

## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

##### 6.1.1 Karakteristik Tikus Galur Wistar (*Rattus norvegicus*)

Populasi dari penelitian ini adalah tikus jenis *Rattus norvegicus* galur wistar jantan yang dipelihara di Laboratorium Biosains Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sampel yang dipakai adalah tikus wistar dengan jenis kelamin jantan, dewasa dengan umur  $\pm$  2 bulan atau 6-8 minggu. Pemilihan sampel penelitian untuk pengelompokan perlakuan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK).

Awal percobaan semua tikus ditimbang berat badannya kemudian dilakukan randomisasi agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan dan sebelum dilakukan perlakuan populasi diadaptasikan selama 10 hari. Pemilihan tikus percobaan pada awal penelitian harus dilakukan dengan teliti dan sesuai dengan kriteria inklusi untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Seriap unit penelitian mempunyai kesempatan yang sama untuk terpilih atau tidak terpilih sebagai sampel (Sastroasmoro, 2002).

##### 6.1.2 Pengaruh Silimarin, LOLA, dan Jamu Kombinasi *C. xanthorrhiza* dan *N. sativa* terhadap Kadar Bilirubin Total

Pada kondisi kerusakan hepar yang kronis, terjadi penurunan fungsi pada hepar sehingga salah satunya ditandai dengan penurunan fungsi metabolisme terhadap

bilirubin. Bilirubin total merupakan jumlah total bilirubin yang terdapat dalam darah meliputi bilirubin terkonjugasi dan tidak terkonjugasi. Pada kerusakan hepar yang kronis, hepar tidak mampu membuang zat buangan bilirubin dan terjadi kebocoran bilirubin dari sel-sel hati atau sel duktuli sehingga bilirubin bisa masuk ke dalam aliran darah dan dapat memasuki semua cairan tubuh seperti cairan otak, cairan asites atau mewarnai kulit, sclera dan lain-lain (Panjaitan, 2007). Hal ini mengakibatkan kenaikan kadar bilirubin total dalam darah. Namun hal ini tidak terjadi pada kelompok induksi  $\text{CCl}_4$ . Kadar bilirubin kelompok induksi  $\text{CCl}_4$  masih dalam kadar normal. Hal ini menggambarkan bahwa kelompok induksi  $\text{CCl}_4$  belum mengalami gangguan fungsi metabolisme hepar yang parah.

Kenaikan bilirubin total dijumpai pada kondisi sirosis, penyumbatan saluran empedu, hepatitis, dan penyakit hemolitik. Namun, pada kelompok induksi  $\text{CCl}_4$  belum mencapai kondisi sirosis sehingga fungsi metabolisme hepar terhadap bilirubin tidak sepenuhnya terganggu. Masih ada sebagian sel normal hepatosit yang mampu memetabolisme zat buangan ini. Hal ini didukung dengan hasil penelitian Muslimah (2016) bahwa pada kelompok induksi  $\text{CCl}_4$  masih dalam kondisi fibrosis stage 5 dimana masih ada beberapa sel hepatosit yang masih normal sehingga retikulum endoplasma dalam hepatosit masih mampu mengkonjugasi bilirubin. Selain itu, pada penelitian ini, belum terjadi penyumbatan pada saluran empedu (Junqueira dan Carneiro, 2007). Oleh karena itu, pada kelompok induksi  $\text{CCl}_4$  belum didapati kenaikan bilirubin yang bermakna.

Faktor lain yang menjadi penyebab adalah sistem vaskularisasi hepar yang disuplai oleh beberapa pembuluh darah dan saluran seperti arteri hepatis, vena porta

dan duktus hepatika. Kenaikan bilirubin yang signifikan terjadi karena penyempitan pada pembuluh darah dan saluran tersebut sehingga terjadi akumulasi bilirubin dalam darah. Sedangkan kemungkinan yang terjadi pada penelitian ini adalah penyumbatan hanya terjadi di salah satu pembuluh darah hepar sehingga masih belum terjadi akumulasi bilirubin yang tinggi dalam darah (Netter, 2014).

Faktor penyebab lainnya adalah kemampuan regenerasi sel hepar sendiri. Regenerasi hepar tercapai dengan interaksi yang sangat kompleks antara sel yang terdapat dalam hati, antara lain hepatosit, sel Kupffer, sel endotelial sinusoidal, sel Ito dan sel punca; dengan organ ekstra-hepatik, seperti kelenjar tiroid, kelenjar adrenal, pankreas, duodenum, hipotalamus. Hepatosit, adalah sel yang sangat unik. Potensi hepatosit untuk melakukan proliferasi muncul pada saat-saat terjadi kehilangan massa sel yang disebut fase prima atau fase kompetensi replikatif yang umumnya dipicu oleh sel Kupffer melalui sekresi sitokin IL-6 dan TNF- $\alpha$  (Fujiyoshi, 2011).

Pada fase ini, hepatosit memasuki siklus sel dari fase G<sub>0</sub> ke fase G<sub>1</sub>. TNF- $\alpha$  dapat memberikan efek proliferasi atau apoptotik, tergantung pada spesi oksigen reaktif dan glutathion, minimal 4 faktor transkripsi diaktivasi sebelum hepatosit masuk ke dalam fase proliferasi, yaitu NF- $\kappa$ B, STAT-3, AP-1 dan C/EBP-beta. Proliferasi hepatosit diinduksi oleh stimulasi sitokin HGF dan TGF- $\alpha$ , dan EGF dengan dua lintasan. HGF, TGF- $\alpha$ , dan EGF merupakan faktor pertumbuhan yang berasal dari substrat serina dan protein logam yang menginduksi sintesis DNA (Fujiyoshi, 2011).

Lintasan pertama adalah lintasan IL-6/STAT-3 yang berperan dalam siklus sel melalui siklin D1/p21 dan perlindungan sel dengan peningkatan rasio FLIP, Bcl-2,



Bcl-xL, Ref1, dan MnSOD. Lintasan kedua adalah lintasan PI3-K / PDK-1 / Akt yang mengendalikan ukuran sel melalui molekul mTOR, selain sebagai zat anti-apoptosis dan antioksidan. Hormon tri-iodotironina, selain menurunkan kadar kolesterol pada hati, juga memiliki kapasitas dalam proliferasi hepatosit sebagai mitogen yang berperan pada siklin D1, mempercepat konsumsi  $O_2$  oleh mitokondria dengan mengaktifasi transkripsi pada gen pernafasan hingga meningkatkan produksi spesi oksigen reaktif (Fujiyoshi, 2011).

Sekresi ROS ke dalam sitoplasma hepatosit akan mengaktifasi faktor transkripsi NF- $\kappa$ B. Pada sel Kupffer, ROS dalam sitoplasma, akan mengaktifasi sekresi sitokin TNF- $\alpha$ , IL-6 dan IL-1 untuk disekresi. Ikatan yang terjadi antara ketiga sitokin ini dengan hepatosit akan menginduksi ekspresi enzim antioksidan, seperti mangan superoksida dismutase, i-nitrogen monoksida sintase, protein anti-apoptosis Bcl-2, haptoglobin dan fibrinogen- $\beta$  yang diperlukan hepatosit dalam proliferasi. Mekanisme regenerasi sel hati tersebut membantu proses hepar dalam menormalkan metabolisme bilirubin yang terganggu (Fujiyoshi, 2011).

Pada kelompok Silimarin didapatkan kenaikan kadar bilirubin total, direk dan indirek. Hal ini juga diungkapkan oleh penelitian Shaker *et al.* (2011), dimana dijumpai peningkatan bilirubin pada tikus yang diberikan terapi silimarin dengan kontrol positif induksi  $CCl_4$  selama 8 minggu. Belum ada penyebab yang pasti mengenai kenaikan bilirubin oleh Silimarin. Hal ini mungkin berhubungan dengan penelitian Dixit, *et al.*, (2007), yang menyebutkan bahwa kadar bilirubin menurun secara signifikan pada pasien sirosis dengan mengkonsumsi Silimarin 420 mg/hari selama 41 bulan. Pada

penelitian Fraschini (2002), perbaikan kondisi sirosis oleh Silimarin didapati setelah pemberian terapi selama 8 minggu. Hal ini membuktikan bahwa Silimarin membutuhkan waktu kerja yang lama untuk memperbaiki kondisi sirosis. Pada penelitian ini, Terapi Silimarin diberikan hanya dalam waktu 4 minggu. Kemungkinan yang terjadi adalah waktu tersebut bukan waktu yang optimum bagi Silimarin untuk dapat memperbaiki kondisi sirosis inkomplit.

Pada kelompok LOLA, didapatkan penurunan kadar bilirubin total, direk dan indirek. Namun belum ada mekanisme yang pasti mengenai penurunan kadar bilirubin yang dikarenakan obat LOLA. Hal ini mungkin berhubungan dengan cara kerja LOLA yaitu memperkuat pertahanan antioksidan endogen dan stabilisasi membran sel hepar sehingga menghambat pemasukan radikal bebas yang dapat merusak sel hepar. Mekanisme ini menghambat progresifitas fibrosis sehingga hepar masih mampu memetabolisme bilirubin (Abdul, *et al.* 2010)

Pada Kelompok Jamu Kombinasi, didapatkan penurunan kadar bilirubin total, direk, dan indirek. Kandungan *thymoquinone* pada *Nigella sativa* bersifat antioksidan dan mampu menangkap anion superoksida sehingga progresifitas fibrosis dapat terhambat (El-Tawil dan Moussa, 2006). Sedangkan pada *Curcuma xanthorrhiza*, kandungan kurkumin mempunyai aktivitas meningkatkan biosintesis antioksidan endogen dan menurunkan stress oksidatif sehingga mampu menghambat progresifitas fibrosis (Farghaly dan Hussein, 2010). Ketika progresifitas fibrosis dihambat maka fungsi metabolisme terhadap bilirubin masih dapat berjalan dengan normal.

Hasil ini didukung dengan penelitian Muslimah (2016) yang menyatakan bahwa Kelompok Tikus Jamu Kombinasi ini sudah mengalami perbaikan fibrosis (stage 3 pada tikus P3B dan P3D ; stage 2 pada tikus P3A) dibandingkan kelompok induksi CCl<sub>4</sub> (stage 5). Perbaikan fibrosis ini diiringi dengan perbaikan fungsi hepar sehingga mampu memetabolisme bilirubin. Sehingga dapat disimpulkan kombinasi temulawak dan jintan hitam mampu memperbaiki fungsi hepar termasuk fungsi metabolisme bilirubin.

Pada kejadian klinis, Jaundice hemolitik disebabkan oleh overproduksi bilirubin yang disebabkan oleh hemolisis dan ketidakmampuan hepar untuk mengeluarkan pigmen ini dari dalam darah. Kondisi ini ditandai dengan peningkatan serum bilirubin indirek. Pada kondisi sirosis dan kondisi infeksi karena obstruksi intrahepatik, produksi bilirubin tidak meningkat tetapi terakumulasi di dalam darah. Pada kondisi ini, kadar bilirubin indirek meningkat pada fase awal, tetapi seiring dengan progresifitas kerusakan hepar membuat kadar bilirubin direk juga meningkat sehingga kadar total bilirubin pun meningkat (Panjaitan , 2007)

### **6.1.3 Pengaruh Silimarin, LOLA, dan Jamu Kombinasi *C. xanthorrhiza* dan *N. sativa* terhadap Kadar Albumin**

Pada kondisi fibrosis, terjadi penurunan fungsi sintesis pada hepar sehingga salah satunya ditandai dengan penurunan albumin. Hal ini dapat dilihat dari penurunan albumin kelompok induksi CCl<sub>4</sub> dibandingkan dengan kelompok tanpa induksi CCl<sub>4</sub> (  $p = 0,431$ ). Namun perbedaan ini tidak berbeda secara bermakna. Berdasarkan penelitian Muslimah (2016), kelompok tikus induksi CCl<sub>4</sub> sudah



mengalami fibrosis stage 5 (sirosis inkomplit) sehingga fungsi sintesis hepar terhadap albumin sudah terganggu. Hepar tidak mampu memproduksi albumin dalam jumlah normal. Oleh karena itu pada kadar albumin kelompok ini lebih rendah dibandingkan kelompok tanpa induksi CCl<sub>4</sub>.

Pada kelompok Silimarin, terjadi peningkatan kadar albumin dibandingkan kelompok induksi CCl<sub>4</sub> namun tidak signifikan. Peningkatan kadar albumin sebesar 3,27% ( $p = 0,999$ ). Peningkatan kadar albumin ini berhubungan aktifitas farmakologi dari silimarin. Kandungan aktif silibin pada silimarin mempunyai aktifitas hepatoprotektif dimana bekerja dengan empat mekanisme. Mekanisme pertama adalah sebagai antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas dan sebagai regulator dari *Glutathione intraseluler*. Mekanisme kedua adalah stabilisasi membran sel dan pengatur permeabilitas sel sehingga mencegah agen hepatotoksik masuk ke dalam sel hepatosit. Mekanisme ketiga adalah sebagai promotor sintesis RNA ribosomal yang menstimulasi regenerasi hepar. Mekanisme keempat adalah penghambatan sel HSC menjadi myofibroblast yang mampu berkembang menjadi sirosis (Frachini *et al.*, 2002). Mekanisme-mekanisme ini yang menunjang perbaikan kadar albumin pada kelompok silimarin. Hasil ini didukung dari hasil penelitian Muslimah (2016) yang menyatakan bahwa terjadi perbaikan tahap fibrosis Kelompok Silimarin (stage 2) dibandingkan kelompok induksi CCl<sub>4</sub> (stage 5). Perbaikan tersebut dapat dilihat dari fungsi hepar termasuk fungsi sintesis albumin sendiri. Sehingga dapat disimpulkan kelompok Silimarin mampu menaikkan kadar albumin tetapi tidak bermakna.

Pada kelompok LOLA, kadar albumin didapatkan jauh lebih rendah dibandingkan kelompok induksi  $\text{CCl}_4$  ( $p = 0,693$ ). Tidak terjadi perbaikan kadar albumin pada kelompok LOLA. Hal ini dapat disebabkan LOLA tidak bekerja secara spesifik memperbaiki enzim dan produksi protein hati. LOLA bekerja dengan menurunkan kadar amonia dan meningkatkan detoksifikasi amonia pada kondisi sirosis (Acharya *et al.*, 2009). Hasil ini juga didukung dari hasil penelitian Muslimah (2016) yang menyatakan bahwa tidak terjadi perbaikan fibrosis yang signifikan pada kelompok LOLA (stage 4) dibandingkan kelompok induksi  $\text{CCl}_4$  (Stage 5). Pada kelompok LOLA fibrosa masih menyebar pada sebagian besar area portal dengan membentuk jembatan fibrosis antara portal dan area sentral hati. Pada stage ini, belum terdapat perbaikan fungsi hati karena ada sel hepatosit yang rusak sehingga hepar belum mampu memproduksi albumin dalam batas normal. Sehingga dapat disimpulkan kelompok LOLA belum mampu menaikkan kadar albumin dalam batas normal.

Pada kelompok Jamu Kombinasi *Curcuma xanthorrhiza* dan *Nigella sativa*, didapatkan kenaikan kadar albumin dibandingkan dengan kelompok induksi  $\text{CCl}_4$  tetapi tidak signifikan ( $p = 0,163$ ). Kenaikan kadar albumin kelompok ini lebih tinggi dibandingkan kelompok Silimarin dan LOLA. Mekanisme perbaikan albumin ini dihubungkan dengan mekanisme hepatoprotektif dan hepatoregenerasi sel. Kandungan *thymoquinone* pada *Nigella sativa* bersifat antioksidan dan mampu menangkap anion superoksida sehingga progresifitas fibrosis dapat terhambat. Hal ini mengakibatkan perbaikan dalam fungsi hepar termasuk fungsi sintesis hepar terhadap albumin (El-Tawil dan Moussa, 2006). Sedangkan pada *Curcuma*



*xanthorrhiza*, kandungan kurkumin mempunyai aktivitas meningkatkan biosintesis GSH dan menurunkan stress oksidatif sehingga mampu menghambat progresifitas fibrosis (Farghaly dan Hussein, 2010). Kandungan Jamu Kombinasi *C. xanthorrhiza* dan *N. sativa* merupakan faktor protektif dari sel hepar terhadap paparan CCl<sub>4</sub>. Selain faktor proteksi, terdapat faktor regenerasi dari sel hepar untuk meregenerasi sel hepar yang rusak karena adanya peroksidase lipid sehingga hal tersebut menghambat progresifitas fibrosis hati.

Hasil ini didukung dengan penelitian Muslimah (2016) yang menyatakan bahwa Kelompok Tikus Jamu Kombinasi ini sudah mengalami perbaikan fibrosis (stage 3 pada tikus P3B dan P3D ; stage 2 pada tikus P3A) dibandingkan kelompok induksi CCl<sub>4</sub> (stage 5). Perbaikan fibrosis ini diiringi dengan perbaikan fungsi hepar sehingga mampu mensintesis albumin dalam batas normal. Selain itu, hepar juga mampu meregenerasi sel hepatosit yang rusak. Kemampuan regenerasi sel hepar ini membantu perbaikan fungsi sintesis pada hepar. Sehingga dapat disimpulkan kombinasi temulawak dan jintan hitam mampu memperbaiki fungsi hepar termasuk fungsi sintesis albumin sehingga dapat disimpulkan Jamu Kombinasi *Curcuma xanthorrhiza* dan *Nigella sativa* mampu menaikkan kadar albumin tetapi belum bermakna.

Albumin memiliki peranan penting pada kesehatan dan penyakit. Albumin merupakan kontributor utama untuk tekanan onkotik koloid / *Colloid Oncotic Pressure* (COP), yang berikatan dengan molekul endogen dan eksogen, koagulasi, dan membantu mempertahankan permeabilitas mikrovaskular agar dalam kondisi normal. Albumin terdistribusi pada kompartemen intravaskular (40%) dan ekstrasvaskular

(60%) dengan waktu paro 8 hari. Proses inflamasi menurunkan sintesis albumin sebanyak kurang lebih 90%. Albumin bertanggungjawab terhadap 50% konsentrasi plasma protein dan 80% plasma COP (Mittermayr *et al.*, 2007).

Albumin juga berperan dalam mempertahankan integritas mikrovaskular. Ketika integritas vaskular terganggu, akan mengakibatkan akumulasi cairan seperti edema perifer, edema organ dan atau efusi rongga organ. Kondisi hipoalbumin juga menyebabkan peningkatan konsentrasi obat bebas, mengakibatkan efek toksik, metabolisme cepat, dan menurunkan efikasi. Albumin juga mengikat dan menangkap radikal bebas dan berikatan dengan besi untuk menghambat peroksidase lipid. Hipoalbumin menurunkan efek protektif ini. Albumin juga memiliki peran penting dalam memodulasi koagulasi dengan berikatan dengan asam arakhidonat dan menghambat sintesis tromboxan A<sub>2</sub> dan dengan menambah aktivitas antitrombin (AT) (Mittermayr *et al.*, 2007).

## 6.2 Implikasi Terhadap Bidang Kefarmasian

Peluang pembuatan obat dari tanaman herbal merupakan peluang yang besar bagi seorang farmasis. Pemilihan bahan baku yang selektif, penentuan dosis, dan analisa kandungan secara kualitatif maupun kuantitatif merupakan salah satu tahap yang penting dalam pembuatan obat herbal. Pembelajaran mengenai dosis terapi dan mekanisme hepatoprotektor serta hepatoregenerasi merupakan faktor penting dalam pengembangan obat kerusakan hepar. Selain itu, pengembangan tanaman herbal menjadi obat fitofarmaka menunjang perkembangan pengobatan fitoterapi dalam pengobatan kerusakan hepar.

### 6.3 Keterbatasan penelitian

Dalam penelitian ini terdapat beberapa keterbatasan berupa tidak dilihatnya mekanisme hepatoregenerasi dari Jamu Kombiansi yang dapat mendukung perbaikan sel hepar. Penelitian ini juga tidak melakukan variasi dosis terapi sehingga hanya digunakan satu dosis untuk masing-masing terapi.

