

Pengaruh Ekstrak *Beta Glucan* dari *Saccharomyces Cerevisiae* terhadap Histopatologi Hepar pada Mencit Model Fibrosis Hepar

Bahiratul Nahdliyah*, Edi Widjanto**

ABSTRAK

Fibrosis hepar merupakan kondisi dimana hepar mengalami akumulasi ECM yang berlebihan sebagai respon kerusakan hepar akut maupun kronis. Beberapa fokus terapi fibrosis hepar telah diusulkan pada rantai patogenesisnya, namun terapi tersebut masih memiliki efek samping berat dan beberapa terapi masih dinilai kurang efektif. Oleh karena itu dibutuhkan sebuah strategi terapi baru yang lebih efektif. Salah satu terapi yang sedang menjadi perhatian para peneliti adalah penggunaan *Hematopoietic Stem Cells*. *Saccharomyces cerevisiae* diketahui mengandung *beta glucan*. *Beta glucan* dapat secara langsung meningkatkan pertumbuhan dan diferensiasi dari HSCs di *bone marrow* dan telah teridentifikasi dapat meningkatkan mobilisasi HSCs dari *bone marrow*. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan potensi ekstrak *beta glucan* dari *S. cerevisiae* sebagai metode pengobatan yang efektif dalam proses regenerasi hepar yang mengalami fibrosis. Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni di laboratorium secara *in vivo* dengan *randomized post test only controlled group design* menggunakan hewan coba mencit Balb/C jantan yang diinjeksi 1 ml/kgBB CCl₄ intraperitoneal. Ekstrak *beta glucan* diberikan peroral dengan dosis 25, 50, dan 100 mg/kgBB. Hasil pemeriksaan histopatologi jaringan hepar dengan pewarnaan HE diamati dengan mikroskop perbesaran 100x. Analisis data dilakukan secara deskriptif kualitatif. Dari hasil pemeriksaan histopatologi didapatkan bahwa pemberian CCl₄ pada kelompok kontrol positif berhasil membuat kerusakan hepar yang signifikan dibanding kelompok kontrol negatif. Dan pemberian terapi ekstrak *beta glucan* berhasil memperbaiki histopatologi jaringan hepar secara signifikan, dibanding kelompok kontrol positif, hingga mendekati kondisi normal. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak *beta glucan* dari *S. cerevisiae* berpotensi sebagai metode pengobatan yang efektif dalam proses regenerasi hepar yang mengalami fibrosis.

Kata kunci: *hematopoietic stem cells*, *beta glucan*, *Saccharomyces cerevisiae*, fibrosis hepar.

Effect of Beta Glucan Extract from *Saccharomyces cerevisiae* Against Histopathological Examination of The Liver in Liver Fibrosis Mice Model.

ABSTRACT

Liver fibrosis is a condition characterized by excessive accumulation of extracellular matrix in response to acute or chronic liver damage. Some liver fibrosis therapies have been proposed but these therapies still have severe side effects and some are still considered as less effective. Therefore, a new effective therapy is needed. One of therapeutic strategies concerned by researchers is the use of *Hematopoietic Stem Cells*. It is known that *Saccharomyces cerevisiae* contains *beta glucan*. *Beta glucan* can directly promote the growth and differentiation of HSCs in the bone marrow and may increase its mobilization from bone marrow to damaged tissue. This study aimed to demonstrate the potential of beta glucan from *S. cerevisiae* as an effective treatment in the reperation of liver fibrosis. This study used a true experimental design in vivo with randomized post test only controlled group design. Male Balb/C mice were injected intraperitoneally with 1 ml/kgBW CCl₄. Beta glucan extract given orally at the dose of 25, 50, and 100 mg/kgBW. Histopathological examination results of liver tissue by HE staining were observed under the microscope with 100x magnification. The data were analyzed descriptively qualitative. Histopathological examination showed that the administration of CCl₄ to positive control group managed to make significant liver damage compared to the negative control group. Administration of beta glucan managed to improve the histopathological liver tissue significantly, compared to the positive control group, to near normal condition. It can be concluded that beta glucan from *S. cerevisiae* has potential effect as an effective treatment in the regeneration of liver fibrosis.

Keywords: *hematopoietic stem cells, beta glucan, Saccharomyces cerevisiae, liver fibrosis.*

*Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

**Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

PENDAHULUAN

Fibrosis hepar merupakan kondisi dimana hepar mengalami akumulasi *extracellular matrix* (ECM) yang berlebihan sebagai respon kerusakan hepar akut maupun kronis. Penyebab utama fibrosis hepar adalah infeksi kronis virus hepatitis B dan hepatitis C, konsumsi alkohol, dan *nonalcoholic steatohepatitis* (NASH).^{1,2} Fibrosis hepar menyebabkan sekitar 1,5 juta kematian per tahun di seluruh dunia.³

Beberapa fokus terapi fibrosis hepar telah diusulkan pada rantai patogenesisnya, mulai dari inhibisi sintesis kolagen, modulasi sel stellata, hingga blok deposisi kolagen. Akan tetapi, terapi tersebut masih memiliki efek samping berat dan beberapa terapi kurang efektif dalam menunjukkan khasiatnya.⁴ Jika fibrosis hepar sudah mencapai sirosis hepar tahap akhir, transplantasi hepar merupakan terapi pilihan yang ada saat ini. Akan tetapi, transplantasi hepar memiliki pendonor yang terbatas, kemungkinan mortalitas dan morbiditas pasca operasi yang tinggi, kemungkinan penolakan oleh sistem imun tubuh, biaya operasi yang mahal, serta efek samping jangka panjang.⁵ Adanya peningkatan prevalensi terjadinya fibrosis hepar dan belum adanya metode pengobatan yang efektif hingga saat ini menyebabkan fibrosis hepar menjadi salah satu penyakit yang menarik banyak perhatian peneliti untuk mengembangkan suatu strategi pengobatan baru yang lebih efektif.

Salah satu terapi yang sedang menjadi perhatian bagi para peneliti adalah penggunaan *Hematopoietic Stem Cells* (HSCs) karena kemampuannya untuk berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel dan berkembang hingga menjadi sel matang. Beberapa penelitian

mengungkapkan bahwa mobilisasi HSCs akibat induksi dari *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) berkontribusi dalam regenerasi hepar pada hewan coba model kerusakan hepar baik akut maupun kronis. Penelitian secara *in vivo* juga membuktikan bahwa G-CSF berpotensi paling besar sebagai agen anti fibrosis karena berperan dalam mobilisasi HSCs.⁶

Saccharomyces cerevisiae merupakan mikroorganisme yang sangat dikenal masyarakat luas sebagai ragi roti (*baker's yeast*). Ragi *S. cerevisiae* ini digunakan dalam pembuatan makanan dan minuman karena bersifat nonpatogenik dan nontoksik. Ragi *S. cerevisiae* mengandung suatu struktur yang disebut dengan *beta1,3D-glucan* (*beta glucan*). *Beta glucan* ini banyak terkandung pada ragi, jamur, gandum, namun kandungan terbanyak ada pada ragi *S. cerevisiae* dengan jumlah kandungan murni sebanyak 60%.⁷

Beta glucan dapat secara langsung meningkatkan pertumbuhan dan diferensiasi dari HSCs di *bone marrow*. *Beta glucan* juga telah teridentifikasi dapat meningkatkan mobilisasi HSCs dari *bone marrow*. Selain itu, *beta glucan* memiliki efek yang signifikan dalam proses *hematopoiesis* (pembentukan sel-sel darah) pada tubuh.⁸ *Beta glucan* mempengaruhi peningkatan granulosit dan mobilisasi granulosit serta progenitornya dengan menstimulasi produksi G-CSF.⁹ Dengan meningkatnya kadar G-CSF pada tubuh, maka terjadi peningkatan pelepasan HSCs dari *bone marrow* ke aliran darah.⁸ Beberapa penelitian eksperimental lain juga telah menunjukkan sifat biologis *beta1,3D-glucan*, terutama sebagai imunomodulator, antioksidan, dan efek antitumor.^{10,11} Dengan demikian, *beta glucan* dari *S. cerevisiae*

memiliki potensi kuat sebagai kandidat terapi fibrosis hepar yang efektif dan efisien serta terjangkau bagi semua kalangan karena sumbernya yang murah dan mudah diperoleh serta sering dimanfaatkan dalam produk makanan.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan potensi ekstrak *beta glucan* dari *S. cerevisiae* sebagai metode pengobatan yang efektif dalam proses regenerasi hepar yang mengalami fibrosis. Dan secara khusus untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *beta glucan* dari *S. cerevisiae* dalam memperbaiki kerusakan jaringan hepar pada mencit model fibrosis hepar.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni di laboratorium secara *in vivo* dengan *randomized post test only controlled group design* menggunakan hewan coba berupa mencit (*Mus musculus*) Balb/C jantan berusia 6-7 minggu.¹² Kelompok penelitian berjumlah 5 (lima) yang dibagi secara acak, yakni kelompok kontrol negatif (mencit sehat tanpa dimanipulasi), kelompok kontrol positif (mencit diinduksi fibrosis hepar), kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 yaitu kelompok mencit yang diinduksi fibrosis hepar dan mendapat terapi ekstrak *beta glucan* dosis 25, 50, dan 100 mg/kgBB.

Mencit diaklimatisasi selama 7 hari di dalam laboratorium dengan tujuan agar mencit dapat beradaptasi dalam kondisi penelitian. Selama penelitian berlangsung, makanan dan minuman diberikan satu kali sehari. Sekam diganti setiap 2 hari sekali dan kandang dicuci setiap 1 minggu sekali.

Induksi fibrosis hepar dilakukan dengan pemberian injeksi CCl₄ (*carbon tetrachloride*) intraperitoneal dengan dosis 1 ml/kgBB,

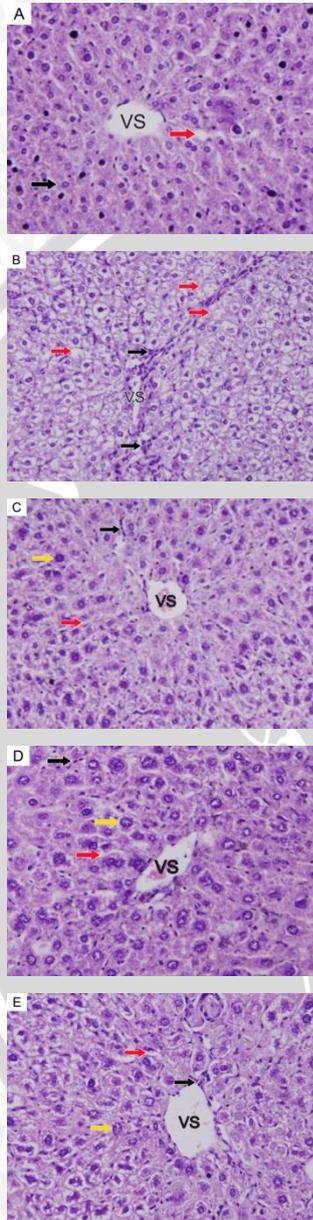
diberikan dua kali seminggu selama enam minggu.¹²

Berikut ini adalah metode pembuatan ekstrak *beta glucan* dari *S. cerevisiae*:¹² 100 gram ragi roti kering yang ditambahkan 600 ml NaOH (1M/liter) dalam suhu 60°C. Dilakukan pemanasan menggunakan *autoclave* pada suhu 115°C, 45 menit, biarkan 3 jam. Sentrifuse kecepatan 2000 rpm, 15 menit dalam suhu ruang. Buang supernatan. Ambil endapan dengan menambahkan HCl 3%. Sentrifuse kecepatan 2000 rpm, 15 menit, suhu ruang. Buang supernatan. Endapan dilarutkan dengan aquades steril, sentrifuse kecepatan 2000 rpm, 15 menit. Endapan dicampur H₂O₂ 120 ml, simpan dalam *refrigerator* 4°C selama 3 jam. Sentrifuse pada suhu 20°C, kecepatan 2000 rpm, 15 menit. Supernatan dibuang. Larutkan endapan dengan aseton 100%. Sentrifuse 2000 rpm, 15 menit, suhu 20°C. Endapan diresuspensi dengan aquades dan dipindah ke dalam valcon, simpan pada suhu 4°C. Gunakan *ultrasonic extraction* amplitudo 50%, 12 menit. Uji menggunakan FTIR (*Fourier Transferred Infrared*). Lakukan *freeze drying* untuk membuat ekstrak menjadi bubuk. Sebelum diberikan, ekstrak diencerkan dalam aquades sesuai konsentrasi yang diinginkan, lakukan *vortexing* agar cairan homogen. Penyondean dilakukan 1 kali setiap hari selama 2 minggu. Dosis pemberian ekstrak *beta glucan* yaitu 25 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, dan 100 mg/kgBB.¹⁴

Pembedahan dilakukan dengan memberikan anestesi perinhalasi menggunakan kloroform terlebih dahulu. Kemudian diambil sampel hepar dan diperiksa di laboratorium patologi anatomi. Dilakukan pewarnaan menggunakan hematoksilin eosin. Hasil preparat dilihat

dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x objektif.

HASIL PENELITIAN



Gambar 1 Gambaran Histopatologi Jaringan Hepar Mencit dengan Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE). (Perbesaran 100x)

Keterangan: (A) Kontrol Negatif; (B) Kontrol Positif; (C), (D), (E) berturut-turut merupakan kelompok perlakuan yang diterapi dengan ekstrak *beta glucan* dosis 25, 50, 100 mg/kgBB

Gambar 1 A merupakan gambaran histopatologi jaringan hepar pada kelompok kontrol negatif. Terlihat vena sentralis (VS) yang dikelilingi hepatosit normal (panah hitam) yang tersusun radier. Hepatosit berbentuk kuboid dengan batas jelas dan inti sel bulat terletak di sentral. Sinusoida tampak jelas.

Gambar 1 B menunjukkan gambaran histopatologi jaringan hepar pada kelompok kontrol positif yang diinduksi CCl₄. Sel tersusun secara ireguler di sekeliling vena sentralis. Tampak degenerasi balon secara merata yang ditandai dengan sitoplasma sel tampak pucat.¹⁵ Beberapa sel mengalami nekrosis (panah merah) dan ditemukan infiltrasi *mononuclear cell* (panah hitam) serta sinusoid yang tidak dapat diamati.

Terdapat perbaikan yang signifikan pada kelompok perlakuan terapi menggunakan ekstrak *beta glucan* dari *S. cerevisiae* (Gambar 1 C, D, dan E) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Infiltrasi *mononuclear cell* (panah hitam) berkurang sesuai dengan dosis pemberian ekstrak *beta glucan*. Semakin tinggi dosisnya, semakin sedikit pula infiltrasi yang terjadi. Meskipun masih terdapat beberapa sel yang mengalami pembengkakan (panah kuning), tetapi sinusoid (panah merah) sudah mulai tampak. Gambaran jaringan hepar pada kelompok terapi hampir mendekati gambaran jaringan hepar normal pada kelompok kontrol negatif, hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian terapi *beta glucan* berpengaruh terhadap histopatologi jaringan hepar.

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan potensi ekstrak *beta glucan* dari *S. cerevisiae* sebagai metode pengobatan yang efektif dalam proses regenerasi hepar

yang mengalami fibrosis. Secara khusus, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *beta glucan* dari *S. cerevisiae* dalam memperbaiki kerusakan jaringan hepar pada mencit model fibrosis hepar.

Induksi fibrosis hepar dilakukan dengan injeksi CCl₄ secara intraperitoneal. Zat ini dipilih karena telah terbukti mampu menginduksi fibrosis, sirosis, bahkan karsinoma sel hepar.^{16,17}

Administrasi *beta glucan* dilakukan secara oral karena dalam penelitian sebelumnya telah dibuktikan efektivitas pemberian *beta glucan* secara oral dan telah dinyatakan efektif dan aman.^{18,19}

Hasil pemeriksaan histopatologi hepar dengan pewarnaan HE pada kelompok kontrol negatif (Gambar 1 A) menunjukkan gambaran sel-sel hepar normal, berbentuk kuboid dengan batas jelas dan inti sel bulat terletak di sentral, sel-sel ini mengelilingi vena sentralis secara radier. Tampak perbedaan yang signifikan jika dibanding dengan kelompok kontrol positif yang diinduksi CCl₄ (Gambar 1 B). Gambaran histopatologi hepar pada kelompok kontrol positif menunjukkan adanya sel-sel yang mengalami degenerasi balon dan tampak adanya tanda-tanda inflamasi kronis yakni adanya infiltrasi sel-sel MN (mononuklear), sinusoid hepar juga tidak tampak. Hal tersebut menunjukkan bahwa penyuntikan CCl₄ berpengaruh terhadap gambaran kerusakan jaringan hepar pada hewan coba. CCl₄ merusak hepatosit secara langsung dengan mempengaruhi permeabilitas membran plasma, lisosom, dan mitokondria. Pemberian CCl₄ dalam waktu lama akan menyebabkan timbulnya fibrosis, sirosis, dan bahkan karsinoma sel-sel hepar.¹⁷ Hasil ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang mengatakan bahwa pemberian CCl₄ selama 2-4 minggu mampu menyebabkan terjadinya

fibrosis. Efek pemberian CCl₄ akan berbeda bergantung pada spesies dan *strain* dari hewan coba, dosis, dan cara pemberian (misal: oral, intraperitoneal, inhalasi, dll).²⁰

Pada kelompok perlakuan yang diterapi dengan ekstrak *beta glucan* dari *S. cerevisiae*, didapatkan gambaran histopatologi jaringan hepar (Gambar 1 C, D, dan E) yang membaik secara signifikan dibanding kelompok kontrol positif. Meskipun masih terdapat infiltrasi sel-sel MN dengan jumlah yang lebih sedikit, akan tetapi susunan sel-sel hepar tampak radier seperti pada jaringan hepar normal, sinusoid juga kembali nampak pada kelompok perlakuan terapi ekstrak *beta glucan* dari *S. cerevisiae*. Beberapa sel masih nampak mengalami nekrosis, namun sitoplasma sel tidak pucat seperti pada kelompok kontrol positif (Gambar 1 B).

Pemberian ekstrak *beta glucan* terbukti mengurangi kerusakan jaringan hepar secara signifikan hingga mendekati keadaan normal pada pemeriksaan histopatologi. Perbaikan jaringan hepar yang terjadi ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa mobilisasi *hematopoietic stem cells* (HSCs) berperan dalam proses regenerasi hepar pada hewan coba kerusakan hepar akut ataupun kronis.⁹ *Beta glucan* dari *S. cerevisiae* merupakan zat yang mampu meningkatkan pertumbuhan dan diferensiasi dari HSCs di *bone marrow* serta meningkatkan mobilisasi HSCs dari *bone marrow* menuju jaringan yang mengalami kerusakan.⁸ Selain itu, efek *immunomodulator* dan antioksidan yang dimiliki oleh *beta glucan* juga mampu mencegah kerusakan hepar lebih lanjut.¹¹

Pemberian *beta glucan* berpotensi memicu mobilisasi HSCs melalui stimulasi produksi *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF). G-CSF dapat diproduksi oleh makrofag yang teraktivasi.²¹ Dectin-1

diketahui merupakan reseptor utama *beta glucan* yang banyak diekspresikan oleh makrofag.²²

HSCs mengekspresikan reseptor seluler CXCR4 yang merupakan ligan alami dari *stromal derived factor-1* (SDF-1). *Beta glucan* menurunkan ekspresi *chemokine receptor* (CXCR4) dan ligannya (SDF-1) di *bone marrow* sehingga HSCs dari *bone marrow* dapat termobilisasi ke aliran darah.⁹ Pada kondisi kerusakan hepar, ekspresi SDF-1 di hepar akan meningkat, hal ini mengakibatkan HSCs yang berada di darah akan mengalami mekanisme *homing* ke hepar. HSCs mampu melakukan transdiferensiasi menjadi hepatosit dengan dugaan mekanisme fusi sel, namun hal tersebut hanya dapat terjadi dalam jumlah dan waktu yang terbatas. Kontribusi HSC dalam perbaikan hepar diketahui lebih signifikan dalam memperbaiki populasi sel non parenkimal. Sel endotel sinusoid diduga berasal dari sel-sel *bone marrow*. Sel-sel yang berasal dari *bone marrow* (salah satunya adalah HSCs) berpartisipasi dalam pembentukan pembuluh darah baru (*vasculogenesis*) di daerah iskemik, hal tersebut mungkin memiliki manfaat lebih dalam regenerasi hepatosit dan resolusi fibrosis.²³ Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian ini, dimana pemberian ekstrak *beta glucan* tidak hanya memperbaiki kondisi sel hepar saja, namun juga memperbaiki kondisi sinusoid hepar secara histopatologi.

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data yang telah dilakukan menunjukkan bahwa terdapat perbaikan jaringan hepar yang signifikan secara histopatologi pada ketiga kelompok perlakuan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, akan tetapi dosis paling efektif belum bisa ditentukan karena perbedaan antara 3 kelompok perlakuan yang mendapat terapi belum bisa diamati

dengan jelas walaupun infiltrasi sel MN tampak lebih berkurang sesuai dengan peningkatan dosis.

Penelitian ini masih memiliki keterbatasan di antaranya belum diketahui secara pasti dosis pemberian ekstrak *beta glucan* dari *S. cerevisiae* yang paling efektif karena perbedaan yang ada tidak begitu signifikan antar kelompok perlakuan. Selain itu, belum dilakukan penilaian fibrosis dengan *staging fibrosis*. Pewarnaan HE tidak dapat secara pasti menunjukkan adanya akumulasi kolagen sebagai pertanda fibrosis pada jaringan hepar. Oleh karena itu, perlu adanya penelitian lebih lanjut dengan metode pemeriksaan yang lebih bisa menilai dengan pasti banyaknya akumulasi kolagen dengan pengecatan *Masson's Trichrome*. Uji lanjutan tentang farmakokinetik, farmakodinamik, toksisitas, efek samping, dan efek *beta glucan* dari *S. cerevisiae* pada hewan coba dan uji klinis pada manusia juga perlu dilakukan, agar nantinya ekstrak *beta glucan* dari *S. cerevisiae* dapat digunakan dalam pengobatan dalam kerusakan hepar akut maupun kronis, sehingga dapat mengurangi angka morbiditas dan mortalitas akibat penyakit liver.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak *beta glucan* dari *Saccharomyces cerevisiae* secara oral mampu memperbaiki gambaran histopatologi jaringan hepar secara signifikan pada mencit model fibrosis hepar dibanding kelompok kontrol positif, sehingga *beta glucan* dari *Saccharomyces cerevisiae* memiliki potensi sebagai metode pengobatan yang efektif dalam proses regenerasi hepar yang mengalami fibrosis.

SARAN

1. Perlu dilakukan pemeriksaan kuantitatif terhadap hasil ekstrak *S. cerevisiae* agar diketahui jumlah pasti *beta glucan* di dalamnya.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis paling efektif dari ekstrak *beta glucan* dari *Saccharomyces cerevisiae* dalam memperbaiki kerusakan hepar.
3. Perlu dilakukan penelitian dengan metode pemeriksaan yang spesifik untuk melihat jaringan fibrosis (seperti pewarnaan *Masson's Trichrome*) dan dilakukan *staging fibrosis*.
4. Perlu adanya penelitian lebih lanjut secara *in vivo* pada hewan coba dan *clinical trial* pada manusia untuk menguji profil farmakokinetik, farmakodinamik, toksisitas, dan efek samping ekstrak *beta glucan* dari *Saccharomyces cerevisiae*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bataller R., David A.B. Liver Fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005; 115(2): 209-218.
2. Lim Young-Suk dan Kim W. R.. The Global Impact of Hepatic Fibrosis and End-Stage Liver Disease. *Clin Liver Dis*. 2008; 12(4): 733-746.
3. Poynard T., Pascal L., Patrick I., Anne V., Brigitte V., Yen Ngo, *et al*. Prevalence of liver fibrosis and risk factors in a general population using non-invasive biomarkers (FibroTest). *Biomed Central Gastroenterology*. 2010; 10(4).
4. Ismail MH dan Massimo P. Reversal of Liver Fibrosis. *Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association*. 2009; 15(1): 72-79. doi 10.4103/1319-3767.45072.
5. Fausto N., Campbell J.S., Riehle K.J. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006; 43: S45–S53.
6. Tsolaki E. Athanasiou E., Gounari E., Zogas N., Siotou E., Yiangou M., *et al*. 2014. Hematopoietic stem cells and liver regeneration: Differentially acting hematopoietic stem cell mobilization agents reverse induced chronic liver injury. *Blood Cells, Molecules and Diseases*. 2014; 53: 124–132.
7. Mason R.. 2004. *What is Beta glucan A Concise Guide to the Benefits and Uses of the Most Powerful Natural Immune Enhancer Known to Science*. 561 Shunpike, USA.
8. Franzke A. The role of G-CSF in adaptive immunity. *Cytokine Growth Factor*. 2006; 17: 235–44.
9. Ito K, Masuda Y, Yamasaki Y, Yokota Y, Nanba H. Maitake beta-Glucan Enhances Granulopoiesis and Mobilization of Granulocytes by Increasing G-CSF Production and Modulating CXCR4/SDF-1 Expression. *Kobe: International Immunopharmacology*. 2009; 9(10): 1189–1196.
10. Pelizon A.C., R. Kaneno, A.M.V.C. Soares, D.A. Meira, A. Sartori. Immunomodulatory Activities Associated with β -Glucan Derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiological Research*. 2005; 54: 557-564.
11. Akramiene D., Kondrotas A., Didziapetriene J., Kevelaitis E. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina*. 2007; 43(8): 597-606.
12. Fan X, Zhang Q, Li S, Lv Y, Su H, *et al*. Attenuation of CCl4-Induced Hepatic Fibrosis in Mice by Vaccinating against TGF- β 1. *PLoS ONE*. 2013; 8(12): e82190.

13. Hunter K. W., R.A Gault, M.D. Berner. Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Letters in Applied Microbiology*. 2002; 35(4): 267-71.
14. Cramer D., Wagner, Stephanie, Li, Bing et al. 2008. *Mobilization of Hematopoietic Progenitor Cells by Yeast-Derived Beta-Glucan Requires Activation of Matrix Metalloproteinase-9*. NCBI.
15. Kumar V., Abbas A. K., Aster J. C. 2013. *Robbins Basic Pathology, 9th Ed*. Canada: Elsevier.
16. Domitrović R., Hrvoje J., Jelena T., Ivana Š. Liver Fibrosis in Mice Induced by Carbontetrachloride and Its Reversion by Luteolin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009; 24(1): 311–321.
17. Fujii T, Fuch BC, Yamada S, Lauwers GY, Kulu Y, Goodwin JM, et al., Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor. *BMC Gastroenterol*. 2010 Jul; 10: 79.
18. Sandvik A., Wang Y.Y., Morton H.C., Aasen A.O., Wang J.E., Johansen F.E. Oral and systemic administration of β -glucan protects against lipopolysaccharide-induced shock and organ injury in rats. *Clin Exp Immunol*. 2007; 148(1): 168 – 177.
19. European Food Safety Authority (EFSA). *Scientific Opinion on the safety of 'yeast beta-glucans' as a Novel Food Ingredient*. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). *EFSA Journal*. 2011; 9(5):2137.
20. Starkel, P. dan Leclercq, I.A. Animal Models for The Study of Hepatic Fibrosis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2011; 25: 319-333.
21. Elgert K. D. 2009. *Immunology: Understanding The Immune System*. United States of America: Blackwell Scientific Publication..
22. Taylor P. R., Gordon D. B., Delyth M. R., Janet A. W., Luisa Martinez-Pomarez, et al. The β -glucan Receptor, Dectin-1, Is Predominantly Expressed on the Surface of Cells of the Monocyte/Macrophage and Neutrophil Lineages. *The Journal of Immunology*. 2002; 169(7): 3876 – 3882.
23. Kallis Y. N., M. R. Alison, S. J. Forbes. Bone Marrow Stem Cells and Liver Disease. *Gut*. 2007; 56: 716 – 724.

Pembimbing,

Prof. Dr. dr. Edi Widajanto, MS, SpPK (K)
NIP. 19500427 198002 1 001