penelitian ini

terhadap bidang kefarmasian adalah membuktikan bahwa dosis asiaticosida dalam ekstrak semanggi gunung pada penelitian ini belum dapat menurunkan kadar biokimia hepar tikus wistar jantan yang diinduksi obat anti tuberkulosis maka dari itu, diperlukan penelitian lanjutan untuk mengetahui dosis yang sesuai.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa hipotesis penelitian tidak terbukti karena tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara grup perlakuan. Selain itu terdapat data yang tidak dapat dianalisis karena hasilnya negatif. Beberapa keterbatasan penelitian yang menyebabkan hasil negatif tersebut antara lain adalah :

1. Antikoagulan EDTA yang mengikat ion magnesium dan zinc dalam reagen pengukuran ALP menyebabkan reaksi enzimatik terganggu sehingga kadar ALP tidak dapat diukur.
2. Lama penyimpanan sampel yang singkat dan tidak adanya darah tikus tanpa EDTA yang tersisa menyebabkan pengukuran tidak dapat diulang.
3. Kadar bilirubin indirek yang diperoleh dari hasil pengurangan bilirubin total dengan bilirubin direk menyebabkan beberapa hasil menunjukkan hasil negatif.