

**EFEK PREVENTIF PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL  
DAUN JAMBU METE (*Anacardium occidentale*)  
TERHADAP PRODUKSI IL-6 DAN  
KADAR SOD PADA MENCIT  
MODEL FIBROSIS HATI  
YANG DIINDUKSI  
CCl<sub>4</sub>**

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**MARIANA RUTH THERESIA HUTABARAT**

**125130100111025**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2016**

**EFEK PREVENTIF PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL  
DAUN JAMBU METE (*Anacardium occidentale*)  
TERHADAP PRODUKSI IL-6 DAN  
KADAR SOD PADA MENCIT  
MODEL FIBROSIS HATI  
YANG DIINDUKSI  
CCl<sub>4</sub>**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

**MARIANA RUTH THERESIA HUTABARAT**  
**125130100111025**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2016**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

### EFEK PREVENTIF PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN JAMBU METE (*Anacardium occidentale*) TERHADAP PRODUKSI IL-6 DAN KADAR SOD PADA MENCIT MODEL FIBROSIS HATI YANG DIINDUKSI CCl<sub>4</sub>

Oleh :

**MARIANA RUTH THERESIA HUTABARAT**

**125130100111025**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji

Pada tanggal 18 Agustus 2016

Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dr. drh. Djoko Winarso, MS**

NIP. 19530605 198403 1 001

**Dr. Sri Murwani, drh., MP**

NIP. 19630101 198903 2 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**

NIP. 19600903 198802 2 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Mariana Ruth Theresia Hutabarat

NIM : 125130100111025

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

**Efek Preventif Pemberian Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale*) terhadap Produksi IL-6 dan Kadar SOD pada Mencit Model Fibrosis Hati yang Diinduksi CCl<sub>4</sub>**

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 tercantum 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, 18 Agustus 2016  
Yang Menyatakan,

**MARIANA RUTH T. H.**  
NIM. 125130100111025

**Efek Preventif Pemberian Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale*) terhadap Produksi IL-6 dan Kadar SOD pada Mencit Model Fibrosis Hati yang Diinduksi CCl<sub>4</sub>**

**ABSTRAK**

Fibrosis hati merupakan akumulasi berlebih matriks ekstraseluler. Prevalensi fibrosis hati hewan kecil dilaporkan mencapai 10% dari keseluruhan penyakit sistemik hewan kecil di Amerika Serikat. Salah satu bahan toksik yang menimbulkan fibrosis hati adalah *carbon tetrachloride* (CCl<sub>4</sub>). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh preventif ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) terhadap produksi Interleukin-6 (IL-6) dan kadar *superoxide dismutase* (SOD). Daun jambu mete mengandung bahan aktif flavonoid yang memiliki efek antiinflamasi dan antioksidan. Penelitian ini merupakan studi eksperimental, *post-test control only design* dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Hewan coba mencit (*Mus musculus*) dibagi dalam 5 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, kelompok preventif dengan dosis 500 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB, dan 1500 mg/kg BB. Produksi sitokin IL-6 dihitung menggunakan metode *flowcytometry*, sedangkan kadar SOD diukur menggunakan spektrofotometri. Data hasil uji dianalisa secara statistik *one way ANOVA* ( $\alpha=0,05$ ) dengan uji lanjutan *Post Hoc Tukey*. Simpulan dari penelitian ini yaitu preventif menggunakan ekstrak etanol daun jambu mete mencegah peningkatan produksi IL-6 dan meningkatkan kadar SOD pada mencit model fibrosis hati. Prosentase produksi IL-6 pada kelompok perlakuan dosis 1500 mg/kg BB sebesar 2,58%. Kadar SOD pada kelompok perlakuan dosis 1500 mg/kg BB sebesar 4,23%.

**Kata kunci :** *Carbon tetrachloride, daun jambu mete, fibrosis hati, IL-6, SOD.*

**Preventive Effects of Ethanol Extracts Cashew (*Anacardium occidentale*)  
Leaves Against The Production of IL-6 and SOD Levels in  
Mice Liver Fibrosis Model Induced by CCl<sub>4</sub>**

**ABSTRACT**

Liver fibrosis is the excessive accumulation of extracellular matrix. The prevalence of liver fibrosis in small animal was reported by 10% of all systemic diseases occurred in the United States. One of the toxic materials that cause liver fibrosis is carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>). This study aims to determine the preventive effect of ethanol extract of leaves of cashew (*Anacardium occidentale*) against the production of Interleukin-6 (IL-6) and increase the levels of superoxide dismutase (SOD). Leaves cashew contain of flavonoids which have anti-inflammatory and antioxidant effects. This research is an experimental study, post-test control only design using a completely randomized design. Mice (*Mus musculus*) were divided into 5 groups, namely the negative control group, positive control group, preventive group dose of 500 mg/kg BW, 1000 mg/kg BW, and 1500 mg/kg BW. Interleukin-6 production is calculated using flowcytometry, while SOD was measured using spectrophotometer. Data were statistically analyzed within one way ANOVA ( $\alpha=0.05$ ) with advanced test Post Hoc Tukey. Conclusions from this research that the preventive use of ethanol extract of leaves of cashew to prevent an increase of IL-6 production and increasing the levels of SOD in mice models of liver fibrosis. Production of IL-6 in group of 1500 mg/kg BW is 2.58%. SOD levels in group of 1500 mg/kg BW is 4.23%.

**Kata kunci :** *Carbon tetrachloride, cashew leaves, IL-6, liver fibrosis, SOD.*

## KATA PENGANTAR

Puji dan rasa syukur yang tak terhingga atas segala berkat penyertaan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Efek Preventif Pemberian Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale*) terhadap Produksi IL-6 dan Kadar SOD pada Mencit Model Fibrosis Hati yang Diinduksi CCl<sub>4</sub>**”. Tak lupa penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah mendukung penyusunan skripsi sehingga dapat berjalan dengan baik:

1. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES., untuk bimbingan dan arahan serta penjaminan fasilitas baik selama masa perkuliahan maupun selama proses penyusunan skripsi.
2. Dr. drh. Djoko Winarso, MS. dan Dr. Sri Murwani, drh., MP. selaku dosen pembimbing yang senantiasa meluangkan waktu, memberikan bimbingan, ilmu, fasilitas, kesabaran dan motivasi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi.
3. drh. I Dewa Putu Anom, M.Vet dan drh. Indah Amalia Amri, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan bimbingan dan saran kepada penulis dalam penyempurnaan skripsi ini.
4. Orang tua tercinta, bapak Ir. Herry Hutabarat, ibu Ninik Sriwijayati Sitompul, SKM., abang Yakob Ryanbraya Hutabarat dan kakak Pascally K. Andhini yang telah banyak memberikan motivasi, saran dan teladan kepada penulis.
5. Tim penelitian MEFORSIS, Istimrorul Inshiroh, Visti Ajeng Naval, Sandra Rini dan Prayoga Dwi Satriya yang telah berjuang bersama dan berbagi suka duka dalam proses penyelesaian penelitian. Dan teristimewa kepada mentor senior, Natiq Humayroh yang banyak memberikan tuntunan kepada penulis.
6. Manis Manja Group: Dinda Ayu, Faradila, Isnainoora, Beta Lalvina, Fibri Rahma, Legar Reza, Andrianus John, Ismi Alfian, Faris. Sahabat Eight For Vet: Getty, Bona, Marina, Mita, Paisal, Hasbi, Sulthon. Sahabat ORREA: Olivia, Rizka, Eki, Agung, yang turut berjuang bersama mencapai sukses.

Terlebih kepada Febby Dewayanti yang tidak berputus asa bahkan disaat-saat tersulit.

7. Terima kasih disampaikan kepada Andreas Malino yang turut berbagi cerita baik suka maupun duka selama masa perkuliahan di Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya.
8. Teman-teman 2012 B “*Class Be The Best*” yang selalu memberikan semangat, keceriaan, dan inspirasi yang luar biasa bagi penulis selama menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan.
9. Seluruh kolega Fakultas Kedokteran Hewan dan pihak yang telah memberikan bantuan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan lancar.

Akhir kata, penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat serta menambah pengetahuan bagi seluruh civitas akademika khususnya kolega kedokteran hewan.

Malang, 18 Agustus 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	x
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xi
<b>DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG</b> .....	xii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan Penelitian .....	4
1.5 Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
2.1 Fibrosis Hati .....	5
2.1.1 Etiologi .....	5
2.1.2 Fibrosis Hati karena Induksi <i>Carbon Tetrachloride</i> .....	7
2.1.2.1 Patogenesis .....	8
2.1.2.2 Respon Sistem Imun terhadap Fibrosis Hati .....	14
2.1.2.3 Gejala Klinis .....	17
2.1.2.4 Patologi Anatomi .....	18
2.1.2.5 Histopatologi .....	19
2.1.2.6 Diagnosa .....	20
2.2 Sitokin Interleukin 6 (IL-6) .....	22
2.3 Antioksidan Endogen <i>Superoxide Dismutase (SOD)</i> .....	23
2.4 Tanaman Jambu Mete ( <i>Anacardium occidentale</i> ) .....	25
2.4.1 Bahan Aktif Daun Jambu Mete ( <i>Anacardium occidentale</i> ) ...	27
2.5 Hewan Coba Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	28
<b>BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> .....	30
3.1 Kerangka Konseptual .....	30
3.2 Hipotesis Penelitian .....	33
<b>BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	34
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	34
4.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	34
4.3 Sampel Penelitian .....	35
4.4 Rancangan Penelitian .....	36
4.5 Variabel Penelitian .....	36
4.6 Tahapan Penelitian .....	37
4.6.1 Persiapan Hewan Coba .....	37



4.6.2	Prosedur Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete ( <i>Anacardium occidentale</i> ).....	37
4.6.3	Induksi Terapi Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete ( <i>Anacardium occidentale</i> ).....	38
4.6.4	Pembuatan Hewan Coba Model Fibrosis Hati dan Terapi Pencegahan Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete ( <i>Anacardium occidentale</i> ) .....	38
4.6.5	Pengukuran Produksi Interleukin 6 (IL-6) .....	38
4.6.5.1	Preparasi Sampel .....	38
4.6.5.2	Pengukuran Produksi IL-6 dengan Metode <i>Flowcytometry</i> .....	39
4.6.6	Pengukuran Kadar SOD .....	40
4.6.6.1	Preparasi Sampel .....	40
4.6.6.2	Pengukuran Kadar SOD Menggunakan Spektrofotometer .....	40
4.6.7	Analisis Data .....	40
<b>BAB 5.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	42
5.1	Mencit Fibrosis Hati Hasil Induksi <i>Carbon Tetrachloride</i> (CCl <sub>4</sub> ) ...	42
5.2	Efek Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete ( <i>Anacardium occidentale</i> ) Terhadap Penurunan Produksi Interleukin 6 (IL-6).....	44
5.3	Efek Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete ( <i>Anacardium occidentale</i> ) Terhadap Peningkatan Kadar SOD .....	50
<b>BAB 6.</b>	<b>PENUTUP</b> .....	55
6.1	Kesimpulan .....	55
6.2	Saran .....	55
	<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	56
	<b>LAMPIRAN</b> .....	61

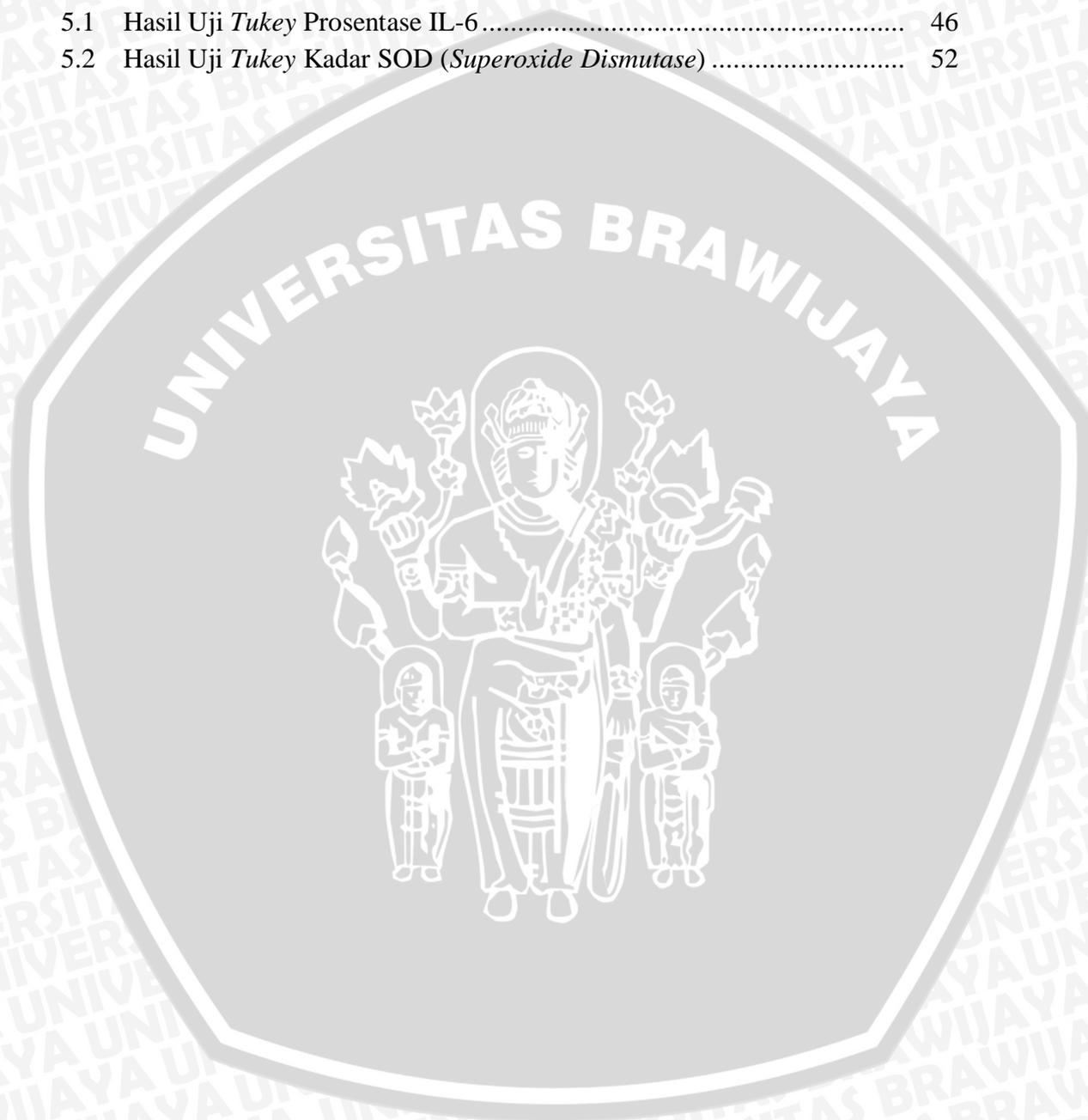
## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Perubahan arsitektur hati yang disebabkan oleh fibrosis hati .....	10
2.2 Cedera pada sel hepatosit dan sel kupffer mengaktivasi HSC .....	16
2.3 Hati mencit normal dan fibrosis hati pada mencit hasil induksi CCl <sub>4</sub> ....	18
2.4 Gambaran histologi hati normal dengan pewarnaan HE .....	19
2.5 Histopatologi fibrosis hati dengan pewarnaan <i>trichrome stain</i> .....	20
2.6 Bagian pohon jambu mete: daun, buah dan bunga .....	26
3.1 Kerangka konseptual .....	30
5.1 Preparat Kontrol Negatif .....	43
5.2 Preparat Kontrol Positif .....	43
5.3 Grafik Prosentase Jumlah Sel Granulosit yang Memproduksi IL-6 .....	45
5.4 Grafik Kadar SOD ( <i>Superoxide Dismutase</i> ) .....	51



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1 Hasil Uji <i>Tukey</i> Prosentase IL-6 .....	46
5.2 Hasil Uji <i>Tukey</i> Kadar SOD ( <i>Superoxide Dismutase</i> ) .....	52

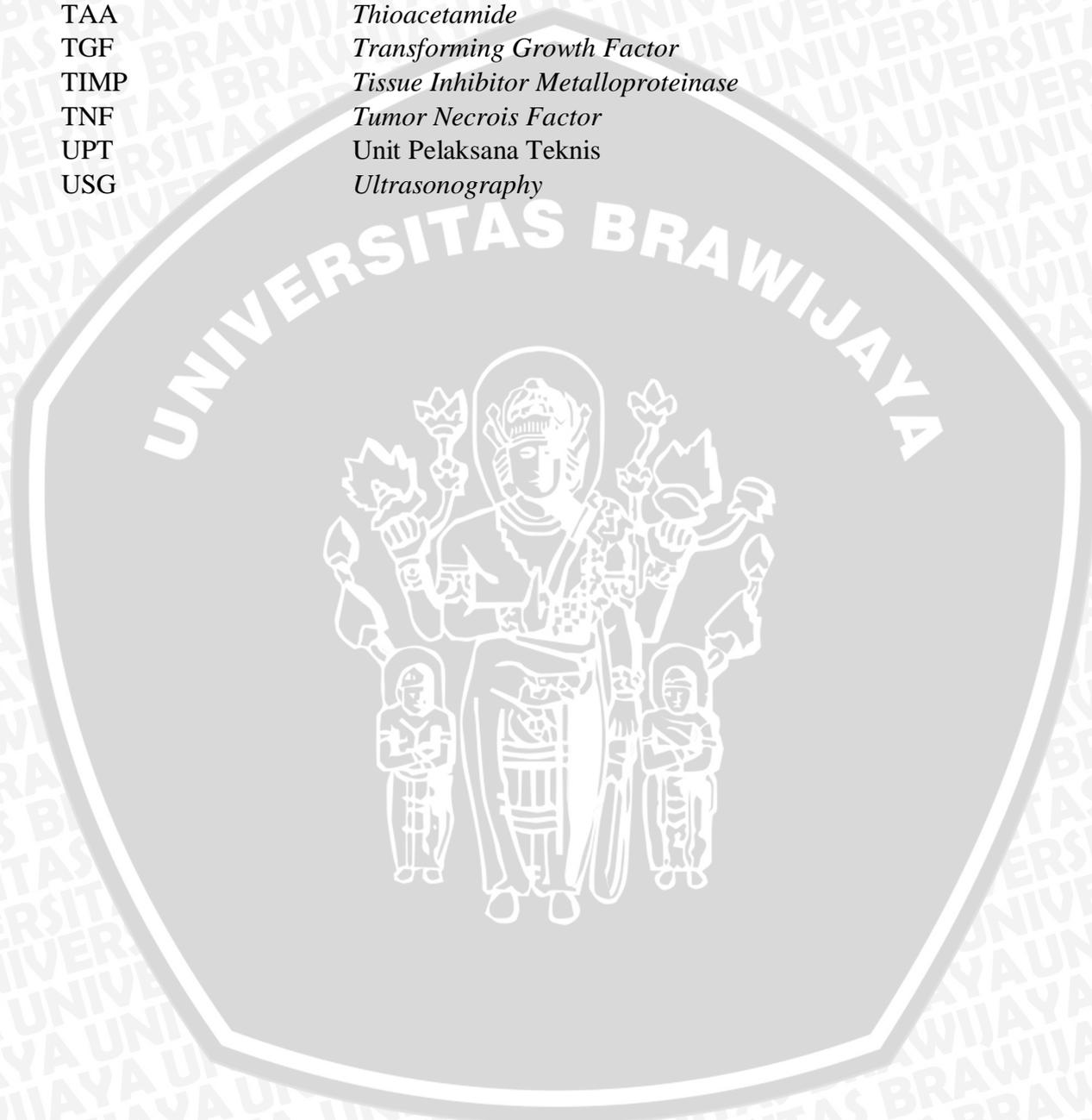


## DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

Simbol/Singkatan	Keterangan
ANOVA	<i>Analisis of Variant</i>
ALT	<i>Alanine Transaminase</i>
APP	<i>Acute-phase Protein</i>
BB	Berat Badan
C	Celcius
CCl <sub>4</sub>	<i>Carbon Tetracholride</i>
CD	<i>Cluster of Differential</i>
CI	<i>Confidence Interval</i>
cm	Centimeter
Co	Copper
CT scan	<i>Computerized Tomography Scan</i>
DMN	<i>Dimethylnitrosamine</i>
ECM	<i>Extra Cellular Matrix</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FITC	<i>Fluorescence Isothiocyanat</i>
g	Gram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>Hygrogen Peroxide</i>
HE	<i>Hematoxylin-eosin</i>
HSC	<i>Hepatic Stallete Cell</i>
ICH	<i>Infectious Canine Hepatities</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
kg	Kilogram
m	Meter
ml	Mililiter
mm	Milimeter
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	<i>Superoxide</i>
PAMPs	<i>Pathogen-assosiated Molecule Pattern</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
ROS	<i>Reactive Osygen Species</i>
rpm	<i>Revolutions per Minute</i>
SOD	<i>Superoxide Dismutase</i>

SGOT  
SGPT  
*sp.*  
SPSS  
TAA  
TGF  
TIMP  
TNF  
UPT  
USG

*Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase*  
*Serum Glutamic Piruvic Transaminase*  
*species*  
*Statistical Product of Service Solution*  
*Thioacetamide*  
*Transforming Growth Factor*  
*Tissue Inhibitor Metalloproteinase*  
*Tumor Necrosis Factor*  
Unit Pelaksana Teknis  
*Ultrasonography*



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Hati merupakan pusat dari metabolisme tubuh yang berperan dalam proses detoksifikasi, metabolisme senyawa endogen, serta sekresi empedu (Pearce, 2012). Fibrosis hati terjadi sebagai akibat dari kerusakan hati kronik, penyakit ini ditandai dengan akumulasi *extracellular matrix* (ECM). Akumulasi ECM mendistorsi struktur hati dengan membentuk jaringan ikat yang menyebabkan disfungsi hepatoseluler dan peningkatan tekanan *intrahepatic* sehingga menyebabkan hipertensi *portal hepatica* dan gagal hati (Lestari, 2008).

Fibrosis hati yang disebabkan oleh penyakit hati kronik, secara signifikan akan berdampak pada peningkatan radikal bebas. Hal ini ditandai dengan peningkatan kadar *reactive oxygen species* (ROS) dan produksi sel proinflamasi, salah satunya ialah IL-6. Peningkatan ROS mengakibatkan peningkatan sintesis antioksidan endogen yakni *superoxide dismutase* (SOD) (Liedtke *et al.*, 2013).

Menurut Williams (2005), prevalensi dari penyakit hati pada hewan kecil termasuk fibrosis hati mencapai 10% dari keseluruhan kejadian penyakit sistemik pada hewan kecil di Amerika Serikat. Fibrosis hati jarang terjadi pada kucing, sebaliknya tingkat kejadian fibrosis hati lebih tinggi pada anjing. Meskipun fibrosis hati termasuk dalam kategori penyakit yang umum terjadi pada hewan kecil, terapi efektif untuk penyakit tersebut masih dalam pencarian. Sejauh ini terapi yang diberikan pada hewan kecil merupakan derivat dari senyawa terapi

yang diberikan kepada manusia hal ini disebabkan karena kurangnya pengetahuan spesifik mengenai penyakit hati pada hewan kecil (Ijzer, 2008).

Macam-macam tanaman obat di Indonesia yang digunakan sebagai alternatif obat sudah banyak. Salah satu contoh tanaman obat di Indonesia yang sudah lama digunakan adalah jambu mete (*Anacardium occidentale*). Daun jambu mete mengandung bahan aktif flavonoid yang diketahui memiliki efek anti-inflamasi dan antioksidan (Pawar *et al.*, 2000).

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui manfaat ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) sebagai preventif fibrosis hati. Uji efek ekstrak daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) perlu dilakukan untuk membuktikan efek anti-inflamasi dalam mencegah peningkatan produksi IL-6 dan efek antioksidan terhadap peningkatan kadar *superoxide dismutase* (SOD) pada mencit yang diinduksi dengan *Carbon Tetrachloride* (CCl<sub>4</sub>).

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah yang didapat adalah:

- 1) Apakah ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) dapat mencegah peningkatan produksi IL-6 pada mencit (*Mus musculus*) model fibrosis hati yang diinduksi CCl<sub>4</sub>?
- 2) Apakah ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) dapat meningkatkan kadar *superoxide dismutase* (SOD) pada mencit (*Mus musculus*) model fibrosis hati yang diinduksi CCl<sub>4</sub>?

### 1.3 Batasan masalah

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

- 1) Hewan model yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan galur BALB/c umur delapan sampai sembilan minggu dengan berat badan antara 20–25 g (Liedtke *et al.*, 2013) diperoleh dari Laboratorium Farmakologi, Universitas Brawijaya. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No:513-KEP-UB (Lampiran 1).
- 2) Larutan CCl<sub>4</sub> diencerkan menggunakan minyak jagung dengan perbandingan 1:1 (Liedtke *et al.*, 2013), diperoleh dari Laboratorium Farmakologi, Universitas Brawijaya.
- 3) Induksi fibrosis hati pada mencit dilakukan dengan injeksi CCl<sub>4</sub> melalui intraperitoneal. Dosis yang digunakan adalah 2 ml/kg BB dan diberikan selama 12 hari (Achmad, 2012).
- 4) Ekstraksi daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) dilakukan di Laboratorium UPT Materia Medika, Kota Batu dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% (Thangavel *et al.*, 2011) (Lampiran 2).
- 5) Dosis ekstrak daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) yaitu 500 mg/kg BB (dosis 1), 1000 mg/kg BB (dosis 2) dan 1500 mg/kg BB (dosis 3), diinduksikan secara peroral. Penentuan dosis ekstrak etanol daun jambu mete dengan modifikasi berdasarkan pada penelitian Landim *et al.* (2009) (Lampiran 4).

- 6) Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah jumlah produksi IL-6 yang dihasilkan oleh Gr1 (marker sel granulosit) menggunakan metode *flowcytometry* (Hirano *et al.*, 2004)
- 7) Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah nilai absorbansi dari enzim *superoxide dismutase* (SOD) menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang maksimal yakni 580nm (Suprayogi, 2013).

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah :

- 1) Mengetahui efek ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) dalam mencegah peningkatan produksi IL-6 pada mencit (*Mus musculus*) model fibrosis hati yang diinduksi CCl<sub>4</sub>.
- 2) Mengetahui efek ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) berdasarkan peningkatan kadar *superoxide dismutase* (SOD) pada mencit (*Mus musculus*) model fibrosis hati yang diinduksi CCl<sub>4</sub>.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat sebagai bahan informasi penelitian selanjutnya mengenai efek ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) sebagai pencegahan fibrosis hati yang diaplikasikan pada *pet animal*.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Fibrosis Hati

Fibrosis hati merupakan akumulasi berlebihan matriks ekstraseluler (ECM) yang terjadi akibat respon terhadap penyakit hati yang bersifat kronis. Kegagalan hati dalam mengeluarkan antigen berbahaya seperti virus, zat toksik dan agen lainnya akan menyebabkan inflamasi kronik disertai dengan infiltrasi leukosit. Akumulasi protein ECM mendistorsi struktur hati dengan membentuk jaringan ikat yang selanjutnya berkembang menjadi sirosis. Fibrosis menyebabkan disfungsi hepatoseluler dan tekanan *intrahepatic* meningkat sehingga menyebabkan hipertensi *portal hepatica* dan gagal hati (Bataller and Brenner, 2005).

#### 2.1.1 Etiologi

Fibrosis hati terjadi sebagai respon terhadap penyakit hati kronis, yang menyebabkan akumulasi komponen ECM dan berdampak pada perubahan susunan jaringan hati serta disfungsi sel hati. Inflamasi merupakan tanda klinis yang tampak sebagai respon terhadap penyakit hati kronis (Rockey, 2006). Penyakit hati kronis dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti virus, bakteri, parasit, fungi dan juga obat-obatan. Pengaruh dari agen penyebab penyakit hati kronis bergantung pada imunitas setiap spesies. Terdapat beberapa spesies anjing yang peka terhadap paparan dari agen penyebab seperti *Doberman pinchers*, *Labrador retriever* dan *Bedlington terriers* (Ijzer, 2008).

**a) Virus.** Infeksi virus sering dicurigai sebagai penyebab fibrosis hati pada anjing. Agen infeksius yang telah diidentifikasi menyebabkan penyakit hati pada hewan kecil antara lain *canine adenovirus-1*; penyebab *infectious canine hepatitis* (ICH), *rubarth virus*, dan *herpesvirus*; penyebab *feline infectious peritonitis* (Rothuizen, 2006).

**b) Bakteri.** Bakteri yang diduga dapat menyebabkan fibrosis hati antara lain *Clostridium piliformis* dan *Bacillus piliformis*; penyebab penyakit Tyzzer, *Leptospira sp.*, *Helicobacter canis*. Infeksi oleh bakteri yang terjadi secara terus menerus dapat menyebabkan *septicemia* yang berdampak pada timbulnya gangguan fungsi hati (Rothuizen, 2006).

**c) Parasit.** Infeksi oleh protozoa dari spesies *Toxoplasma gondii*, *Neospora*, *Leishmania chagasi* diduga berpengaruh terhadap fungsi hati secara keseluruhan (Ijzer, 2008).

**d) Fungi.** Fungi spesies *Histoplasma capsulatum* dapat menyebabkan penyakit hati kronis pada anjing. Beberapa agen beracun juga dapat menyebabkan penyakit hati, seperti racun yang disintesis oleh spesies *Amanitum sp.* dan ganggang hijau biru (*Cyanophyceae*) (Rothuizen, 2006).

**e) Obat-obatan dan Senyawa Toksik.** Reaksi obat tertentu yang digunakan sebagai obat terapi dapat menimbulkan nekrosis hati berat, misalnya *benzodiazepine*, *acetaminophen*, *sulfonamide trimetoprim*, *karprofen* dan *amiodaron*. *Carbon tetrachloride* (CCl<sub>4</sub>) merupakan senyawa toksik lain yang dapat menyebabkan fibrosis hati. Toksisitas CCl<sub>4</sub> menimbulkan radikal bebas yang berbahaya bagi hati dan menyebabkan kegagalan fungsi hati (Haki, 2009).

### 2.1.2 Fibrosis Hati karena Induksi *Carbon Tetrachloride* ( $\text{CCl}_4$ )

*Carbon tetrachloride* banyak digunakan sebagai pelarut dalam proses industri. *Carbon tetrachloride* merusak hampir semua sel tubuh, termasuk sistem saraf pusat, hati, ginjal, dan pembuluh darah. Tanda dan gejala kerusakan hati oleh  $\text{CCl}_4$  kemungkinan terlihat setelah beberapa jam sampai tiga hari (Goodman, 2001). Toksisitas  $\text{CCl}_4$  tidak disebabkan oleh molekul  $\text{CCl}_4$  itu sendiri, tetapi pada konversi molekul  $\text{CCl}_4$  menjadi radikal bebas  $\text{CCl}_3^\cdot$  oleh sitokrom  $\text{P}_{450}$ . Radikal bebas  $\text{CCl}_3^\cdot$  akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal triklorometil peroksida ( $\text{CCl}_3\text{O}_2^\cdot$ ) yang sangat reaktif. Radikal bebas ini akan bereaksi dengan asam lemak tak jenuh ganda yang merupakan komponen penting dari membran sel yang bila terserang radikal bebas akan menghasilkan peroksidasi lipid yang selanjutnya akan mengubah struktur dan fungsi membran sel. Permeabilitas membran sel akan meningkat yang selanjutnya diikuti oleh influks massif kalsium dan kematian sel (Haki, 2009).

Studi mengenai hewan model fibrosis hati telah dilakukan oleh Liedtke *et al.* (2013) menggunakan mencit sebagai hewan coba dan diinduksi oleh  $\text{CCl}_4$ , *thioacetamide* (TAA) serta *dimethylnitrosamine* (DMN). Berdasarkan ketiga senyawa toksik tersebut,  $\text{CCl}_4$  lebih unggul dibandingkan dengan dua senyawa lainnya. *Carbon tetrachloride* tidak bersifat mutagenik ataupun karsinogenik, menimbulkan efek fibrosis cepat dan efektif. *Carbon tetrachloride* dapat menyebabkan kematian pada pemberian secara peroral karena berpengaruh langsung terhadap fungsi organ pencernaan. Pemberian melalui intravena dapat menyebabkan kematian karena senyawa tersebut akan disirkulasikan secara

langsung keseluruhan bagian tubuh. Pemberian yang efektif ialah secara peritoneal, karena pembuluh darah yang berada pada rongga abdomen tidak begitu banyak sehingga zat toksik yang terkandung dalam  $\text{CCl}_4$  diserap secara perlahan oleh tubuh (Liedtke *et al.*, 2013).

Dosis  $\text{CCl}_4$  yang digunakan untuk menginduksi fibrosis hati adalah 2 ml/kg BB. Dosis ini didapatkan dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Achmad pada tahun 2012 dengan judul “Uji Bioaktivitas Losartan Terhadap Jaringan Fibrosis Hati Tikus yang Diinduksi Karbon Tetraklorida”. Dari penelitian tersebut didapatkan dosis efektif untuk menginduksi fibrosis hati adalah 2 ml/kg BB, dosis diberikan secara intraperitoneal yang diberikan sehari sekali selama 12 hari.

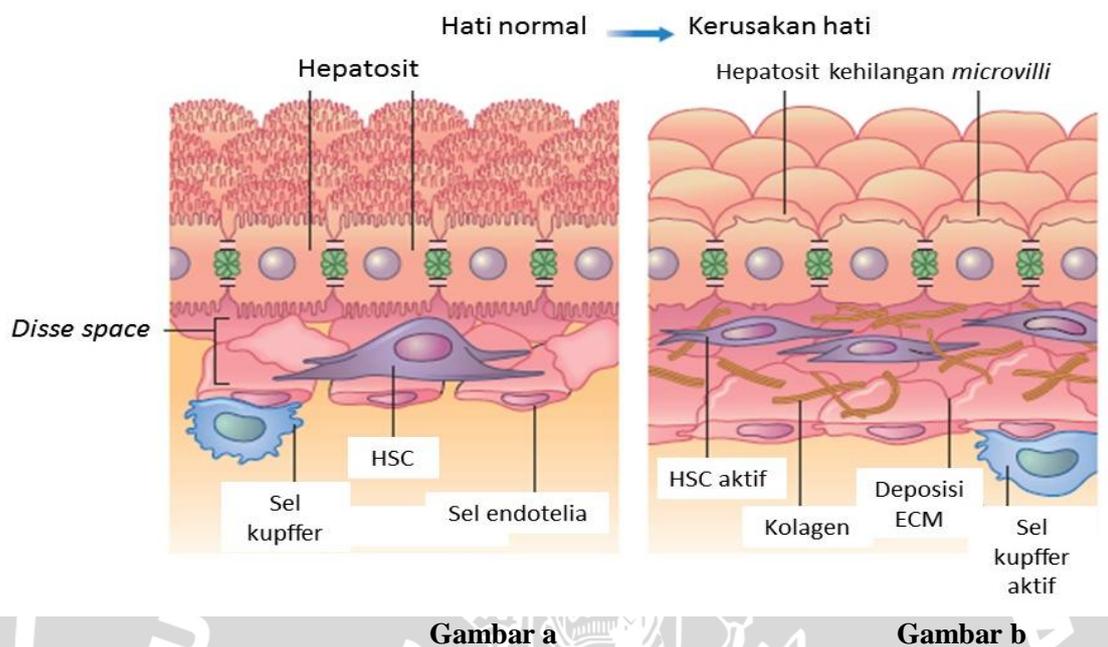
#### 2.1.2.1 Patogenesis

Patogenesis fibrosis hati merupakan proses yang sangat kompleks yang melibatkan *hepatic stellate cells* (HSC) sebagai sel utama, sel kupffer, leukosit, berbagai mediator seperti sitokin, *growth factors* dan *inhibitor*, serta beberapa jenis kolagen. Dalam keadaan hati normal, *disse space* pada *subendothelial* memisahkan jaringan epitel dengan endotelia sinusoidal. Jaringan epitel pada hati tersusun atas hepatosit dengan *microvilli* yang mengitari sel tersebut. Sel endotelial membatasi sinusoid-sinusoid pada hati dan memiliki *fenestra* yang memungkinkan terjadinya pertukaran zat antara hepatosit dan sel endotel. (Gambar 2.1, bagian a). Membran dasar hati tersusun atas kolagen *non-fibril-forming* yang terdiri dari kolagen tipe IV, VI, XIV, glikoprotein dan proteoglikan. Keadaan *extracellular matrix* (ECM) normal berfungsi dalam pemeliharaan sel-

sel hati diantaranya: hepatosit, HSC, endotelia sinusoidal, dan sel kupffer (Rockey, 2006).

Induksi  $\text{CCl}_4$  ke dalam tubuh mencit menyebabkan terjadinya reaksi inflamasi dan stres oksidatif yang selanjutnya akan mempengaruhi keadaan hati normal. Sebagai respon dari penyakit hati yang sedang berlangsung, terjadi peningkatan total kolagen dan komponen non kolagen pada ECM. Pada jaringan subendotelial terjadi perubahan komposisi dasar, dari membran dengan densitas rendah menjadi matriks interstisial. Perubahan ini menyebabkan hilangnya *microvilli* pada hepatosit dan hilangnya fenestra pada lapisan endotel (Gambar 2.1, bagian b). Peningkatan matriks interstisial pada lapisan subendotelial mengaktivasi HSC (Rockey, 2006).

Pada keadaan inaktif HSC merupakan tempat penyimpanan retinoid sehingga memiliki morfologi *cytoplasmic lipid droplets*. Pada keadaan aktif akibat terjadinya cedera hati, HSC akan kehilangan *lipid droplets*, berproliferasi dan kemudian bermigrasi ke zona 3 asinus lalu berubah menjadi sel miofibroblas yang memproduksi kolagen tipe I, III, IV dan laminin. HSC merangsang pembentukan ECM dan protein *matrix cellular* secara berlebihan. Komponen ECM terdiri dari kolagen, glikoprotein, dan protein glikan. Sebagai kelanjutan dari proses tersebut terjadi peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) dan mediator inflamasi seperti sitokin dan makrofag, *transforming growth factor*, dan *connective tissue growth factor*. Hasil dari aktivasi HSC berdampak pada perubahan pada ECM, baik jumlah maupun komposisi (Kanh, 2010).



**Gambar a** **Gambar b**  
**Gambar 2.1** Perubahan arsitektur hati yang disebabkan oleh fibrosis hati  
 (Sumber : Rockey, 2006)

Aktivitas sel miofibroblas distimulasi oleh endotelin-1 dan berdampak pada peningkatan resistensi vena portal dan densitas komposisi ECM. Traktus *fibrous* mengikat cabang aferen vena portal dan vena eferen hepatic yang melewati hepatosit sehingga suplai darah menjadi terbatas. Fibrosis berdampak pada iskemik hepatosit (menyebabkan disfungsi hepatoseluler) dan hipertensi portal. Iskemik dan hipertensi portal menentukan kelanjutan fungsi hati. Fibrosis hati yang bersifat konginetal mempengaruhi cabang vena portal, sebagai akibatnya maka terjadi hipertensi portal dengan keterbatasan fungsi hepatoseluler (Kanh, 2010). Aktivasi HSC menimbulkan reaksi lanjutan yakni proses inisiasi, fase penetapan, fibrogenesis dan resolusi dari fibrosis hati (Rockey, 2006):

**a) Inisiasi**

Merupakan fase aktivasi HSC menjadi miofibroblas yang bersifat proliferasif, fibrogenik dan kontraktif. Terjadi induksi cepat terhadap gen HSC akibat rangsangan dari parakrin yang berasal dari sel-sel inflamasi, hepatosit yang rusak, sel-sel duktus biliaris serta perubahan awal komposisi ECM. Perubahan-perubahan tersebut menyebabkan HSC responsif terhadap berbagai sitokin dan stimulasi lokal lainnya. Pada fase inisiasi ini, setelah cedera pada sel hati, terjadi stimulasi parakrin terhadap HSC oleh sel-sel yang berdekatan dengan HSC seperti sel endotelial dan hepatosit serta sel kupffer, platelet dan leukosit yang menginfiltrasi lokal cedera hati. Stimulasi parakrin berupa:

1. Inflamasi akibat pelepasan berbagai sitokin seperti  $TNF-\alpha$ , IL-1, IL-6 pelepasan berbagai sitokin, faktor-faktor nekrosis dan  $IFN-\gamma$  yang dihasilkan oleh sel kupffer.
2. Oksidasi oleh ROS dan peroksida lipid yang dihasilkan oleh netrofil dan sel kupffer. Oksidan-oksidan tersebut meningkatkan sintesis kolagen oleh HSC.
3. Pelepasan dan aktivitas berbagai *growth factors* yang dihasilkan oleh sel kupffer yang teraktivasi oleh sel endotelial.
4. Pengeluaran proteinase.
5. Gangguan reseptor HSC yakni *peroxisome proliferator activated* reseptor yang terdapat pada reseptor HSC.

**b) Fase penetapan**

Terjadi respon selular akibat proses inisiasi. Pada fase ini terjadi berbagai reaksi yang menguatkan fenotip sel aktif melalui peningkatan ekspresi berbagai

faktor pertumbuhan dan responnya yang merupakan hasil rangsangan autokrin dan parakrin, serta akselerasi *remodelling* ECM. Fase ini sangat dinamis dan berkesinambungan.

Fase penetapan ini merupakan hasil stimulasi parakrin dan autokrin, meliputi tahap proliferasi, fibrogenesis, peningkatan kontraktilitas, pelepasan sitokin proinflamasi, kemotaksis, hilangnya retinoid dan degradasi matriks. Tahap akhir dari fase penetapan adalah degradasi matriks, yang diatur oleh keseimbangan antara *matrix metalloproteinase* (MMP) dan antagonisnya yaitu *tissue inhibitor metalloproteinase* (TIMP). Degradasi ECM terdiri dari degradasi yang menghancurkan kolagen berlebih, dan yang menyebabkan degradasi patologik adalah MMP-2 dan MMP-9 dimana kedua enzim ini merusak kolagen tipe IV, serta membran tipe *metalloproteinase* 1 dan 2 (aktivator MMP-2).

### c) **Fibrogenesis**

Pada tahap fibrogenesis TGF- $\beta$ 1 merupakan faktor yang berperan dalam pembentukan jaringan ikat, selain itu faktor yang turut berperan antara lain TNF, peroksidase lipid, *acetaldehyde*, dan beberapa sitokin lainnya seperti IL-13. Peran sitokin dalam mekanisme ini yakni peningkatan regulasi, aktivasi *fibroblast growth factor*, peningkatan reseptor sitokin dan peningkatan komponen *signaling* (Gressner *et al.*, 2002).

Pada jaringan hati normal terdapat ECM yang merupakan kompleks yang terdiri dari tiga group makromolekul yakni kolagen, glikoprotein dan proteoglikan. Makromolekul utama adalah group kolagen yang paling dikenal pada fibrosis hati, terdiri dari kolagen interstisial (kolagen tipe I dan III) yang

memiliki densitas tinggi dan kolagen membran basal (kolagen tipe IV) yang memiliki densitas rendah di dalam *disse space*. Kolagen dengan jumlah terbanyak pada jaringan hati normal ialah kolagen tipe IV. Pada fibrogenesis terjadi peningkatan jumlah ECM mencapai tiga sampai delapan kali lipat, dimana kolagen tipe I dan tipe III menggantikan kedudukan dari kolagen tipe IV.

Glikoprotein adhesif yang dominan adalah laminin yang membentuk membran basal dan fibronectin yang berperan dalam proses perlekatan, diferensiasi dan migrasi sel. Proteoglikan merupakan protein yang berperan penting pada ECM dalam ikatannya dengan glikosaminoglikan. Pada fibrogenesis terjadi peningkatan fibronectin, asam hialuronat, proteoglikan dan berbagai glikokonjugat. Pembentukan jaringan fibrotik terjadi karena sintesis matriks yang berlebihan dan penurunan penguraian matriks. Penguraian matriks tergantung kepada keseimbangan antara enzim-enzim yang melakukan degradasi matriks dan inhibitor enzim-enzim tersebut. Akumulasi ECM berawal pada *disse space* perisinusoid terutama pada zona metabolik tiga di asinus hati menuju fibrosis perisentral.

#### **d) Kematian Sel**

Mekanisme apoptosis merupakan respon tubuh untuk menyingkirkan sel yang rusak, berlebihan dan sel yang sudah tua. Struktur dan fungsi hati yang normal tergantung pada keseimbangan antara kematian sel dan regenerasi sel. Kematian sel hati dapat terjadi melalui dua proses, yakni nekrosis dan apoptosis. Pada nekrosis yang merupakan keadaan yang diawali oleh kerusakan sel, terjadi gangguan integritas membran plasma, keluarnya isi sel dan timbulnya respon

inflamasi. Respon ini meningkatkan proses penyakit dan mengakibatkan bertambahnya jumlah sel yang mati. Perubahan ECM menyebabkan sel-sel hepatosit mengalami apoptosis. Regulasi sel didalam jaringan hati mengalami gangguan karena adanya perubahan susunan ECM. Kerapatan sel yang padat menyebabkan distribusi dari kebutuhan sel tidak tercukupi sehingga terjadilah apoptosis (Juniarto dan Juwono, 2003).

#### e) **Resolusi**

Pada fase ini jumlah HSC yang aktif berkurang dan integritas jaringan kembali normal. Terjadi dua keadaan pada fase ini yaitu reversi, dimana terjadi perubahan HSC aktif menjadi inaktif dan apoptosis. Pada cedera hati, apoptosis dihambat oleh berbagai faktor dan komponen matriks yang terlihat dalam proses inflamasi, dimana yang berperan penting dalam menghambat apoptosis adalah IGF-1 dan TNF- $\gamma$  (Rockey, 2006).

#### **2.1.2.2 Respon Sistem Imun terhadap Fibrosis Hati**

Imunitas adalah resistensi terhadap penyakit terutama infeksi. Gabungan sel, molekul dan jaringan yang berperan dalam resistensi terhadap infeksi disebut sistem imun. Reaksi yang dikoordinasikan sel-sel, molekul-molekul dan bahan lainnya terhadap mikroba disebut respons imun. Sistem imun dapat dibagi menjadi sistem imun non spesifik (*innate immunity*) dan sistem imun spesifik atau (*adaptive immunity*). Imunitas non spesifik merupakan komponen normal tubuh, selalu ditemukan pada individu sehat dan siap mencegah mikroba masuk ke dalam tubuh dan dengan cepat menyingkirkannya. Sistem imun spesifik mempunyai kemampuan untuk mengenal benda yang dianggap asing bagi dirinya. Benda

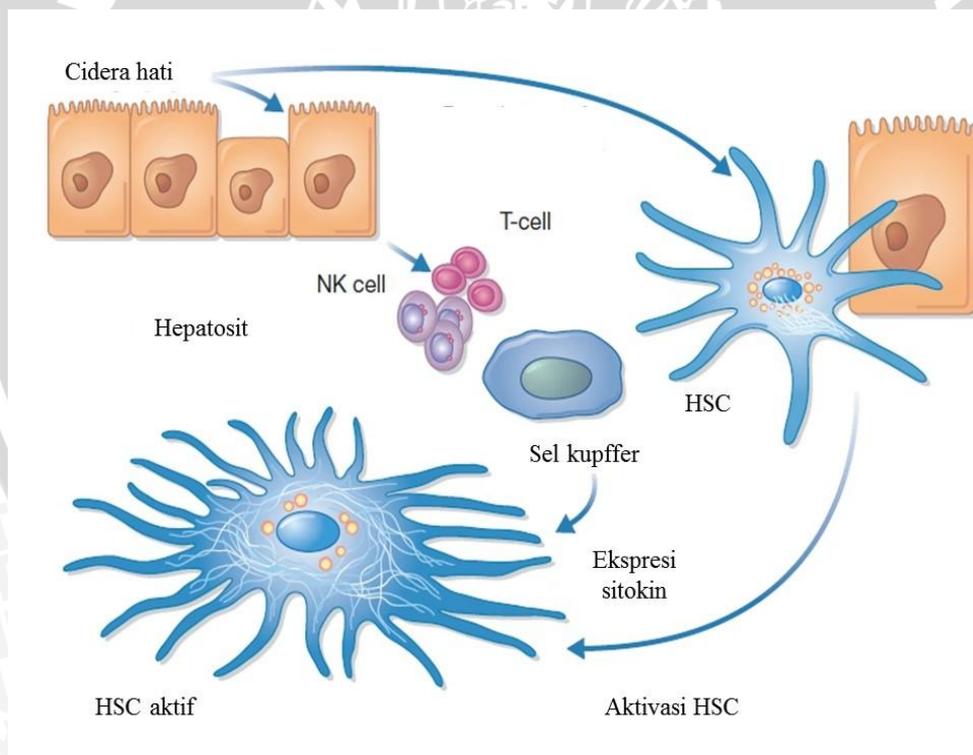
asing yang pertama kali bereaksi dengan tubuh segera dikenal oleh antibodi. Paparan tersebut menimbulkan sensitivitas antibodi, sehingga antigen yang sama yang masuk ke dalam tubuh untuk kedua kali akan dikenal lebih cepat dan kemudian dihancurkan, oleh karena itu sistem tersebut disebut spesifik (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Ketika terjadi cedera pada hati sistem imun non spesifik akan merespon reaksi tersebut. Sel epitel memproduksi peptida seperti defensins dan cathelicidin yang akan bereaksi dengan mikroba yang memasuki epitel. Sel-sel imun memiliki reseptor yang disebut dengan *pattern recognition receptors* yang berfungsi dalam mengenali substansi patogen yang disebut *patogen associated molecular pattern* (PAMPs). Pada peredaran darah, mikroba patogen serta zat toksik penyebab fibrosis hati dikenali oleh sel leukosit melalui *reseptor binding site*. Selanjutnya leukosit yang teraktivasi akan memproduksi sitokin-sitokin proinflamasi dan akan beregresi pada jaringan hati. Pada regulasi normal, sel leukosit berada pada jaringan darah dan ketika terjadi inflamasi atau cedera, sel tersebut akan berkembang didalam jaringan. Sitokin yang berperan pada proses inflamasi pertama kali ialah TNF- $\alpha$  dan IL-1 (Abbas *et al.*, 2007).

Aktivasi dari sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1 menstimulasi respon imun spesifik seperti sel NK dan sel T, serta produksi sitokin lain seperti IL-6. Leukosit yang teraktivasi menstimulasi regresi leukosit pada lokasi inflamasi. Akibat inflamasi tersebut menyebabkan kondisi stres oksidatif yang diikuti dengan konversi oksigen menjadi ROS. *Reactive oxygen species* berperan dalam aktivasi IFN- $\gamma$  yang mereduksi produksi dari antioksidan endogen seperti

SOD. Aktivasi dari IFN- $\gamma$  akan meningkatkan produksi *fibroblast growth factor* yang berfungsi dalam perbaikan jaringan (Huang, 2010).

Dalam keadaan normal, hati memiliki makrofag menetap yang disebut dengan sel kupffer. Fungsi sel kupffer adalah memfagosit sel hepatosit tua, debris sel, benda asing, sel tumor dan berbagai mikroba. Ketika terjadi reaksi inflamasi pada hati yang dimediasi oleh sitokin, sel kupffer akan teraktivasi. Sel hepatosit yang mengalami cedera dan sel kupffer mengaktivasi HSC (Gambar 2.2). HSC merupakan kontributor utama fibrosis hati, berperan dalam produksi mediator inflamasi dan kolagen pada ECM (Marra, 2011).



**Gambar 2.2** Cedera pada sel hepatosit dan sel kupffer mengaktivasi HSC (Sumber : Rocky, 2006)

### 2.1.2.3 Gejala Klinis

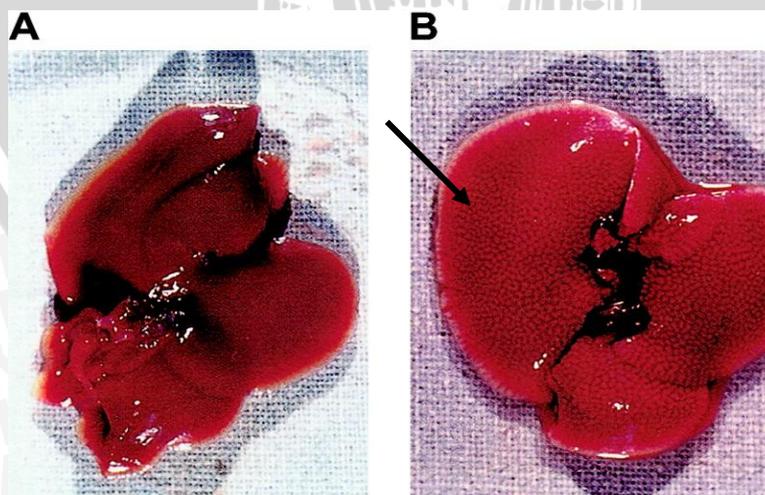
Fibrosis hati tidak menunjukkan gejala yang begitu tampak pada awalnya karena penyakit ini bersifat kronis. Gejala akan muncul seiring bertambahnya tingkat keparahan fibrosis. Gejala klinis meliputi melena dan hematochezia yang disebabkan adanya ulserasi gastrointestinal atau koagulopati, yang dipicu oleh *hyperfibrinolysis*. Penderita penyakit hati kronis dan fibrosis menyebabkan penurunan produksi *trombin activatable fibrinolysis inhibitor*. Kelainan koagulasi menyebabkan melena dan hematochezia. Gejala lain seperti anoreksia dan penurunan berat badan disebabkan karena asupan gizi yang tidak memadai sebagai akibat dari peningkatan katabolisme dalam tubuh (Elhiblu, 2015).

Gejala klinis lain yang dapat terjadi pada penderita fibrosis hati yakni anemia dan juga *ascites*. Anemia disebabkan oleh perlambatan waktu transit eritrosit melalui limpa akibat berkurangnya aliran darah pada *portahepatica* dan kerapuhan sel darah merah karena tingkat asam empedu yang tinggi (Elhiblu, 2015). Terdapat dua faktor utama yang dapat menyebabkan *ascites* yakni rendahnya kadar albumin dalam darah dan hipertensi portal. Rendahnya kadar albumin dalam darah menyebabkan perubahan tekanan yang diperlukan untuk mencegah terjadinya pertukaran cairan, yang memungkinkan cairan keluar dari pembuluh darah. *Ascites* dapat disebabkan oleh hipertensi portal, yang mengarah pada peningkatan tekanan di dalam cabang-cabang vena porta yang melalui hati. Darah yang tidak dapat mengalir melalui hati karena terjadi peningkatan tekanan akhirnya akan bocor ke rongga perut dan menyebabkan asites. Asites yang berat

dapat menyebabkan peningkatan berat dan tekanan rongga perut, serta dapat terjadi pernafasan yang pendek (Kahn, 2010).

#### 2.1.2.4 Patologi Anatomi

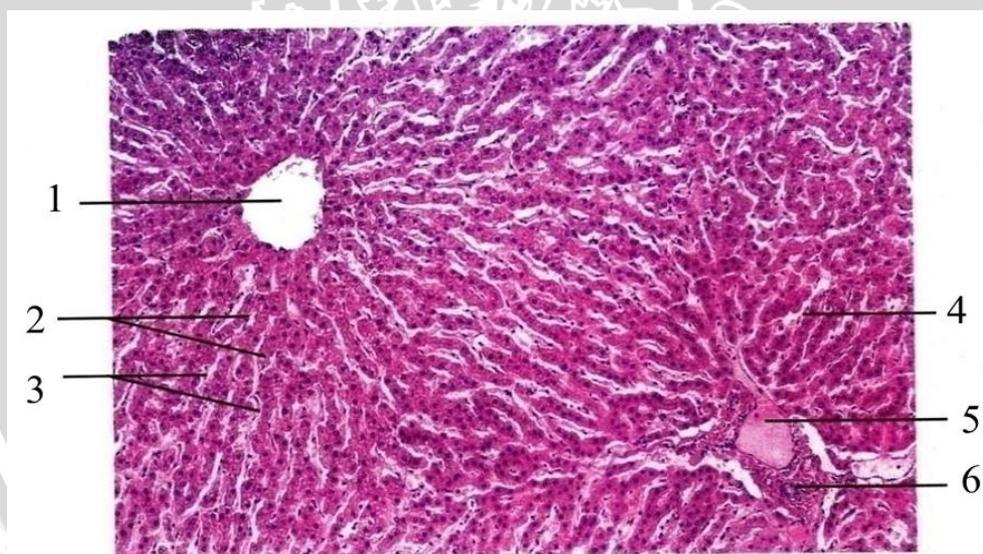
Perubahan anatomi pada fibrosis hati antara lain: ukuran hati cenderung lebih besar apabila dibandingkan dengan ukuran hati normal, terdapat bentukan nodul berukuran kecil ( $\pm 1$  mm) pada permukaan hati (ditunjuk oleh panah pada gambar 2.3 bagian B), konsistensi organ lebih padat dibandingkan dengan konsistensi pada hati normal. Selain itu, pada penderita fibrosis, warna permukaan hati termasuk dalam faktor pembeda. Warna hati pada penderita fibrosis cenderung lebih pucat sedangkan pada keadaan hati normal, hati berwarna merah bata (Gambar 2.3 bagian A). Sedangkan kondisi hati dalam keadaan normal memiliki ciri bentukan tepian organ yang jelas, berwarna merah bata, warna permukaan organ merah merata serta konsistensi organ cenderung lunak (Fuji *et al.*, 2010).



**Gambar 2.3** (a) Hati mencit normal, (b) fibrosis hati pada mencit hasil induksi  $\text{CCl}_4$  (Sumber : Rocky, 2006)

### 2.1.2.5 Histopatologi

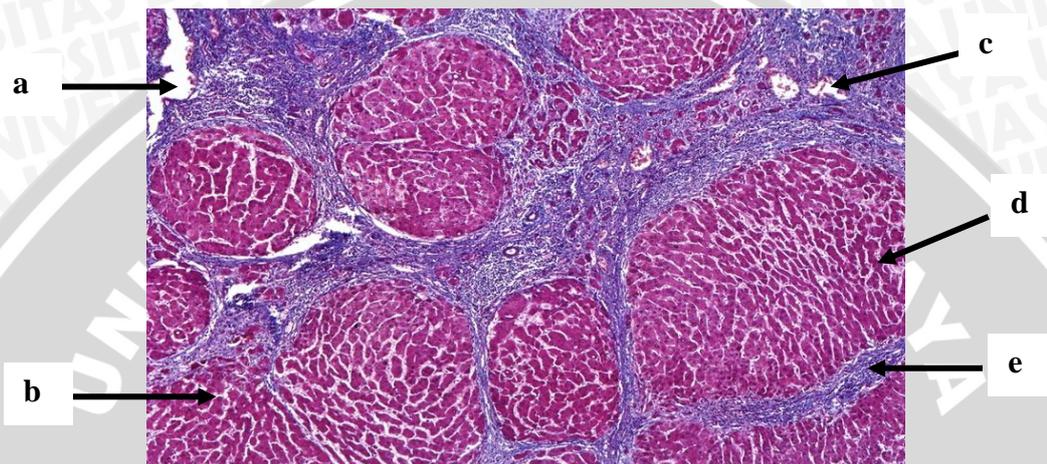
Fibrosis hati pada hepatologi hewan selalu ditandai dengan kematian *hepatocellular* nekrosis atau apoptosis, dan peradangan yang bervariasi dalam jenis dan tingkat berbeda serta adanya pertumbuhan jaringan ikat. Pada pewarnaan HE gambaran melintang histologi hati normal (Gambar 2.4) ditandai dengan adanya vena sentral (nomor 1) dan vena perifer yang disebut dengan vena porta (nomor 5). Hepatosit atau sel lempeng hati (nomor 2) memiliki inti yang berwarna ungu gelap dan bagian sitoplasma yang lebih muda. Terdapat sinusoid (nomor 3) yang merupakan rongga diantara sel endotel (nomor 4) (Arora, 2012).



**Gambar 2.4** Gambaran histologi hati normal dengan pewarnaan HE (Sumber : Arora, 2012)

Histopatologi dari fibrosis hati menyebabkan perubahan struktur hati secara keseluruhan. Hasil pewarnaan *trichrome stain* yakni kolagen berwarna biru, sitoplasma berwarna merah, eritrosit berwarna kuning atau merah (Gambar 2.5). Pada kondisi fibrosis, terjadi penyempitan vena sentra (a) dan vena porta (c).

Sel hepatosit mengalami perubahan dan kehilangan nukleus (d). Bentuk sinusoid tidak beraturan (b) dan terdapat akumulasi kolagen berlebihan yang mendesak vena porta dan vena sentra (e) (Anderson, 2013).



**Gambar 2.5** Histopatologi fibrosis hati dengan pewarnaan *trichrome stain*: (a) vena sentra, (b) sinusoid, (c) vena porta, (d) hepatosit, (e) kalogen (Sumber : Anderson, 2013)

#### 2.1.2.6 Diagnosa

Uji fungsi hati dilakukan untuk mengetahui fungsi hati secara keseluruhan. Riwayat penderita, pemeriksaan fisik, pemeriksaan darah dan urinalisis merupakan tes utama yang dilakukan untuk mengetahui apakah hati berfungsi dengan baik ataukah mengalami suatu gangguan. Abnormalitas pada hati dapat ditandai dengan adanya perubahan kadar ALT, SGPT, SGOT serta bilirubin pada urin. Penyakit yang menyangkut hati seperti fibrosis hati, pasti akan berpengaruh secara nyata pada kadar ALT, SGPT serta SGOT (Williams, 2005).

Fibrosis hati dapat didiagnosa pada penderita penyakit hati kronis atau jika hasil tes fungsi hati yang abnormal. Diagnosa dilakukan untuk memeriksa fibrosis dan apabila ditemukan adanya fibrosis maka dilakukan uji untuk menentukan

tingkat keparahannya (*staging*). Tes yang digunakan untuk menentukan tahap fibrosis termasuk tes *non-invasive imaging*, tes darah, biopsi hati, dan tes pengerasan hati (Kanh, 2010).

**a) Tes *Non-invasive Imaging***

Uji ini meliputi ultrasonografi, CT scan, dan *magnetic resonance imaging* (MRI). Uji tersebut dapat mendeteksi fibrosis dan hipertensi portal, seperti splenomegali dan varises. Namun uji-uji tersebut tidak sensitif dalam mendeteksi fibrosis dengan tingkat keparahan. Meskipun fibrosis dapat menunjukkan hasil *echogenicity* pada uji ultrasonografi atau heterogenitas sinyal pada CT, uji ini dinyatakan kurang spesifik.

**b) Biopsi Hati**

Biopsi hati merupakan uji mendasar untuk mendiagnosis fibrosis hati dan untuk mendiagnosis gangguan hati yang menyebabkan gejala fibrosis. Namun uji biopsi hati bersifat invasif, sehingga risiko komplikasi sekunder mencapai 10 sampai 20% (seperti nyeri setelah berlangsungnya uji) dan berisiko 0,5-1% terhadap komplikasi primer seperti perdarahan yang signifikan (Thampanitchawong dan Piratvisuth, 2007).

**c) Tes Darah**

Tes darah merupakan uji yang melibatkan gabungan *marker* tidak langsung seperti bilirubin pada serum, dan *marker* langsung dari fungsi hati. *Marker* langsung adalah zat yang terlibat dalam patogenesis deposisi matriks ekstraselular atau sitokin yang menginduksi matriks ekstraselular deposisi. Uji ini baik digunakan untuk membedakan antara dua tingkat fibrosis yakni



fibrosis sedang dan parah. Uji ini tidak akurat dalam membedakan antara derajat fibrosis sedang sampai berat. Cara efektif dalam diagnosa fibrosis dapat dilakukan dengan uji darah yang kemudian dilanjutkan dengan uji biopsi hati.

#### d) Tes Pengerasan Hati

Fibrosis hati ditandai dengan peningkatan konsistensi jaringan. Tes yang menilai pengerasan hati merupakan uji yang penting, namun uji ini masih dalam tahap pengembangan. Tes pengerasan hati meliputi USG *elastography*, MRI *elastography*, dan akustik kekuatan radiasi impuls. Untuk tes ini, getaran akustik diterapkan pada abdomen menggunakan probe. Kecepatan getaran ini dihantarkan melalui jaringan hati yang merupakan indikasi kekakuan hati yang disebabkan oleh jaringan ikat. Obesitas pada penderita fibrosis dapat menurunkan akurasi diagnostik, karena berpotensi membatasi keakuratan uji tersebut (Kanh, 2010).

## 2.2 Sitokin Interleukin 6 (IL-6)

Interleukin-6 merupakan sitokin yang berperan dalam sistem imun non spesifik maupun sistem imun spesifik. Sitokin ini disintesis oleh sel *mononuclear*, sel endotel vaskuler, fibroblas, serta beberapa sitokin lain seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1. Sitokin ini juga diproduksi oleh sel T yang teraktivasi. Reseptor IL-6 terdiri dari protein *cytokine-binding* dan subunit *signal-transducing* yang merupakan reseptor sitokin tipe I. Interleukin 6 memiliki beberapa peran, dalam respon imun non spesifik, sitokin ini menstimulasi sintesis dari *acute-phase protein* (APP) oleh hepatosit. *Acute-phase protein* berkontribusi terhadap efek sistemik dari inflamasi,

yang disebut *acute-phase response*. Peran dalam respon imun spesifik ialah stimulasi produksi sel limfosit B yang menghasilkan antibodi. Kerja dari sitokin ini memiliki kemiripan dengan sel myeloma yang merupakan sel pemicu pertumbuhan neoplasma. Kebanyakan sel myeloma secara otomatis mensekresikan IL-6 (Abbas *et al.*, 2007).

Interleukin-6 merupakan sitokin proinflamasi, dimana produksi berlebih sitokin ini menandakan terjadinya inflamasi. Inflamasi merupakan tahap awal dari serangkaian proses fibrosis. Ketika produksi IL-6 meningkat, maka hal ini akan berdampak pada sintesis APP dan aktivasi faktor pertumbuhan fibroblas. Salah satu APP yang berperan adalah *alpha-1-acid glycoprotein*. Penyakit hati yang bersifat kronis akan menimbulkan produksi IL-6 secara terus menerus sehingga produksi APP meningkat. Peran *alpha-1-acid glycoprotein* ialah meningkatkan interaksi kolagen dan juga faktor pertumbuhan fibroblas. Fibrosis hati disebabkan oleh peningkatan produksi kolagen, yang dimediasi oleh *alpha-1-acid glycoprotein* dan sitokin IL-6 (Sander *et al.*, 2010).

### **2.3 Antioksidan Endogen Superoxide Dismutase (SOD)**

Antioksidan adalah suatu substansi yang dapat menghentikan atau menghambat kerusakan oksidatif (Halliwell, 2006). Menurut Kevin *et al.* (2006) reaksi oksidatif yang diakibatkan oleh radikal bebas berimplikasi pada berbagai kondisi patologis, yaitu kerusakan sel, jaringan, dan organ seperti hati, ginjal, jantung baik pada manusia maupun hewan. Kerusakan ini dapat berakhir pada kematian sel sehingga terjadi percepatan timbulnya berbagai penyakit degeneratif. Sehubungan dengan potensi toksisitas senyawa radikal bebas, tubuh memiliki

mekanisme sistem pertahanan alami berupa antioksidan endogen yang berfungsi menetralkan dan mempercepat degradasi senyawa radikal bebas untuk mencegah kerusakan komponen makromolekul. Sistem ini dibagi dalam dua kelompok besar yaitu: sistem pertahanan preventif seperti enzim superoksida dismutase, katalase, dan glutathion peroksidase dan sistem pertahanan melalui pemutusan reaksi radikal seperti penambahan isoflavon, vitamin A, vitamin C, dan vitamin E ke dalam tubuh (Valko *et al.*, 2007).

Radikal bebas atau sering disebut senyawa oksigen reaktif adalah molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan (*unpaired electron*) pada orbital terluar. Elektron yang tidak berpasangan cenderung menarik elektron lain dalam upaya penstabilan diri. Elektron yang tidak berpasangan tersebut secara cepat menarik makromolekul sekitarnya seperti asam lemak, protein, polisakarida, asam nukleat dan asam deoksiribonukleat. Contoh dari radikal bebas antara lain radikal superoksida ( $O_2^-$ ), hydrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), radikal hidroksil, nitrit oksida, peroksinitrit, peroksil dan alkaloksil. Secara teoritis, radikal bebas dapat terbentuk apabila terjadi pemisahan ikatan kovalen (Valko *et al.*, 2007).

*Carbon tetrachloride* yang masuk ke dalam tubuh, oleh darah disirkulasikan ke seluruh tubuh termasuk hati. Dalam hati,  $CCl_4$  akan bereaksi yang selanjutnya akan dikatabolisme. Hepatotoksisitas  $CCl_4$  disebabkan oleh metabolit reaktifnya, yaitu triklorometil  $CCl_3^-$ . Adanya  $CCl_3^-$  ini mengakibatkan peningkatan ROS yang akan menyebar ke seluruh tubuh termasuk hati.

Peningkatan ROS dalam jaringan berbanding lurus dengan stres oksidatif dan kadar SOD dalam jaringan (Dambal *et al.*, 2012).

Tubuh memiliki tiga enzim antioksidan intrasel atau antioksidan endogen, yaitu *superoxide dismutase* (SOD), glutathion peroksidase (GP<sub>x</sub>) dan katalase (Cat). *Superoxide dismutase* merupakan salah satu antioksidan endogen yang berfungsi mengkatalisis reaksi dismutasi radikal bebas anion superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) menjadi hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dan molekul oksigen (O<sub>2</sub>) (Halliwell, 2006).

Pada mamalia terdapat 2 bentuk SOD yaitu:

- a. Bentuk CuZn-SOD yang berada di dalam sitoplasma, dan
- b. Bentuk Mn-SOD yang terdapat di dalam matriks mitokondria.

Beberapa faktor yang dapat menyebabkan kondisi stres oksidatif meningkat diantaranya puasa (Wresdiyati dan Makita, 1995), olah raga (Haaij 2006), stres psikis, dan inflamasi. Pada kondisi stres oksidatif terjadi produksi radikal bebas yang berlebihan. Meningkatkan produksi radikal bebas di dalam tubuh dapat menurunkan enzim-enzim antioksidan intrasel dan menyebabkan kerusakan sel. Oleh karena itu, asupan antioksidan eksogen sangat penting, misalnya isoflavon guna membantu kerja enzim antioksidan intrasel untuk mencegah kerusakan sel (Moller *et al.*, 1996).

#### **2.4 Tanaman Jambu Mete (*Anacardium occidentale*)**

Tanaman jambu mete merupakan tanaman asli Brazil dan dapat ditemui pada daerah tropis lainnya. Di Indonesia, tanaman jambu mete diketahui memiliki khasiat bagi kesehatan. Tanaman jambu mete berupa pohon berukuran sedang, tinggi mencapai 12 m, batang bercabang-cabang dan daun selalu berwarna hijau.

Akar tanaman ini kuat, berbentuk tunggang dengan kedalaman lebih dari 3 m. Helaian daun jambu mete berjenis tunggal dan memiliki tangkai yang panjang. Daun jambu mete berwarna hijau kekuningan sampai hijau tua kecokelatan dengan panjang 4–22 cm dan lebar 2–15 cm. Ujung daun jambu mete membulat dan tumpul terdapat lekukan kecil di tengah dengan bagian pangkal yang meruncing (Gambar 2.6). Tepian daun jambu mete berbentuk rata dengan panjang tangkai mencapai 3 cm (Fitriandiny, 2012).



**Gambar 2.6** Bagian pohon jambu mete: daun, buah, dan bunga  
(Sumber : Mahecha *et al.*, 2004)

Pada daun jambu mete terkandung zat aktif yakni flavonoid yang memiliki manfaat sebagai zat anti-inflamasi dan antioksidan. Daun jambu mete digunakan secara tradisional untuk pengobatan luka bakar, radang amandel dan disentri.

Klasifikasi dari jambu mete adalah, sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Filum	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Sapindales
Famili	: Anacardiaceae
Genus	: Anacardium
Spesies	: <i>Anacardium occidentale</i> (Fitriandiny, 2012).

#### 2.4.1 Bahan Aktif Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale*)

Pucuk mete ini memiliki kadar air sebesar 78.12%. Berdasarkan hasil analisis total flavonol (Hardianzah, 2009), diketahui bahwa kandungan flavonol pada pucuk mete memberikan hasil sebagai berikut, dari 100 g sampel segar mengandung 7.55 mg myricetin, 127.80 mg quercetin, dan 10.26 mg kaempferol dengan total 145.61 mg. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kandungan flavonol terbanyak pada daun jambu mete adalah jenis quercetin. Daun jambu mete memiliki total jumlah flavonoid yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan tanaman lain yakni daun kelor, pucuk mengkudu, bunga papaya, pakis, antanan beurit, daun labu siam, lembayung, mangkokan putih, takokak, kucai dan bunga turi.

Komponen flavonol dan flavones yang terdapat pada pucuk mete didominasi oleh quercetin. Quercetin mempunyai rumus kimia 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone dan dapat melebur pada suhu 316,5°C. Quercetin tidak larut dalam air dan eter, tetapi larut dalam alkohol dan aseton. Quercetin merupakan antioksidan yang paling kuat di antara senyawa polifenol. Quercetin berpotensi sebagai antivirus, antibakteri, anti kanker dan anti-inflamasi. Quercetin

memperlihatkan kemampuan dalam mencegah terjadinya peroksidase lemak (Hardianzah, 2009).

Dosis yang digunakan untuk terapi preventif terhadap fibrosis hati adalah 350 mg/kg BB, 400 mg/kg BB, dan 500 mg/kg BB. Penentuan dosis ekstrak etanol daun jambu mete dengan modifikasi berdasarkan pada penelitian Landim *et al.* tahun 2009 dengan judul “Evaluation of The Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of The Acetone Extract from *Anacardium Occidentale L*”.

## 2.5 Hewan Coba Mencit (*Mus musculus*)

Hewan coba adalah hewan yang dapat digunakan untuk tujuan suatu penelitian. Pemakaian hewan coba dilakukan dalam berbagai penelitian biomedikal seperti penelitian toksikologi, mikrobiologi, imunologi, pengembangan obat-obatan dan vaksin. Mencit yang dipelihara di laboratorium sebenarnya masih satu famili dengan mencit liar. Penelitian terdahulu oleh Lammert *et al.* (2002) mengatakan bahwa mencit strain BALB/c merupakan mencit dengan kepekaan fibrosis hati yang tinggi apabila dibandingkan dengan mencit strain FVB/N dan C57BL/6.

Penelitian terdahulu yang menggunakan mencit sebagai hewan model fibrosis hati telah dilakukan oleh Fujii *et al.* (2010). Mencit diinduksi menggunakan CCl<sub>4</sub>, kemudian tingkat keparahan fibrosis hati diamati berdasarkan perubahan histopatologi, ekspresi CD133 dan *epidermal growth factor*. Pada penelitian tersebut sampel yang digunakan berasal dari jaringan hati mencit.

Mencit yang telah dewasa dan siap dikawinkan mempunyai bobot jantan 28 gram dan betina 20-25 gram. Kebuntingan antara 17-22 hari, rata-rata 21 hari.

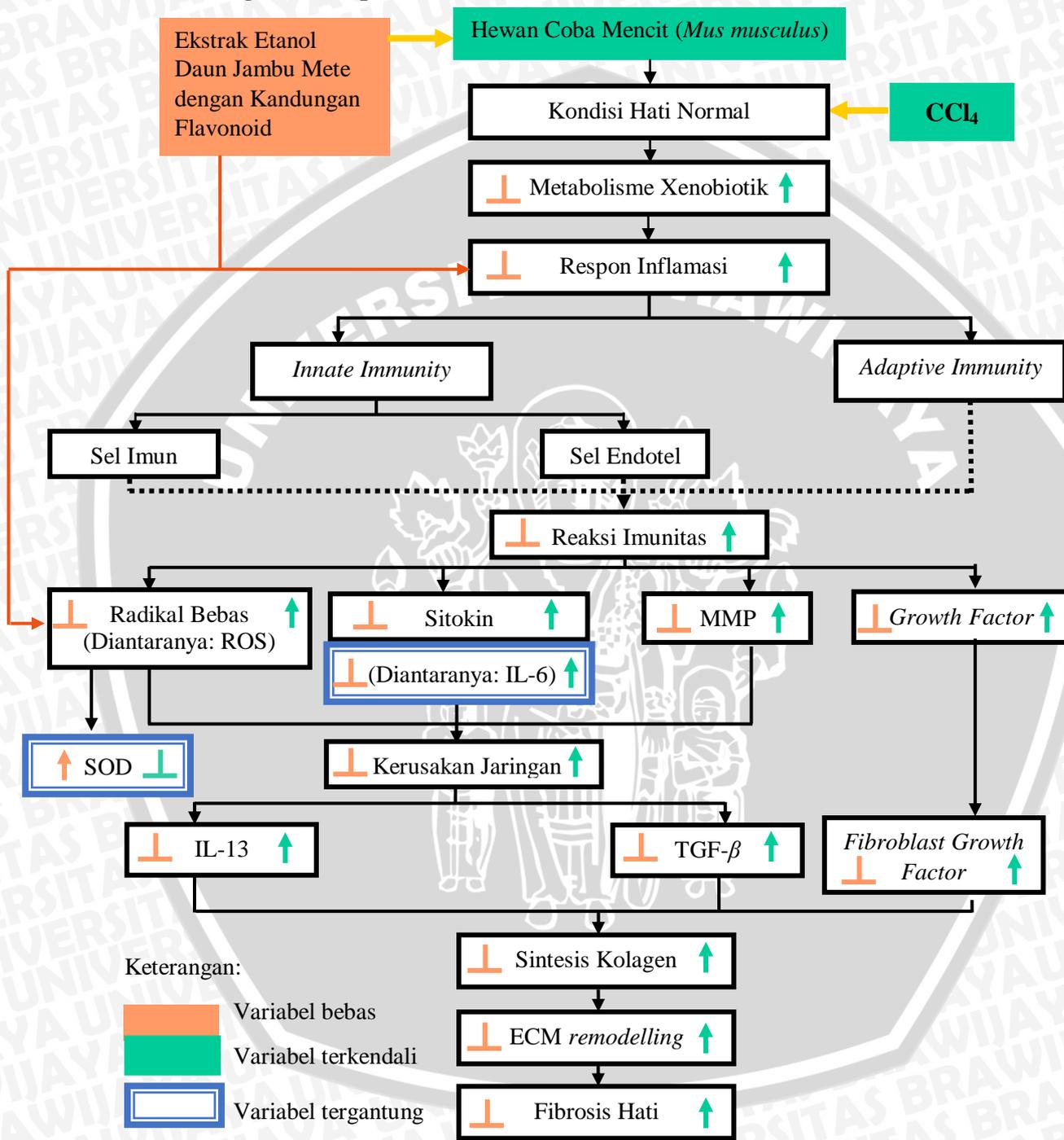
Mencit termasuk hewan polioestrus, siklusnya berlangsung setiap 4-5 hari sekali, lama birahi antara 9-20 jam dan estrus kembali terjadi 20-40 jam setelah partus. Penyapihan dapat menginduksi estrus dalam 2-4 hari. Cara perkawinan mencit berdasarkan rasio jantan dan betina dibedakan atas monogamus, triogamus dan harem. Sistem Monogamus terdiri dari satu jantan dan satu betina, triogamus terdiri dari satu jantan dan dua betina dan harem satu jantan lebih dari tiga betina dalam satu kandang. Mencit memiliki taksonomi sebagai berikut (Arrington, 2002):

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: Mus
Spesies	: <i>Mus musculus</i>

Sistem pencernaan mencit terdiri atas saluran pencernaan atau kelenjar-kelenjar yang berhubungan, fungsinya untuk ingesti dan digesti makanan, absorpsi sari makanan serta eliminasi sisa makanan. Pencernaan di mulut dan di rongga mulut, pakan digiling oleh gigi dan di basahi oleh saliva kemudian disalurkan melalui faring dan esophagus. Dalam usus halus, pakan diubah menjadi asam-asam amino, monosakarida, gliserida dan unsur-unsur dasar yang lain. Absorpsi air terjadi dalam usus besar akibatnya, isi yang tidak dicerna menjadi setengah padat (feses). Feses dikeluarkan dari dalam tubuh melalui *rectum*. Kapasitas maksimum untuk mencit dengan berat badan 20 gram adalah 1 ml (Jacob, 2008).

### BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

Hewan coba mencit (*Mus musculus*) diinduksi ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) secara per oral sebagai tindakan preventif selama 14 hari. Kemudian pada tujuh hari berikutnya, mencit diinduksi menggunakan  $\text{CCl}_4$  secara intraperitoneal. Pemberian Ekstrak etanol daun jambu mete diharapkan dapat menurunkan produksi IL-6 dan meningkatkan kadar SOD sebelum terjadi proses inflamasi akibat fibrosis. Induksi menggunakan  $\text{CCl}_4$  akan dibawa oleh pembuluh darah ke hati. *Carbon tetrachloride* merupakan salah satu penyebab metabolisme xenobiotik. Di dalam hati, terdapat sitokrom  $\text{P}_{450}$  yang akan mengubah  $\text{CCl}_4$  menjadi  $\text{CCl}_3\text{O}_2^-$  dan menjadi radikal bebas yang reaktif. Pemberian  $\text{CCl}_4$  dapat merangsang peningkatan ROS.

Metabolisme xenobiotik tersebut meningkatkan respon inflamasi yang akan mengaktivasi respon *innate immunity* dan *adaptive immunity*. Pertahanan oleh *innate immunity* meliputi aktivasi sel-sel imun dan sel endotel. Sel imun yang terlibat dalam reaksi inflamasi antara lain makrofag, sel T, sel NK, dan antibodi. Kerusakan sel merangsang produksi sitokin seperti  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1, dan IL-6. Sel imun dan sel endotel merupakan sel-sel yang berperan dalam produksi sitokin proinflamasi, seperti IL-6. Kemudian  $\text{TNF-}\alpha$  dan IL-1 menstimulasi respon imun spesifik seperti sel T dan sel NK.

Radikal bebas yang meningkat didalam tubuh melebihi jumlah antioksidan endogen akan menimbulkan terjadinya stres oksidatif. Salah satu antioksidan endogen adalah SOD. Stres oksidatif akan memicu terbentuknya peroksidasi lipid, dimana ROS akan berusaha menstabilkan diri dengan cara mengambil elektron dari molekul-molekul yang berada di membran sel yang mengakibatkan terjadinya

kerusakan membran. Kondisi stres oksidatif yang terjadi terus menerus dapat merusak membran sel, protein dan DNA, berakibat fatal terhadap fungsi jaringan. Stres oksidatif menginduksi peroksidasi membran lipid yang menimbulkan perubahan struktur biologis dari membran, seperti kadar cairan, serta dapat menonaktifkan ikatan membran dengan reseptor atau enzim yang dapat mengganggu fungsi normal sel, lebih jauh memberikan kontribusi besar kerusakan sel yang merupakan produk peroksidasi lipid.

Aktivitas inflamasi dan kondisi stres oksidatif secara progresif akan mengaktifasi sel kupfer yang berada jaringan subendotel hati dan HSC pada *disse space* hati. Keadaan tersebut berdampak pada aktivitas *matrix metalloproteinase* (MMP). Apabila produksi dari sel-sel imun tersebut terjadi secara terus menerus hal ini akan menyebabkan kerusakan jaringan. Sitokin IL-13 dan TGF- $\beta$  berperan dalam proses fibrogenesis yakni fungsi dalam peningkatan regulasi, aktivasi *fibroblast growth factor*, dan peningkatan reseptor sitokin. Selanjutnya keadaan ini akan menyebabkan produksi kolagen berlebih pada jaringan hati sehingga terjadi akumulasi protein matriks ekstraseluler yang disebut dengan fibrosis hati.

Ekstrak daun jambu mete mengandung zat aktif golongan flavonol dengan kandungan quercetin tertinggi dibanding flavonol lain. Flavonoid tersebut berpotensi sebagai antioksidan eksogen yang mendukung kerja dari antioksidan endogen. Pemberian ekstrak etanol daun jambu mete secara peroral akan berpengaruh pada peningkatan jumlah antioksidan dalam tubuh, sehingga radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh tidak dapat merusak sel radikal bebas akan bereaksi dengan antioksidan.



Pemberian ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) pada mencit sebelum induksi CCl<sub>4</sub> diharapkan mampu mencegah peningkatan produksi dari IL-6 serta kadar SOD. Quercetin yang terkandung dalam ekstrak etanol daun jambu mete berperan dalam meredam efek radikal bebas yang berlebih dengan cara mendonasikan atom hidroksil. Diredamnya radikal bebas maka akan menurunkan jumlah ROS sehingga kadar antioksidan endogen seperti SOD meningkat. Berkurangnya ROS akan menurunkan peroksidase lipid sehingga kerusakan hati dapat dicegah, apabila tidak ada kerusakan hati maka reaksi inflamasi yang dimediasi oleh sitokin proinflamasi seperti IL-6 juga akan menurun.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

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

1. Pemberian preventif menggunakan ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) dapat mencegah peningkatan produksi IL-6 pada mencit (*Mus musculus*) model fibrosis hati yang diinduksi CCl<sub>4</sub>.
2. Pemberian preventif menggunakan ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) dapat meningkatkan kadar *Superoxide Dismutase* (SOD) pada mencit (*Mus musculus*) model fibrosis hati yang diinduksi CCl<sub>4</sub>.

## BAB 4. METODE PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak daun jambu mete dilakukan di Laboratorium UPT Materia Medika, Kota Batu. Pemeliharaan hewan coba, induksi  $\text{CCl}_4$  dan perlakuan pada hewan percobaan dilakukan di Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri, Malang. Pengujian produksi IL-6 dilakukan di Laboratorium Biomolekuler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, sedangkan pengujian kadar SOD dilakukan di Laboratorium Faal, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Penelitian ini berlangsung selama dua bulan, dari bulan Maret hingga April 2016.

### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan mencit (*Mus musculus*) jantan strain BALB/c umur delapan sampai sembilan minggu dengan berat badan antara 20–25 g, *Carbon tetrachlorida* ( $\text{CCl}_4$ ), minyak jagung, daun jambu mete (*Anacardium occidentale*), etanol 70 %, alkohol 70%, akuades, CMC Na, paraffin, PBS, NaCl 0,9%.

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini antara lain sonde, spuit 1 ml, *needle* 30 G, kandang tikus berupa bak plastik dengan tutup kandang dari kawat, seperangkat alat bedah berupa *scaple* dan *blade*, gunting, pinset, *glove*, masker, pot organ, klip plastik, *vacutainer*, tabung reaksi 15 ml, *ice box*, *ice pack* dan spektrofotometer Shimadzu *UV-visible spectrophotometer* UV-1601.

### 4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah mencit sebagai hewan percobaan. Mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesies *Mus musculus* jantan strain BALB/c umur delapan sampai sembilan minggu dengan berat badan antara 20–25 g. Mencit diadaptasi untuk menyesuaikan kondisi laboratorium selama tujuh hari (Lamanepa, 2005). Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Montgomery and Kowalsky, 2011) :

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

P = jumlah kelompok (terdiri dari lima macam perlakuan)

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk lima kelompok diperlukan jumlah ulangan paling sedikit empat kali dalam setiap kelompok, sehingga diperlukan 20 ekor hewan coba. Mencit dikandangkan dalam kandang dari bak plastik yang dilengkapi penutup kawat, dengan ukuran kandang 17,5 x 23,75 x 17,5 cm, berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan sanitasi. Ukuran kandang tersebut merupakan ukuran standar yang digunakan dalam pemeliharaan hewan laboratorium dengan jumlah maksimal mencit dalam satu kandang adalah tujuh ekor (Lamanepa, 2005).

#### 4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian *true experimental, post test control only design* dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Jumlah sampel yang diperoleh dibagi menjadi lima kelompok perlakuan dengan pengulangan sebanyak empat kali. Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok yaitu:

1. Kelompok A adalah mencit tanpa perlakuan (kontrol negatif, sehat).
2. Kelompok B adalah mencit yang diinduksi  $\text{CCl}_4$  (kontrol positif, sakit).
3. Kelompok C adalah mencit yang diinduksi  $\text{CCl}_4$  + ekstrak etanol daun jambu mete dengan dosis sebesar 500 mg/kg BB.
4. Kelompok D adalah mencit yang diinduksi  $\text{CCl}_4$  + ekstrak etanol daun jambu mete dengan dosis sebesar 1000 mg/kg BB.
5. Kelompok E adalah mencit yang diinduksi  $\text{CCl}_4$  + ekstrak etanol daun jambu mete dengan dosis sebesar 1500 mg/kg BB.

#### 4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dari penelitian ini yaitu:

Variabel bebas : ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*).

Variabel tergantung : produksi IL-6 dan kadar SOD.

Variabel terkontrol : 1) *Carbon tetrachloride*, dan

2) homogenitas mencit: galur, jenis kelamin, berat badan, umur dan pakan.

## 4.6 Tahapan Penelitian

### 4.6.1 Persiapan Hewan Coba Mencit

Pada persiapan hewan coba, mencit yang digunakan untuk penelitian diadaptasi terhadap lingkungan laboratorium selama tujuh hari. Mencit dibagi dalam lima kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari minimal empat ekor mencit (Lampiran 7). Mencit dikandangkan dalam kandang dari bak plastik yang dilengkapi dengan penutup bak yang terbuat dari kawat, dengan jumlah mencit minimal empat ekor tiap kandang dan disesuaikan dengan jumlah pengulangan setiap perlakuan. Kandang mencit berlokasi pada tempat yang bebas polutan. Mencit dipelihara dalam Laboratorium Fisiologi Hewan, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Malang.

### 4.6.2 Prosedur Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale*)

Prosedur pembuatan ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) menggunakan metode maserasi. Proses Ekstraksi menggunakan etanol 70%, hal tersebut dikarenakan zat aktif seperti flavonoid yang terkandung didalam daun jambu mete terlarut dalam etanol. Etanol dengan nama lain etil alkohol merupakan pelarut yang sering digunakan dalam ekstraksi daun tanaman. Sebagian besar senyawa dengan berat molekul rendah seperti saponin dan flavonoid larut didalam pelarut etanol. Daun jambu mete ditimbang sebanyak 70 g dan ditambahkan etanol sampai 3 L. Kemudian dilakukan penyaringan bahan dan evaporasi (Thangavel *et al.*, 2011) (Lampiran 2).

#### **4.6.3 Induksi Terapi Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale*)**

Metode pemberian ekstrak etanol daun jambu mete dilakukan secara per oral dengan menggunakan sonde. Pemberian dilakukan setiap hari pada hari kedelapan sampai hari ke 21. Pemberian ekstrak etanol daun jambu mete dengan menggunakan 3 dosis yang sudah ditentukan, yaitu kelompok C menggunakan dosis 500 mg/kg BB, kelompok D menggunakan dosis 1000 mg/kg BB, dan kelompok E menggunakan dosis 1500 mg/kg BB (Landim *et al.*, 2009) (Lampiran 3).

#### **4.6.4 Pembuatan Hewan Coba Model Fibrosis Hati dan Terapi Pencegahan Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale*)**

Hewan coba dibagi ke dalam lima kelompok, setiap kelompok terdiri atas empat ekor mencit. Metode pembuatan hewan model fibrosis hati menggunakan CCl<sub>4</sub> yang dilarutkan ke dalam minyak jagung, kemudian diinduksi CCl<sub>4</sub> secara intraperitoneal (i.p). Dosis yang digunakan adalah 2 ml/kg BB dengan volume pemberian adalah 0,05 ml per ekor untuk semua kelompok perlakuan kecuali kelompok kontrol positif (B). Mencit diinduksikan CCl<sub>4</sub> sebanyak satu kali sehari selama 12 hari (Achmad, 2012).

#### **4.6.5 Pengukuran Produksi Interleukin-6 (IL-6)**

##### **4.6.5.1 Preparasi Sampel**

Pengambilan organ limpa pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) dilakukan pada hari ke-29 setelah keseluruhan perlakuan. Langkah awal dalam pengambilan organ limpa adalah dengan dislokasi hewan coba pada bagian leher

kemudian dilakukan pembedahan. Pembedahan dilakukan mulai bagian abdomen hingga ke thorax, tikus direbahkan pada papan pembedahan dan diambil organ limpanya. Organ limpa mula-mula dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9% dingin kemudian limpa direndam dalam pot organ berisi *Phospate Buffer Saline*.

#### 4.6.5.2 Pengukuran Produksi IL-6 dengan Metode *Flowcytometry*

Organ limpa yang telah disentrifus didapatkan pelet kemudian ditambahkan PBS 1 mL, lalu dihomogenkan dengan cara pipetting. Setelah itu diambil 100  $\mu$ l, kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* baru. Selanjutnya ditambahkan 500  $\mu$ l PBS, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4<sup>0</sup>C. Hasil dari sentrifugasi diambil bagian peletnya kemudian ditambahkan *antibodi cell surface molecule* yang digunakan untuk staining molekul permukaan sel (GR-1) sebanyak 50  $\mu$ l, lalu diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 4<sup>0</sup>C. Setelah itu ditambahkan *cytofix cytofperm* sebanyak 100  $\mu$ l, kemudian diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 4<sup>0</sup>C, lalu ditambahkan washperm 1 ml dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4<sup>0</sup>C. Setelah didapatkan pelet hasil sentrifugasi ditambahkan IL-6 sebanyak 50  $\mu$ l, kemudian ditambahkan 300  $\mu$ l PBS, lalu dimasukkan ke dalam kuvet *flowcytometry* untuk di *running* (Rantam, 2003) (Lampiran 3.1).

Metode *flowcytometry* digunakan untuk mengetahui jumlah sel granulosit yang memproduksi IL-6. Jumlah sitokin yang dihasilkan oleh sel granulosit dapat dibandingkan antara satu perlakuan dengan perlakuan yang lainnya sehingga

dapat diketahui efek pemberian ekstrak daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) sebagai terapi preventif fibrosis hati.

#### **4.6.6 Pengukuran Kadar SOD**

##### **4.6.6.1 Preparasi Sampel**

Langkah awal dalam pengambilan organ hati adalah dengan dislokasi hewan coba pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan. Pembedahan dilakukan mulai bagian abdomen hingga ke thorax, tikus direbahkan pada papan pembedahan dan diambil organ hatinya. Organ hati mula-mula dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9% dingin kemudian hati ditempatkan pada pot organ.

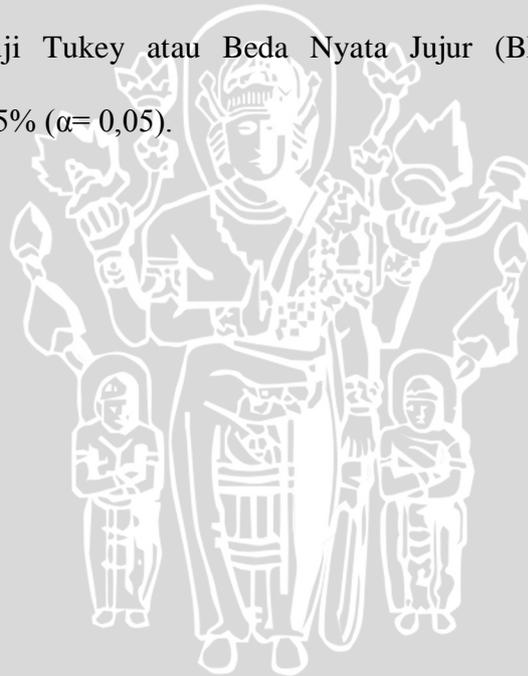
##### **4.6.6.2 Pengukuran Kadar SOD Menggunakan Spektrofotometer**

Analisis enzim SOD dilakukan menggunakan spektrofotometer *Shimadzu UV-visible spectrophotometer* UV-1601. Organ hati digerus kemudian dilarutkan dalam cairan fisiologis untuk analisis aktivitas enzim SOD (Lampiran 3.2). Prinsip dari spektrofotometer *UV-visible* adalah penyerapan cahaya oleh molekul-molekul. Panjang gelombang bergantung pada kekuatan absorbansi molekul tersebut. Nilai absorbansi dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum (580 nm) (Pradana dkk., 2014).

##### **4.6.7 Analisis Data**

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu menggunakan analisa kuantitatif statistik *One Way ANOVA* terhadap jumlah dari sel granulosit yang memproduksi IL-6 dan total jumlah enzim SOD pada sampel. Skala data merupakan skala numerik, jenis hipotesis komparatif dan jumlah kelompok perlakuan lebih dari 2 kelompok. Analisa *One Way ANOVA* didahului dengan uji

distribusi data menggunakan Shapiro-Wilk karena jumlah sampel kurang dari 50. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui data tersebut memiliki varian yang sama atau tidak dengan menggunakan uji Levene's. Apabila data terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dan homogen ( $p < 0,05$ ) maka dilakukan uji *One Way ANOVA* (CI 95%) dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) 16.0 for windows untuk mengetahui perbedaan rata-rata antar kelompok perlakuan atau perbedaan antar kelompok perlakuan atau perbedaan keseluruhan dari kelompok perlakuan. Apabila terdapat perbedaan yang signifikan dilanjutkan dengan uji Tukey atau Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan taraf kepercayaan sebesar 95% ( $\alpha = 0,05$ ).



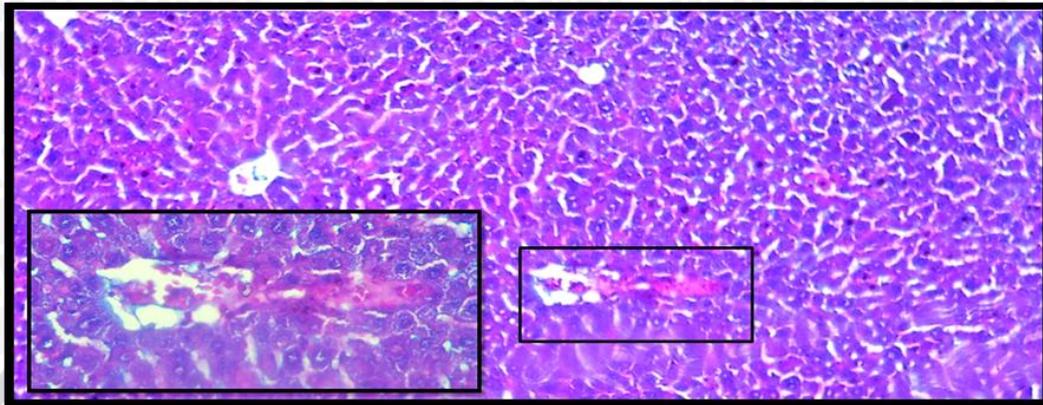
## BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Mencit Fibrosis Hati Hasil Induksi *Carbon Tetrachloride* (CCl<sub>4</sub>)

Pengamatan terhadap gambaran histopatologi hati mencit didapatkan hasil bahwa pengaruh pemberian ekstrak etanol daun jambu mete sebagai preventif terhadap hewan mencit model fibrosis induksi CCl<sub>4</sub> bertujuan untuk mencegah tumbuhnya jaringan ikat di dalam hati mencit (*Mus musculus*). Jaringan ikat yang terbentuk pada organ hati disebut dengan serabut retikuler (Hernawati, 2008). Pengamatan histopatologi hati dengan pewarnaan *Masson Trichrome*. Pengamatan menggunakan mikroskop Olympus BX53 untuk mengukur ketebalan serabut retikuler dengan perbesaran 100x dan 400x. Hasil menunjukkan adanya perbandingan kondisi hati dengan melihat ketebalan dari serabut retikuler yang tumbuh disekitar portal triad pada masing-masing kelompok perlakuan. Gambaran mikroskopis hati dapat dilihat pada kontrol negatif (Gambar 5.1), kontrol positif (Gambar 5.2).

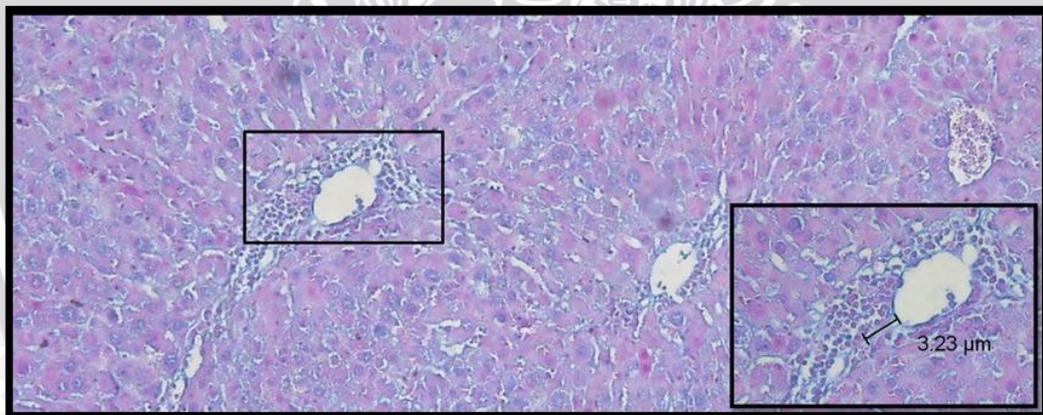
Kontrol negatif menunjukkan keadaan normal tidak ditemukan tumbuhnya serabut retikuler. Secara histologi hati memiliki parenkim yang tampak seperti spons dengan sel-sel yang tersusun secara radier yang didalamnya terdapat sistem pembuluh kapiler yang disebut sinusoid. Parenkim tersusun di dalam lobuli-lobuli, dan ditengah-tengah lobuli terdapat 1 vena sentralis sebagai cabang-cabang dari vena hepatica (Junqueira and Carneiro, 2003). Hati memiliki fungsi vital dalam detoksifikasi bahan toksik. Hal ini menyebabkan hati menjadi sering terpapar dengan zat-zat toksik yang mengakibatkan kerusakan sel hati (Anshor,

dkk., 2013). Penumpukan bahan-bahan toksik dalam parenkim hati dapat menyebabkan kerusakan hati akibat paparan zat tersebut.



**Gambar 5.1.** Preparat Kontrol Negatif

Keterangan : Gambar hati mencit dengan pewarnaan *Masson Tricome*, tampak tidak adanya serabut retikuler yang tumbuh disekitar portal triad. Perbesaran 100x (insert 400x) (Sumber: Inshiroh, 2016).



**Gambar 5.2** Preparat Kontrol Positif

Keterangan : Gambar histopatologi hati mencit dengan pewarnaan *Masson Tricome*, terlihat tumbuhnya serabut retikuler disekitar portal triad dengan ketebalan 3,23  $\mu\text{m}$ . Perbesaran 100x (insert 400x) (Sumber: Inshiroh, 2016).

Kontrol positif menunjukkan adanya jaringan ikat yang tumbuh di sekitar area portal triad, pewarnaan *Masson Trichome* serabut retikuler berwarna biru dan setelah dilakukan pengukuran didapatkan hasil 3,23  $\mu\text{m}$ . Serabut retikuler tumbuh diawali oleh cedera hati kronis dengan ditandai aktivasi *Hepatic Stellate Cells*

(HSC) dan produksi Ekstraseluler Matriks (ECM) yang berlebih dan mengakibatkan kerusakan struktur dan membran sel hati sehingga terjadi pertumbuhan dan penumpukan serabut retikuler. Pada kelompok kontrol positif mencit dinyatakan telah mengalami fibrosis hati yang ditandai dengan adanya perubahan yang diamati melalui preparat histopatologi (Gambar 5.2).

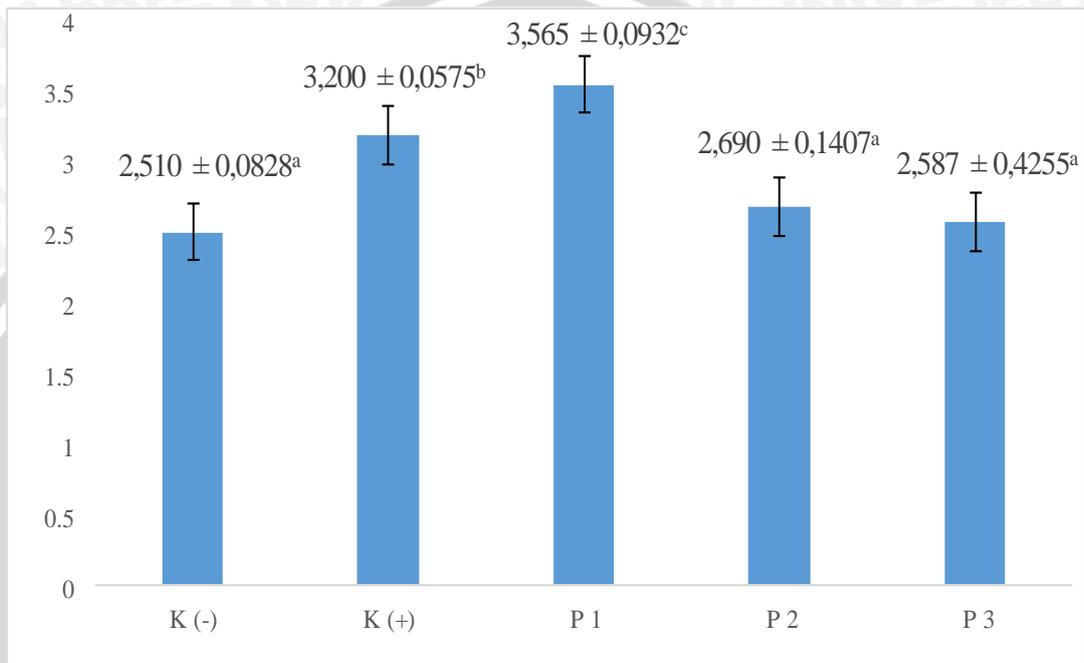
### 5.2 Efek Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale*) Terhadap Penurunan Kadar Interleukin-6 (IL-6)

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) terhadap produksi interleukin 6 (IL-6) mencit jantan (*Mus musculus*) akibat pemaparan CCl<sub>4</sub> dengan dosis 2 ml/kg BB yang diberikan secara *intrapertoneal* selama 12 hari (Achmad, 2012). Sitokin IL-6 merupakan sitokin proinflamasi yang berperan dalam proses stimulasi produksi fibroblas pada hati. Perbaikan kerusakan organ hati dapat dilihat berdasarkan adanya penurunan kadar IL-6. Pengukuran jumlah sel yang memproduksi IL-6 pada mencit diamati berdasarkan reaksi antigen dan antibodi menggunakan metode *flowcytometry*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) yang dilakukan sebelum pemaparan CCl<sub>4</sub> pada mencit (*Mus musculus*) memiliki efek preventif sebagai antiinflamasi. Hasil analisis *flowcytometry* menggunakan organ limpa menunjukkan produksi IL-6 meningkat pada kelompok kontrol positif (sakit) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (sehat). Pada kontrol positif jumlah sel granulosit adalah 3,2%, sedangkan jumlah sel granulosit pada kelompok kontrol negatif adalah 2,51%. Prosentase jumlah sel granulosit menurun seiring dengan peningkatan dosis

ekstrak etanol daun jambu mete seperti terlampir pada gambar 5.1 di bawah ini.

Prosentase produksi IL-6 pada dosis 500 mg/kg BB adalah 3,56%, dosis 1000 mg/kg BB adalah 2,69% dan pada dosis 1500 mg/kg BB adalah 2,58%.



**Gambar 5.3** Grafik Prosentase Jumlah Sel Granulosit yang Memproduksi IL-6

**Keterangan:** K(-): Kontrol negatif, K(+): Kontrol positif, P1: Dosis 500 mg/kg BB, P2: Dosis 1000 mg/kg BB, P3: Dosis 1500 mg/kg BB. Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan data terdistribusi normal dan homogen ( $p > 0,05$ ) sehingga dilanjutkan dengan uji *one way* ANOVA. Uji *one way* ANOVA menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) dapat menurunkan jumlah sel granulosit yang memproduksi IL-6 secara signifikan (Lampiran 8). Pada hasil uji *post hoc* Tukey (Lampiran 8) menunjukkan bahwa kelompok perlakuan ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) memiliki perbedaan yang nyata, kecuali antara kelompok kontrol negatif, kelompok perlakuan dosis 1000 mg/kg BB dan dosis

1500 mg/kg BB yang ditunjukkan dengan notasi yang sama. Pada perlakuan dosis 500 mg/kg BB, dosis 1000 mg/kg BB dan dosis 1500 ml/kg BB terdapat perbedaan yang nyata dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yang ditandai dengan notasi berbeda (Tabel 5.1).

**Tabel 5.1** Hasil Uji *Tukey* Produksi IL-6

Kelompok Perlakuan	Rata-rata persentase IL-6
Kontrol negatif	2,5100 ± 0,08286 <sup>a</sup>
Kontrol positif	3,2000 ± 0,05715 <sup>b</sup>
Dosis 500 mg/kg BB	3,5650 ± 0,09327 <sup>c</sup>
Dosis 1000 mg/kg BB	2,6900 ± 0,14071 <sup>a</sup>
Dosis 1500 mg/kg BB	2,5875 ± 0,42554 <sup>a</sup>

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Menurut data yang didapat terdapat peningkatan produksi IL-6 secara signifikan ( $p < 0,05$ ) pada kelompok kontrol positif yang diinduksi dengan  $\text{CCl}_4$  dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (lampiran 8). Pada gambar 5.1 dapat dilihat adanya peningkatan kadar IL-6 pada kontrol positif dibandingkan dengan kontrol negatif. Peningkatan respon inflamasi berdampak pada produksi IL-6 secara berlebih. Peningkatan kadar IL-6 berkorelasi dengan aktivasi *Acute Phase Protein* (APP) dan akumulasi ECM pada jaringan hati (Abbas *et al.*, 2007).

Interleukin 6 adalah sitokin proinflamasi yang memediasi terjadinya peradangan. Sitokin IL-6 disintesis oleh sel granulosit, sel *mononuclear*, sel endotel vaskuler, fibroblas, serta beberapa sitokin lain seperti  $\text{TNF-}\alpha$  dan IL-1. Ketika produksi IL-6 meningkat, maka hal ini akan berdampak pada sintesis APP dan aktivasi faktor pertumbuhan fibroblas. Salah satu APP yang berperan adalah *alpha-1-acid glycoprotein*. Penyakit hati yang bersifat kronis akan menimbulkan

produksi IL-6 secara terus menerus sehingga produksi APP meningkat. Peran *alpha-1-acid glycoprotein* ialah meningkatkan interaksi kolagen dan juga faktor pertumbuhan fibroblas. Fibrosis hati disebabkan oleh peningkatan produksi kolagen, yang dimediasi oleh *alpha-1-acid glycoprotein* dan sitokin IL-6 (Sander *et al.*, 2010).

Penurunan produksi sitokin tersebut diperkuat dengan pendapat oleh Elenkov dan Chrousos (2002) yang menyatakan bahwa sitokin merupakan sinyal penting yang dihasilkan oleh sel-sel tubuh untuk mengaktifkan kerja sel lain, sehingga jenis dari sitokin yang disekresikan oleh sel akan memberikan efek pada sel targetnya. Sitokin tersebut dapat beraksi secara *autocrine* sehingga mempengaruhi lingkungan pada sel yang melepaskannya, atau secara *paracrine* yang berpengaruh terhadap sel lain di sekitarnya. Beberapa sitokin juga dapat beraksi secara *endocrine* yang berpengaruh terhadap lingkungan sel di sekitarnya meskipun kemampuannya tergantung saat memasuki sirkulasi maupun waktu paruhnya (*half-life*). Sel granulosit memiliki kemampuan mensekresikan beberapa sitokin sebagai respons terhadap zat toksik antara lain interleukin 1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin 12 (IL-12), *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dan kemokin IL-8 (Handajani dkk., 2015).

Ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) sebagai preventif fibrosis hati terbukti dapat menurunkan produksi IL-6 ditandai dengan adanya penurunan produksi IL-6 secara signifikan ( $p < 0,05$ ) (lampiran 7) dibandingkan kelompok kontrol positif (diinduksi CCl<sub>4</sub>). Hal ini sesuai dengan pendapat Hardianzah (2009) bahwa ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium*

*occidentale*) memiliki kandungan zat aktif berupa flavonoid yang berperan sebagai antiinflamasi.

Pada kelompok kontrol positif, mencit diinduksi  $\text{CCl}_4$  namun tidak diberi ekstrak etanol daun jambu mete. Dalam kondisi sakit, IL-6 diproduksi secara terus menerus oleh sel-sel imun. Produksi IL-6 dipicu oleh keadaan inflamasi yang terjadi pada jaringan hati. Induksi menggunakan  $\text{CCl}_4$  akan dibawa oleh pembuluh darah ke hati. *Carbon tetrachloride* merupakan salah satu penyebab metabolisme xenobiotik. Di dalam hati, terdapat sitokrom  $\text{P}_{450}$  yang akan mengubah  $\text{CCl}_4$  menjadi  $\text{CCl}_3\text{O}_2^-$  dan menjadi radikal bebas yang reaktif. Pemberian  $\text{CCl}_4$  dapat merangsang peningkatan ROS. Metabolisme xenobiotik tersebut meningkatkan respon inflamasi yang akan mengaktifasi respon *innate immunity* dan *adaptive immunity*. Pertahanan oleh *innate immunity* meliputi aktivasi sel-sel imun dan sel endotel. Sel imun yang terlibat dalam reaksi inflamasi antara lain makrofag, sel T, sel NK, dan antibodi. Kerusakan sel merangsang produksi sitokin seperti  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1, dan IL-6. Keadaan tersebut memicu peningkatan IL-6 pada situs inflamasi.

Pada kelompok perlakuan dengan dosis 500 mg/kg BB prosentase IL-6 mengalami peningkatan dan bahkan lebih tinggi dibandingkan dengan prosentase IL-6 pada kelompok kontrol positif. Selain karena induksi  $\text{CCl}_4$ , peningkatan IL-6 dapat dipicu karena kondisi stres dan penurunan nafsu makan pada hewan coba. *Carbontetrachloride* yang masuk ke dalam tubuh bereaksi menjadi  $\text{CCl}_3\text{O}_2^-$  dan secara terus menerus mensintesis produksi IL-6 yang kemudian tidak dapat diredam oleh tubuh.

Pada kelompok perlakuan dengan dosis 1000 mg/kg BB dan kelompok perlakuan dengan dosis 1500 mg/kg BB terjadi penurunan IL-6 secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Penurunan prosentase IL-6 terjadi karena kandungan flavonoid yang terdapat dalam ekstrak etanol daun jambu mete menghambat kondisi stres oksidatif. Flavonoid bekerja dengan cara menyumbangkan elektron-elektron bebasnya pada radikal bebas  $CCl_3O_2^-$  sehingga molekul tersebut menjadi stabil. Kestabilan tersebut memicu reaksi imunitas dalam tubuh, termasuk penurunan produksi sitokin inflamasi yakni IL-6.

Flavonoid berperan sebagai antiinflamasi terhadap kondisi sel hepatosit yang mengalami stres oksidatif. Flavonoid bekerja dengan cara menghambat akumulasi leukosit di situs inflamasi, mengurangi aktivasi komplemen sehingga menurunkan adhesi leukosit ke endotel dan secara langsung terjadi penurunan respon inflamasi tubuh. Fungsi flavonoid sebagai antiinflamasi bekerja dengan cara menghambat pelepasan mediator inflamasi (Abdelmoaty *et al.*, 2010).

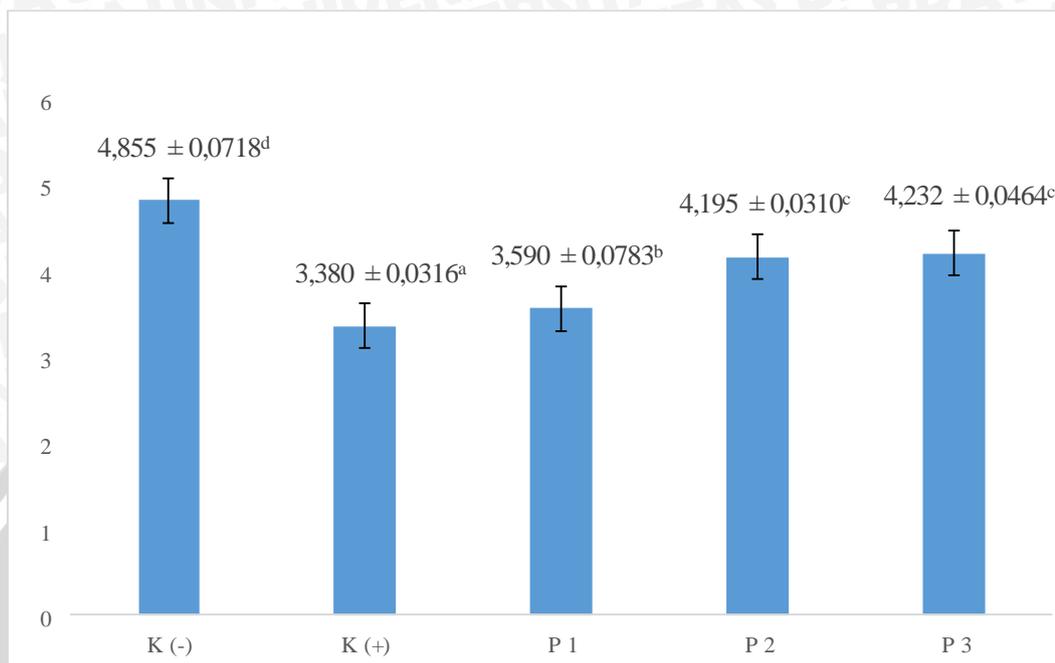
Jumlah IL-6 pada kelompok perlakuan 3 (Dosis 1500 mg/kg BB) mengalami penurunan dibandingkan kelompok kontrol positif. Penurunan produksi IL-6 terjadi pada preventif dosis 500 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB dan 1500 mg/kg BB yang memberikan efek antiinflamasi secara signifikan ( $p < 0,05$ ) dibandingkan kelompok kontrol positif. Kelompok P3 yang diberi ekstrak etanol daun jambu mete dengan dosis 1500 mg/kg BB menunjukkan bahwa dosis yang dipakai adalah dosis paling baik untuk menurunkan produksi IL-6. Hasil deteksi jumlah sel yang memproduksi IL-6 pada kelompok P3 menunjukkan hasil yang

paling baik dengan adanya penurunan yang jelas, bahkan dapat menunjukkan kadar IL-6 yang mendekati kontrol negatif.

### 5.3 Efek Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale*) Terhadap Peningkatan Kadar SOD (*Superoxide Dismutase*)

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) terhadap kadar *Superoxide Dismutase* (SOD) mencit jantan (*Mus musculus*) akibat pemaparan CCl<sub>4</sub> dengan dosis 2 ml/kg BB yang diberikan secara *intraperitoneal* selama 12 hari (Achmad, 2012). *Superoxide Dismutase* merupakan antioksidan endogen yang berperan dalam penstabilan dan penekanan radikal bebas. Perbaikan kerusakan organ hati dapat dilihat berdasarkan adanya peningkatan kadar SOD. Pengukuran kadar SOD pada mencit diamati berdasarkan nilai absorbansi dari sampel organ terhadap reagen yang telah ditambahkan menggunakan spektrofotometer.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) yang dilakukan sebelum pemaparan CCl<sub>4</sub> pada mencit (*Mus musculus*) memiliki efek preventif sebagai antioksidan. Hasil analisis menggunakan spektrofotometer menunjukkan kadar SOD menurun pada kelompok kontrol positif (sakit) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (sehat). Pada kontrol positif kadar SOD adalah 3,38%, sedangkan kadar SOD pada kelompok kontrol negatif adalah 4,855%. Prosentase jumlah sel granulosit meningkat seiring dengan peningkatan dosis ekstrak etanol daun jambu mete seperti terlampir pada gambar 5.2 di bawah ini.



**Gambar 5.4** Grafik Kadar SOD (*Superoxide Dismutase*)

**Keterangan:** K(-): Kontrol negatif, K(+): Kontrol positif, P1: Dosis 500 mg/kg BB, P2: Dosis 1000 mg/kg BB, P3: Dosis 1500 mg/kg BB. Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan data terdistribusi normal dan homogen ( $p > 0,05$ ) sehingga dilanjutkan dengan uji *one way* ANOVA. Uji *one way* ANOVA menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) dapat meningkatkan kadar SOD secara signifikan (Lampiran 10). Pada hasil uji post hoc Tukey (Lampiran 10) menunjukkan bahwa kelompok perlakuan ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) memiliki perbedaan yang nyata, kecuali antara kelompok perlakuan dosis 1000 mg/kg BB dan dosis 1500 mg/kg BB yang ditunjukkan dengan notasi yang sama. Pada perlakuan dosis 500 mg/kg BB, dosis 1000 mg/kg BB dan dosis 1000 ml/kg BB terdapat perbedaan yang nyata dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yang ditandai dengan notasi berbeda (Tabel 5.2).

**Tabel 5.2** Hasil Uji *Tukey* Kadar SOD (*Superoxide Dismutase*)

Kelompok Perlakuan	Rata-rata persentase SOD
Kontrol negatif	4,8550 ± 0,07188 <sup>d</sup>
Kontrol positif	3,3800 ± 0,03162 <sup>a</sup>
Dosis 500 mg/kg BB	3,5900 ± 0,07831 <sup>b</sup>
Dosis 1000 mg/kg BB	4,1950 ± 0,03109 <sup>c</sup>
Dosis 1500 mg/kg BB	4,2325 ± 0,04645 <sup>c</sup>

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan

Menurut data yang didapat terdapat penurunan kadar SOD secara signifikan ( $p < 0,05$ ) pada kelompok kontrol positif yang diinduksi dengan  $\text{CCl}_4$  dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (lampiran 10). Pemberian ekstrak etanol daun jambu mete dengan dosis 500 mg/kg BB, 1000 mg/kg BB dan 1500 mg/kg BB pada Gambar 5.2 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas enzim SOD sebesar 3,59%, 4,19% dan 4,23%. Peningkatan aktivitas SOD dikarenakan adanya antioksidan di dalam ekstrak etanol daun jambu mete. Hal ini sesuai dengan penelitian Thangavel, 2011 bahwa kandungan flavonoid pada daun jambu mete memiliki senyawa antioksidan seperti flavonoid yang diketahui dapat meningkatkan enzim antioksidan endogen seperti *Superoxide dismutase* (SOD).

Mekanisme kerja dari flavonoid sebagai antioksidan bisa secara langsung maupun tidak langsung. Flavonoid sebagai antioksidan secara langsung adalah menghambat proses oksidasi melalui penghambatan inisiasi dan propagasi reaksi oksidasi dari radikal bebas. Antioksidan yang terkandung dalam ekstrak etanol daun jambu mete yaitu flavonoid menyumbangkan atom hidrogen untuk menangkap radikal hidroksil ( $\text{OH}^\cdot$ ) agar tidak menjadi reaktif sehingga mencegah terbentuknya radikal bebas. Flavonoid bekerja melalui penangkapan dan

menghilangkan  $O^-$  pada peroksida nitrit ( $ONOO^-$ ) yang terbentuk dari nitrit oksida (NO) dengan superoksida ( $O_2^-$ ) yang bersifat radikal bebas (Moller *et al.*, 1996).

Kandungan antioksidan ekstrak etanol daun jambu mete menghambat proses inisiasi sehingga dapat mencegah pembentukan radikal lipid yang bersifat tidak stabil karena hilangnya satu atom hidrogen (H) dari molekul lipid akibat radikal hidroksil (OH). Flavonoid sebagai antioksidan secara tidak langsung yaitu dengan meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen melalui beberapa mekanisme. Salah satu mekanisme peningkatan ekspresi gen antioksidan adalah melalui aktivasi *nuclear related factor 2* (Nrf2) sehingga terjadi peningkatan gen yang berperan dalam sintesis enzim antioksidan endogen seperti gen *Superoxide dismutase* (SOD) (Sumardika dan Jawi, 2012).

Antioksidan SOD mengkatalis dismutasi anion  $O_2^-$  yang merupakan oksigen reaktif menjadi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan oksigen ( $O_2$ ) di dalam mitokondria. Enzim SOD merupakan antioksidan endogen yang bersifat enzimatis namun terdapat antioksidan eksogen yang bersifat non enzimatis. Kerjasama antara antioksidan tersebut menyebabkan oksidan yang berada di dalam tubuh dapat dipertahankan konsentrasinya dalam tingkat yang dapat diterima sehingga tidak sampai menimbulkan reaksi inflamasi. Enzim SOD memiliki peran penting dalam pencegahan reaksi oksidatif pada penderita fibrosis hati karena dapat mencegah terbentuknya radikal bebas (Halliwell, 2006).

Hasil penelitian pada kelompok perlakuan menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) dapat berperan sebagai antioksidan pada dosis yang menimbulkan efek yang paling mendekati kontrol

negatif yakni 1500 mg/kg BB. Menurut Valko *et al.*, (2007) hal tersebut dapat terjadi karena flavonoid terdiri dari quercetin, kaempferol dan myricetin dapat meningkatkan aktivitas dan produksi SOD.



## BAB 6. PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa efek preventif pemberian ekstrak daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) pada mencit model fibrosis hati yang diinduksi  $\text{CCl}_4$  adalah sebagai berikut:

1. Pada dosis 1500 mg/kg BB ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) dapat mencegah peningkatan produksi Interleukin 6 (IL-6). Prosentase produksi IL-6 pada kelompok perlakuan dosis 1500 mg/kg BB sebesar 2,58%.
2. Pada dosis 1500 mg/kg BB ekstrak etanol daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) dapat meningkatkan kadar enzim *Superoxide Dismutase* (SOD). Kadar SOD pada kelompok perlakuan dosis 1500 mg/kg BB sebesar 4,23%.

### 6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang fibrosis hati untuk mengetahui dosis optimum, uji toksisitas dan aplikasi penggunaan dari ekstrak daun jambu mete (*Anacardium occidentale*) yang dimanfaatkan sebagai preventif fibrosis hati pada *pet animal*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. 2007. *Cellular And Mollecular Immunology*. International Edition, 6<sup>th</sup> Edition. Saunders Elsevier, USA. 19-39, 262.
- Abdelmoaty, M.A., Ibrahim, M.A., Ahmed, N.S., Abdelaziz, M.A. 2010. Confirmatory Studies on the Antioxidant and Antidiabetic Effect of Quercetin in Rats. *Journal of Science*: 25(2):188- 192. DOI: 10.1007/s12291-010-0034-x.
- Achmad, A. 2012. Uji Bioaktivitas Losartan Terhadap Jaringan Fibrosis Hati Tikus yang Diinduksi Karbon Tetraklorida (CCl<sub>4</sub>). Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan.
- Anderson, P. 2013. *PIER Pathology and Histology*. //http://peir.path.uab.edu/library/picture.php ?/11363/categories&metadata [21 Januari 2016].
- Anshor T., Dominius A., Irwanda, dan Imiawan MI. 2013. IMKU: Supresi Eksprasi CYP1A1 Dan CYP1A2 Pada Hepatocellular Carcinoma Melalui Potensi Formula Herbal Terkombinasi Gynura Procumbens Dan Kulit Jeruk Pontianak (*Citrus Nobilis Var. Microcarpa*) Sebagai Agen Kemopreventif Keganasan Hepar. 2(1): 1-11.
- Arora, K.M.D. 2012. Liver and Intrahepatic Bile Ducts - Non Tumor Normal Histology. //http://PathologyOutlines.com, Inc. [21 Januari 2016].
- Albanis, E., and Friedman, S.L. 2001. Pathogenesis and Principles of Therapy. *Hepatic Fibrosis Clin. Liver Dis*: 5:315–334, v–vi.
- Arrington, L. 2002. *Introductory Laboratory Animal: The Breeding, Care, and Management of Experimental Animal Science*. The Interstate Printers and Publishing, Inc., New York.
- Bataller, R. dan Brenner, D. A. 2005. *The Liver Fibrosis*. *Journal of Clinical Investigation*: 115(2) 179-183.
- Baratawidjaja, K.G., dan Rengganis, I. 2010. *Imunologi Dasar Edisi 10*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia., Jakarta. 234-235, 409-410.
- Catala, A. 2006. Lipid Peroxidation. *Int. Biochem Cell Bio*: 38:1482-95
- Dambal, S. S.and S. Kumari. 2012. Evaluation of Lipid Peroxidation and Total Antioxidant Status in Human Obesity. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*: 2(3) : 62 – 68.

- Elenkov, I.J and G.P. 2002. Stress Hormones, Proinflammatory and Antiinflammatory Cytokine and Autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Science*: (966)290-303.
- Elhiblu, M.A., Dua, K., Mohindroo, J., Mahajan, S.K., Sood, N.K., Dhaliwal, P.S. 2015. *Clinico Hemato Biochemical Profile of Dog With Liver Cirrhosis*. [//www.veterinaryworld.org/Vol.8/April-2015/10.pdf](http://www.veterinaryworld.org/Vol.8/April-2015/10.pdf) [19 Januari 2016].
- Fitriandiny, I.N., 2012. *Uji Efek Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase Fraksi dari Ekstrak Etil Asetat Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale*) dan Penapisan Fitokimia dari Fraksi Teraktif* [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia.
- Fuji, T., Fuchs, B.C., Yamada, S., Lauwers, G., Kulu, Y., Goodwin, J.M., Lanuti, M., Tanabe, K. 2010. Mouse Model Of Carbon Tetrachloride Induced Liver Fibrosis: Histopathological Changes And Expression Of CD133 And Epidermal Growth Factor. *BMC Gastroenterology*:10(79):458-459.
- Goodman, G. 2001. *The Pharmecological Basic of Therapeutics*. 6<sup>th</sup> Edition. Mac Milan Publishing Co, Inc. 701-704.
- Gressner, A.M., Weiskirchen, R., Breitkopf, K., Dooley, S. 2002. Roles of TGF- $\beta$  in Hepatic Fibrosis. *Front Biosci*: 7:D793-807.
- Haaij, D.S. 2006. *Modulation Of Oxidative Stress Parameters In Healty Volunteers By Stresnuous Exercise* [Master Thesis]. University of Pretoria.
- Haki, M. 2009. *Efek Ekstrak Daun Talok (*Muntingia calabura*) terhadap Aktivitas Enzim SGPT Pada Mencit yang Diinduksi Karbon Tetraklorida* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret.
- Halliwell, B., Gutteridge J.M.C. 1999. *Free radical in Biology and Medicine*. London: Oxford University Press.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2006. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Edition. London: Oxford University Press.
- Handajani, Juni O., Purwanto, Ali K. dan Herman I.. 2015. *Penurunan Kadar IL- $\beta$  Makrofag Terpapar Agregat Bakteri *Actinomyces comitans* setelah Pemberian Minyak Atsiri Temu Putih* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Hardianzah, R. 2009. *Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Sayuran Indigenous Jawa Barat* [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.

- Hernawati. 2008. *Bahan Kuliah Struktur Hewan Jaringan Ikat*. Universitas Pendidikan Indonesia. Jakarta.
- Hirano, T., Murakami, M., Ishihara, K., Iwakura, Y., Ueda, N., Kamimura, D., Sawa, S., Kamon, H., Atsumi, T., Kitamura, H., Nakagawa, Park, S.J. 2004. IL-6 Regulates In Vivo Dendritic Cell Differentiation Through STAT3 Activation. *J Immunol*: 173:3844-3854.
- Huang F, Geng XP. 2010. Chemokines And Hepatocellular Carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16(15):1832-1836.
- Ijzer, J. 2008. Liver Fibrosis and Regeneration in Dog and Cat: An Immunohistochemical Approach. *Jurnal of Veterinary Sciences Tomorrow*: The Netherlands, Uthrecht University.
- Jacob, S. 2008. *Animal Anatomy: A Clinically-Orientated Approach*. New York: Churchill Livingstone, Inc.
- Jaiswal, Y.S., Tatke, P.A., Gabhe, S.Y., and Vaidya, A. 2010. Antioxidant Activity of Various Extracts of Leaves of *Anacardium occidentale* (Cashew). *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*: 1 (4). 112-119.
- Junquiera, L.C., and J. Carneiro. 2007. *Basic Histology*. The McGraw-Hill Companies.
- Juniarto, Z.J., dan Juwono. 2003. *Biologi Sel*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kahn, C.M. 2010. *The Merck Veterinary Manual*, Edisi ke-10. Elsevier Health Sciences. London, United Kingdom.
- Kevin C., Kregel, Hannah J., and Zhang. 2006. An Integrated View Of Oxidative Stress In Aging: Basic Mechanisms, Functional Effects, And Pathological Considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*: 292:R18-R36.
- Lamanepa, M. E. L., 2005. *Perbandingan Profil Lipid dan Perkembangan Lesi Aterosklerosis pada Tikus Wistar yang Diberi Diet Perasan Pare dengan Diet Perasan Pare dan Statin* [Tesis]. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Lammert F., Matern, S., and Goos, S. 2002. Genome-wide Analysis of Hepatic Fibrosis Inbred Mice Identifies The Susceptibility Locus Hfib1 on Chromosome 15. *Gastroenterology*: 123:2041-2051.
- Landim, F., Robert, K., Michael, W., and Eduard S.U. 2009. Evaluation of The Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of The Acetone Extract

from *Anacardium occidentale* L. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*: 45(3) 438-441.

Lestari D., 2008. *Efek Protektif dari Lecitin Terhadap Hepatotoksisitas Akibat Induksi Karbon Tertrasklorida pada Tikus Putih (Rattus norvegicus)*. [Tesis] GDLHUB.

Liedtke, C., Leudde, T., Tacke, F., Streetz, K., Trebicka, J., and Tolba, R. 2013. Experimental Liver Fibrosis Research: Update on Animal Models, Legal Tissue and Translational Aspects: Fibrogenesis and Tissue Repair. *Biomed Central*, 6:19.

Mahecha G., Ovalle A., Camelo D., Rozo A., and Barrero D. 2004. *Vegetation 450 Species*. Colombia pp 871.

Manthey, J. A. 2004. Fractination of Orange Peel Phenols In Ultrafiltered Molasses And Mass Balance Studies of Their Antioxidant Levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 52:7586-7592.

Marra F., Aleffi S., Galastri S., and Provenzano A. 2011. Mononuclear Cells in Liver Fibrosis. *Semin Immunopathol* 2009:31(3):345–358.

Moller P., Wallin H., and Knudsen L. 1996. Oxidative Stress Asociated With Exercise, Pshychological Stress And Lifestyle Factors. *Chem Biol Intercat*: 120:17-36.

Montgomery, D., and Kowalsky, S. 2011. Design And Analysis of Experiment. *John Willey an Sains Inc*: 98(2)375.

Pawar, S.P., Metkar, S.D., and Sathwane, P.N. 2000. Anti-inflammatory and Analgesic Acitivity of *Anacardium Occidentale* Leaf Extract. *Ancient Science of Life*:19(34): 169-173.

Pearce, E. C. 2012. *Anatomi dan Fisiologi Untuk Paramedis*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.

Pradana, B.W., Murwani S., dan Winarso, D. 2014. Efek Prevensi Perasan Daun dan Tangkai Semanggi Air (*Marsilea crenata*) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) pada Tikus Putih (*Rattus novergicus*) 1(4): 4-5.

Rantam, F. A. 2003. *Metode Imunologi*. Surabaya, Airlangga University Press. 3-5. 22-23, 30-31.

Rockey, D.C. 2006. Hepatic Fibrosis and Cirrhosis. *Hepatology Journal*: 43:S113–S120.

- Rothuizen, J., Bunch, S.E., Charles, J.A., Cullen, J.M., Desmet, V., Szatmari, V., et al. 2006. *WSAVA Standards For Clinical And Histological Diagnosis Of Canine And Feline Liver Diseases*, pp. 130. Saunders Elsevier, Edinburgh, United Kingdom.
- Sander, L.E., Sackett, S.D., Dierssen, U., Beraza, N., Linke, R.P., Muller, M., Blander, M., Tacke, F., and Trautwein C. 2010. *Hepatic Acute-phase Proteins Control Innate Immune Responses During Infection by Promoting Myeloid-derived Suppressor Cell Function*. //jem.rupress.org, [January 24, 2016].
- Sumardika, I.W. dan Jawi, I.M. 2012. Ekstrak Air Daun Ubi Jalar Ungu Memperbaiki Profil Lipid dan Meningkatkan Kadar SOD Darah Tikus yang Diberi Makanan Tinggi Kolesterol. *Medicina*: 43 : 67-71.
- Suprayogi, 2013. Respon Stress Oksidatif dan Pemberian Isoflavon terhadap Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase dan Peoksidasi Lipid pada Hati Tikus. *JITV*: 18(2): 146-152.
- Thampanitchawong, P., dan Piratvisuth, T. 2007. Liver Biopsy Complications And Risk Factors. *World J. Gastroenterol*: 5:301–304.
- Thangavel, K., Kalaichelva, P., and Arul, D. 2011. Antioxidant and Antimicrobial Activity Using Different Extracts Of *Anacardium Occidentale*. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*: 17(2) Issue-3:436-443.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. 2007. Free Radicals And Antioxidants In Normal Physiological Functions And Human Disease. *Inter J Biochem Cell Biol. Review*: 39:44-84.
- Wresdiyati T, Makita T. 1995. Remarkable Increase Of Peroxisomes In The Renal Tubule Cells Of Japanese Monkeys Under Fasting Stress. *Pathophysiology*: 2:177-182.
- Wijesekera, R.O.B., 2010. *The Medicinal Plant Industry*. Washington, RC Press. pp. 85-90.
- Williams, D.A., Center S., Nicola, D., and Poteet, B. 2005. *Roundtable Discussion: Diagnosing Liver Disease*. IDEXX Laboratories.



# LAMPIRAN



Lampiran 1. Surat Laik Etik Hewan Coba



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARENCE"**

**No:513-KEP-UB**

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

**PENELITIAN BERJUDUL** : PENGARUH PREVENTIF EKSTRAK ETANOL DAUN  
JAMBU METE ( *Anacardium occidentale* ) TERHADAP  
PRODUKSI IL-6 DAN KADAR SOD PADA MENCIT ( *Mus musculus* ) PENDERITA FIBROSIS HATI

**PENELITI** : MARIANA RUTH THERASIA HUTABARAT

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT** : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

**DINYATAKAN** : LAIK ETIK

Malang, 7 Maret 2016  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



**Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.**  
NIP. 19600903 198802 2 001

## Lampiran 2. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete

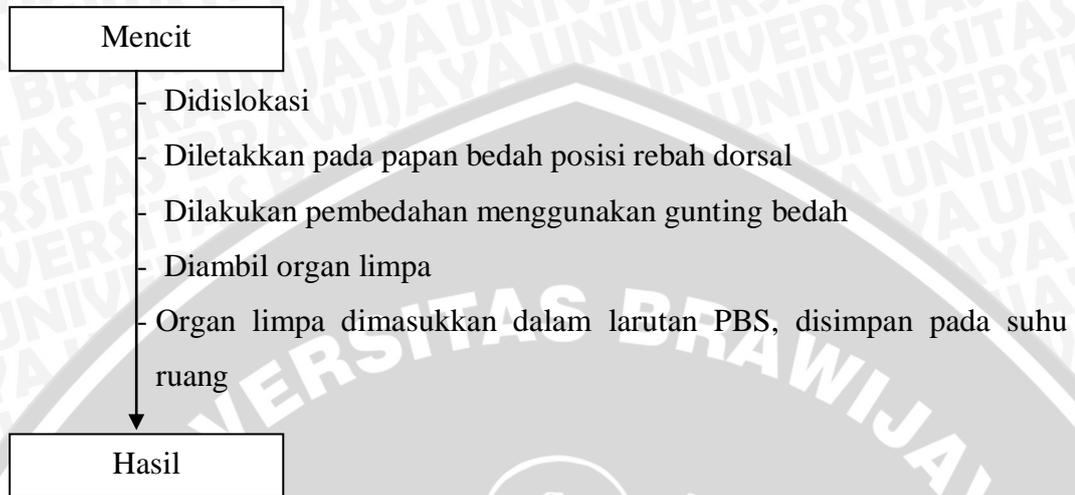
### Daun Jambu Mete

- Dicuci bersih
- Ditimbang simplisia daun jambu mete sebanyak 500 gram, dimasukkan ke dalam erlenmeyer
- Ditambahkan pelarut etanol konsentrasi 70% hingga 3 L
- Diblender hingga halus
- Dihomogenkan dan didiamkan selama 3 hari, kemudian disaring
- Dimasukkan dalam labu evaporasi pada evaporator
- Dilakukan pengisian dengan air sampai penuh dan pemasangan alat: *rotary evaporator*, pemanas *water bath* dengan suhu 40°C
- Disambungkan dengan aliran listrik
- Dibiarkan etanol menguap dari larutan yang ada dalam labu
- Ditunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung selama 1 jam
- Dimasukkan dalam botol
- Disimpan pada *refrigerator*

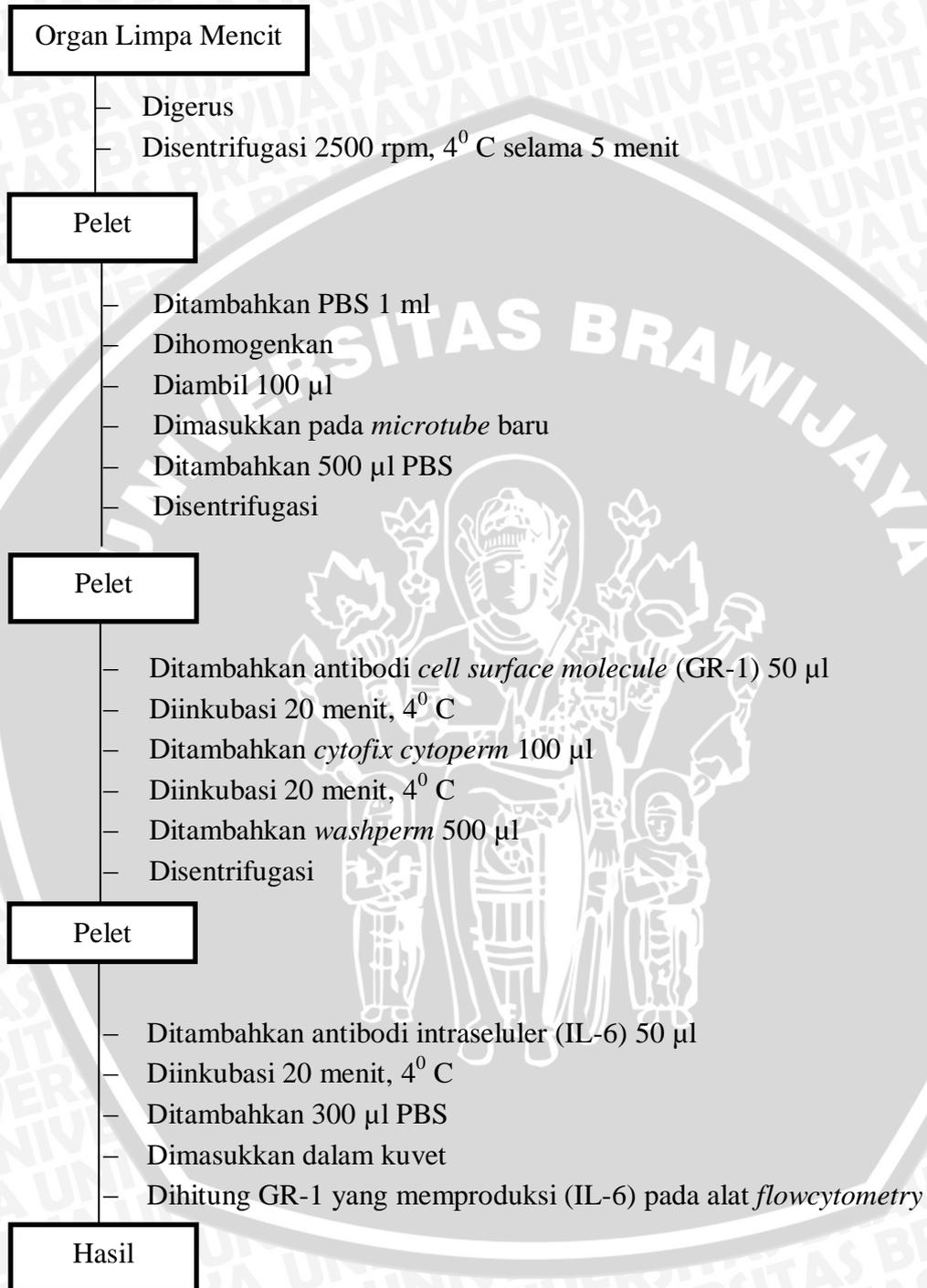
### Ekstrak

### Lampiran 3. Diagram Tahap Penelitian

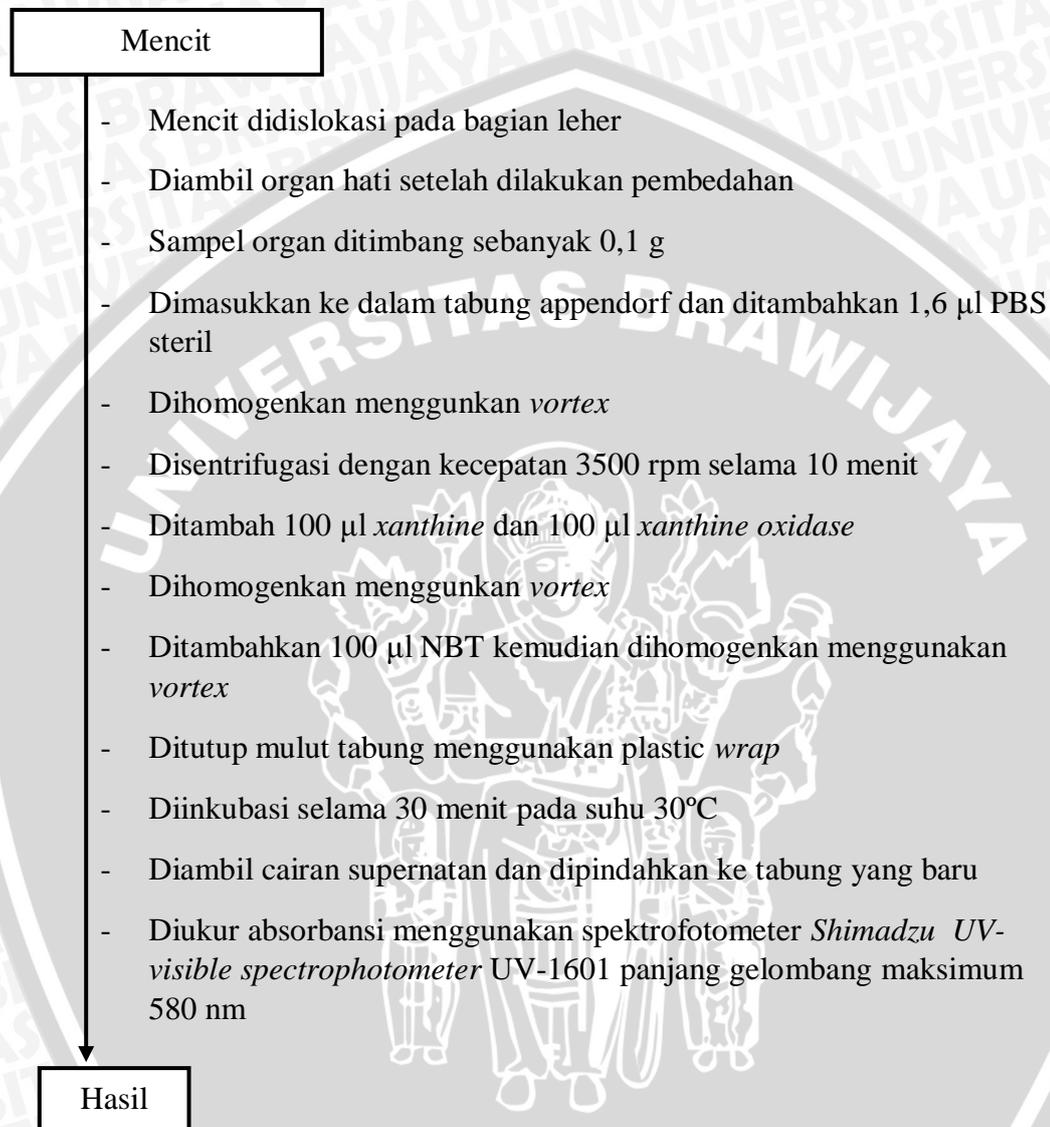
#### Lampiran 3.1 Pembedahan Hewan Coba



### Lampiran 3.2 Alur Tahapan *Flowcytometry*



Lampiran 3.3 Alur Pengukuran Kadar *Superoxide Dismutase* (SOD)  
(Pradana dkk., 2014)



#### Lampiran 4. Perhitungan Dosis Ekstrak Daun Jambu Mete

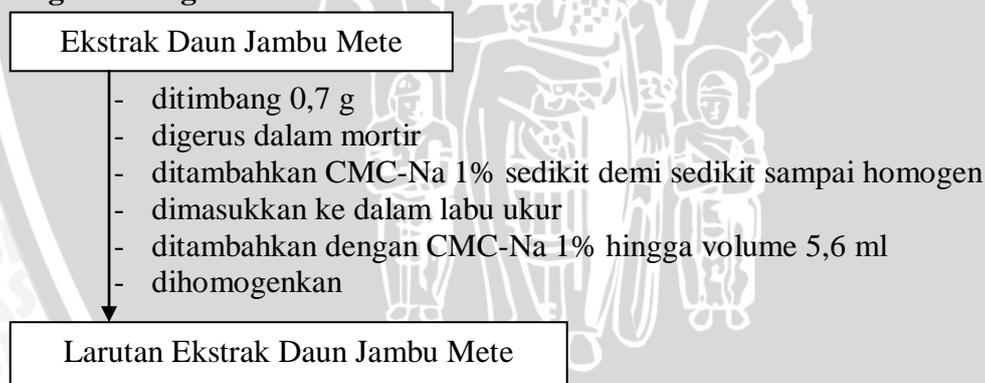
Dosis eksperimental ditentukan berdasarkan penelitian Landim *et al.* (2009) dengan modifikasi sehingga dosis yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 500 mg/kgBB, 1000 mg/kgBB, dan 1500 mg/kgBB. *Lethal dose* (LD50) ekstrak daun jambu mete sebesar 16 g/kgBB (16000 mg/kgBB) pada mencit. Total berat kering daun jambu mete yang digunakan sebesar 500 gram dimaserasi dengan etanol 70% menghasilkan sediaan ekstrak 40 gram.

##### 1. Dosis 1 = 500 mg/kgBB (Kelompok C)

- Perhitungan untuk dosis 500 mg/kgBB
  - Diketahui : Rata-rata berat badan mencit adalah 25 g
  - Dihitung : Dosis x Berat Badan = 500 mg/kgBB x 0,02 kg = 12,5 mg
- Perhitungan untuk satu kelompok perlakuan preventif 500 mg/kgBB
  - Diketahui : Jumlah kelompok preventif 500 mg/kgBB adalah 4 ekor  
Preventif diberikan selama 14 hari
  - Dihitung : 12,5 mg x 4 x 14 = 700 mg = 0,7 g
- Volume pemberian sebanyak 0,1 ml/ekor/hari
- Maka dilakukan pengenceran dalam CMC-Na 1% sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \frac{700 \text{ mg}}{x} &= \frac{12,5 \text{ mg}}{0,1 \text{ ml}} \\ x &= 5,6 \text{ ml} \end{aligned}$$

##### Diagram Pengenceran



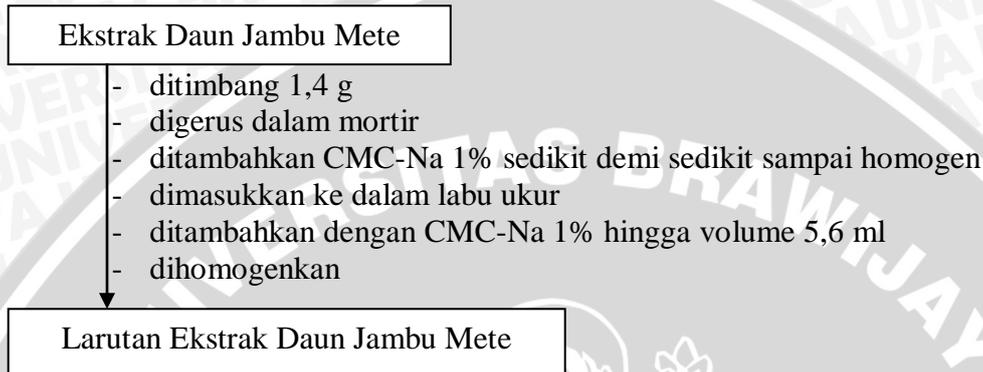
##### 2. Dosis 2 = 1000 mg/kgBB (Kelompok D)

- Perhitungan untuk dosis 1000 mg/kgBB
  - Diketahui : Rata-rata berat badan mencit adalah 25 g
  - Dihitung : Dosis x Berat Badan = 1000 mg/kgBB x 0,025 kg = 25 mg
- Perhitungan untuk satu kelompok perlakuan preventif 1000 mg/kgBB
  - Diketahui : Jumlah kelompok preventif 1000 mg/kgBB adalah 4 ekor  
Preventif diberikan selama 14 hari
  - Dihitung : 25 mg x 4 x 14 = 1400 mg = 1,4 g
- Volume pemberian sebanyak 0,1 ml/ekor/hari

- Maka dilakukan pengenceran dalam CMC-Na 1% sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \frac{1400 \text{ mg}}{x} &= \frac{25 \text{ mg}}{0,1 \text{ ml}} \\ x &= 5,6 \text{ ml} \end{aligned}$$

### Diagram Pengenceran

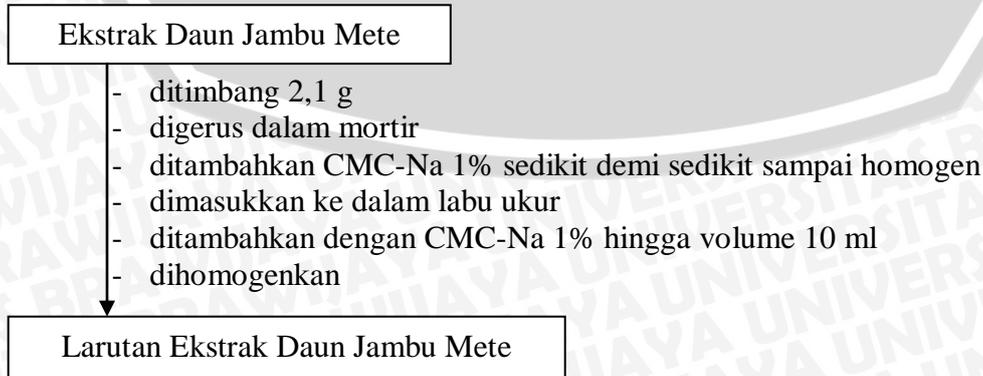


### 3. Dosis 3 = 1500 mg/kgBB (Kelompok E)

- Perhitungan untuk dosis 1500 mg/kgBB  
Diketahui : Rata-rata berat badan mencit adalah 25 g  
Dihitung : Dosis x Berat Badan = 1500 mg/kgBB x 0,025 kg = 37,5 mg
- Perhitungan untuk satu kelompok perlakuan preventif 1500 mg/kgBB  
Diketahui : Jumlah kelompok preventif 1500 mg/kgBB adalah 4 ekor  
Preventif diberikan selama 14 hari  
Dihitung : 37,5 mg x 4 x 14 = 2100 mg = 2,1 g
- Volume pemberian sebanyak 0,1 ml/ekor/hari
- Maka dilakukan pengenceran dalam CMC-Na 1% sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \frac{2100 \text{ mg}}{x} &= \frac{37,5 \text{ mg}}{0,1 \text{ ml}} \\ x &= 5,6 \text{ ml} \end{aligned}$$

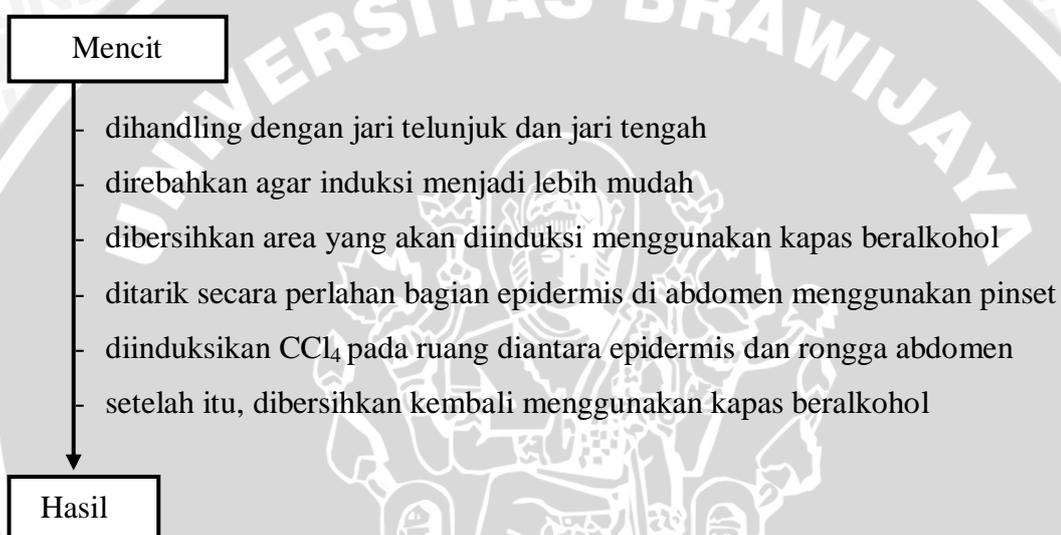
### Diagram Pengenceran



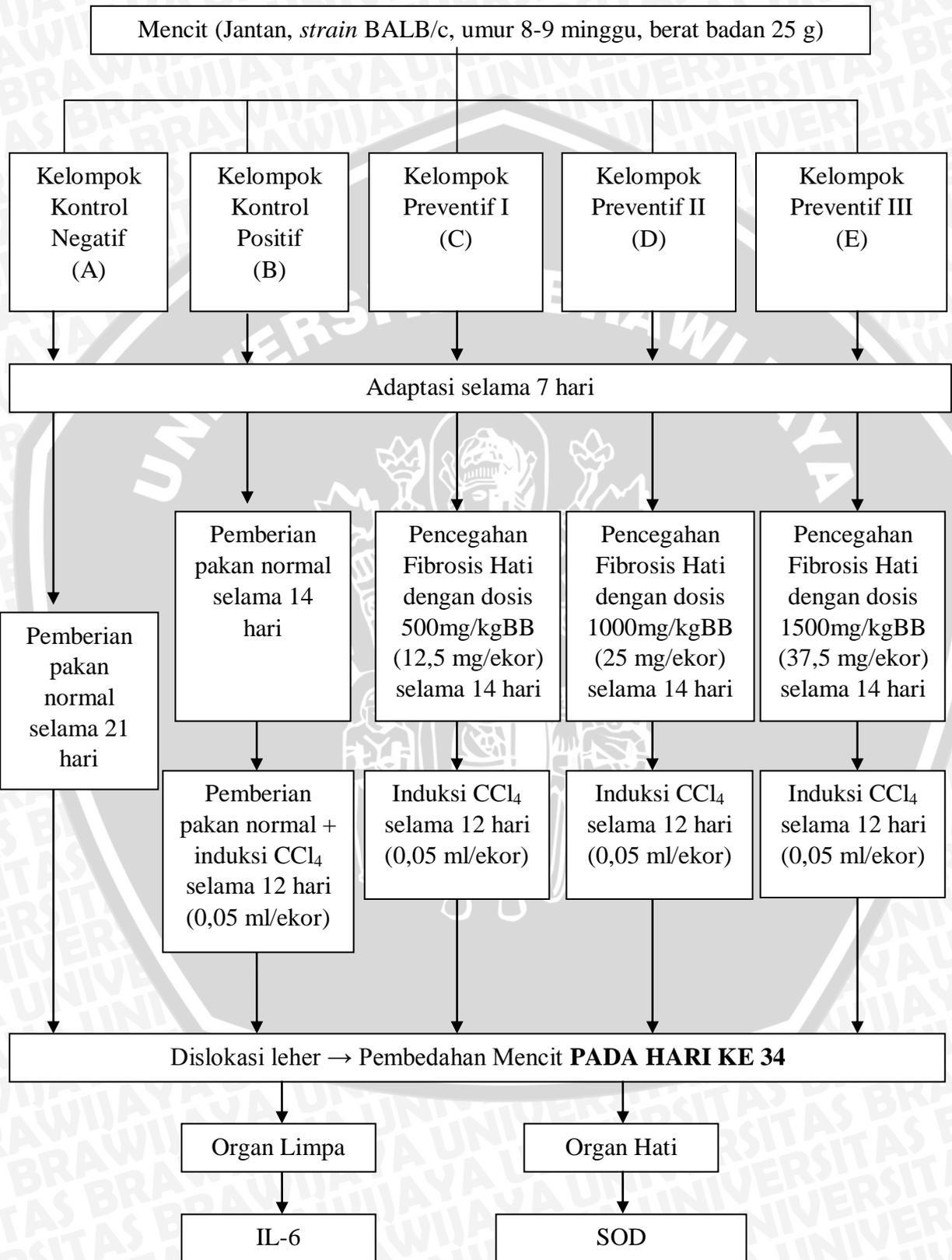
### Lampiran 5. Perhitungan Induksi CCl<sub>4</sub>

- Dosis induksi CCl<sub>4</sub> = 2 ml/kg BB diberikan secara intraperitoneal sekali dalam sehari selama 12 hari (Achmad, 2012)
- Volume pemberian CCl<sub>4</sub> per ekor (25 gram) = 0,05 ml
- Perbandingan antara CCl<sub>4</sub> : Minyak jagung = 1 : 1  
Sehingga dari 0,05 ml terdiri dari 0,025 ml CCl<sub>4</sub> dan 0,025 ml minyak jagung.

### Tahapan Induksi CCl<sub>4</sub>

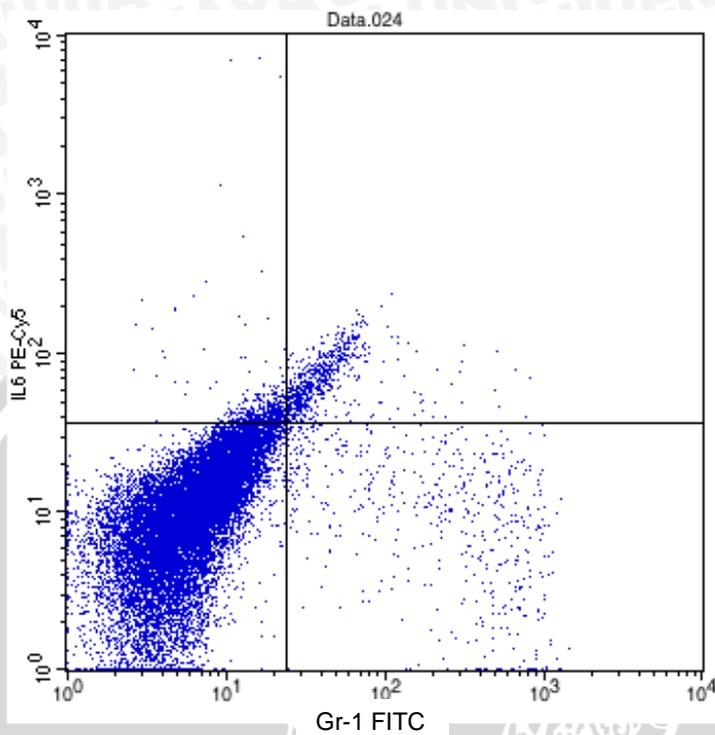


## Lampiran 6. Skema Tahap Penelitian

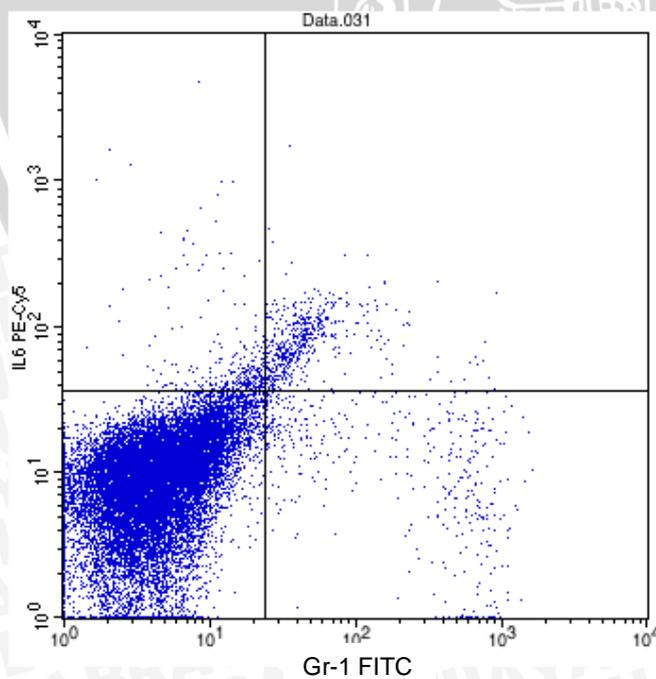


Lampiran 7. Hasil Uji *Flowcytometry* Penentuan Produksi IL-6

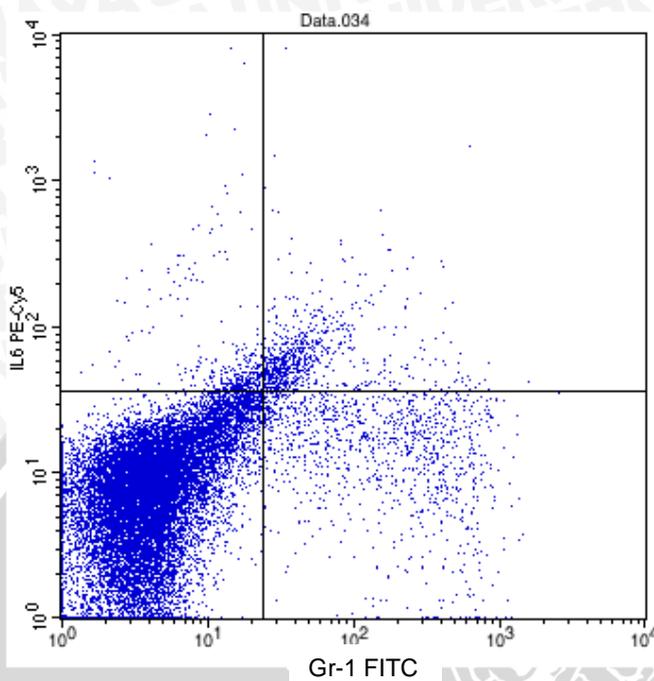
1. Kontrol Positif



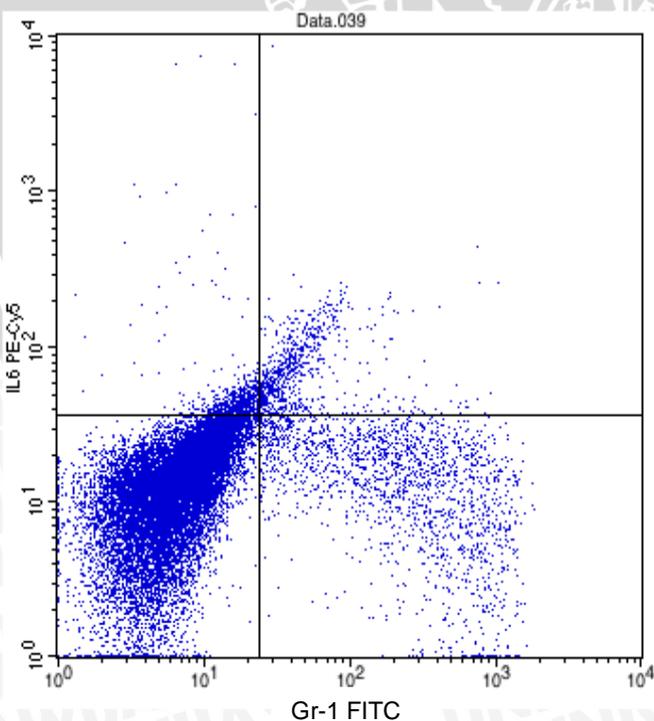
2. Kontrol Negatif



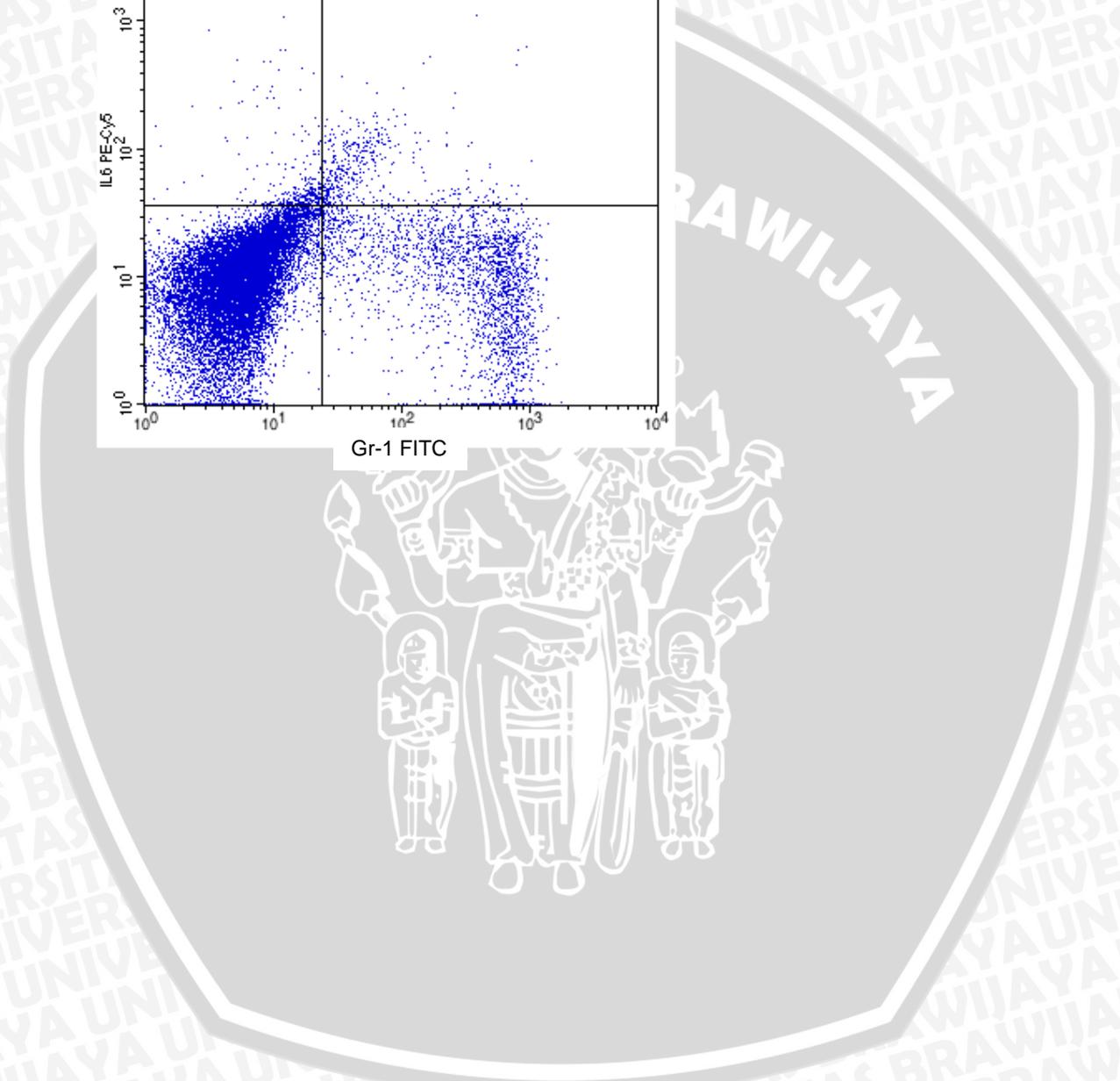
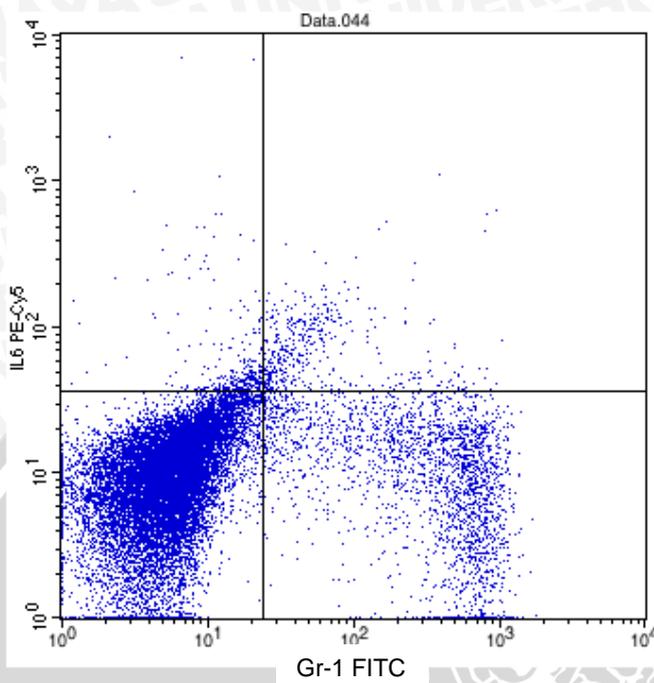
### 3. Dosis 500 mg/kg BB



### 4. Dosis 1000 mg/kg BB



### 5. Dosis 1500 mg/kg BB



## Lampiran 8. Hasil Uji Statistik IL-6

### 1. Data Deskriptif

Descriptives								
IL6	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Kontrol -	4		
Kontrol +	4	3.20000	.057155	.028577	3.10905	3.29095	3.130	3.260
500	4	3.56500	.093274	.046637	3.41658	3.71342	3.460	3.670
1000	4	2.69000	.140712	.070356	2.46610	2.91390	2.540	2.870
1500	4	2.58750	.086939	.043469	2.44916	2.72584	2.480	2.680
Total	20	2.91050	.425546	.095155	2.71134	3.10966	2.410	3.670

### 2. Uji Normalitas

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for IL6	.137	20	.200*	.975	20	.858

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

### 3. Uji Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

IL6			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.989	4	15	.443

#### 4. Uji *One-way* ANOVA

ANOVA					
IL6					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.302	4	.826	89.359	.000
Within Groups	.139	15	.009		
Total	3.441	19			

#### 5. Uji *Post Hoc* Tukey

IL6				
Tukey HSD				
Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol -	4	2.51000		
1500	4	2.58750		
1000	4	2.69000		
Kontrol +	4		3.20000	
500	4			3.56500
Sig.		.111	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

## Lampiran 9. Hasil Uji Kadar SOD Menggunakan Spektrofotometer

Kurva Standart SOD

NO	Aktivitas (U/MI)	Abs
1	10	0,284
2	20	0,450
3	40	0,839
4	80	1,560
5	100	1,887

Hasil Uji SOD

NO	Sampel	Abs	Aktivitas (U/MI)
1	K+ 1	0,134	3,400
2	K+ 2	0,166	3,370
3	K+ 3	0,170	3,340
4	K+ 4	0,174	3,410
<b>Rata-rata</b>			<b>3,380</b>
5	K - 1	0,184	4,950
6	K - 2	0,177	4,810
7	K - 3	0,199	4,870
8	K - 4	0,194	4,790
9	K - 5	0,196	5,067
<b>Rata-rata</b>			<b>4,884</b>
10	P1 1	0,175	3,670
11	P1 2	0,174	3,570
12	P1 3	0,203	3,490
13	P1 4	0,171	3,630
<b>Rata-rata</b>			<b>3,590</b>
14	P2 1	0,164	4,230
15	P2 2	0,149	4,180
16	P2 3	0,206	4,160
17	P2 4	0,181	4,210
<b>Rata-rata</b>			<b>4,195</b>
18	P3 1	0,180	4,280
19	P3 2	0,180	4,250
20	P3 3	0,182	4,170
21	P3 4	0,178	4,230
<b>Rata-rata</b>			<b>4,233</b>

## Lampiran 10. Hasil Uji Statistik SOD

### 1. Data Deskriptif

Descriptives								
SOD	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol -	4	4.85500	.071880	.035940	4.74062	4.96938	4.790	4.950
Kontrol +	4	3.38000	.031623	.015811	3.32968	3.43032	3.340	3.410
500	4	3.59000	.078316	.039158	3.46538	3.71462	3.490	3.670
1000	4	4.19500	.031091	.015546	4.14553	4.24447	4.160	4.230
1500	4	4.23250	.046458	.023229	4.15858	4.30642	4.170	4.280
Total	20	4.05050	.537915	.120281	3.79875	4.30225	3.340	4.950

### 2. Uji Normalitas

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Residual for SOD	.119	20	.200*	.988	20	.994

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

### 3. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances			
SOD			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.607	4	15	.224

#### 4. Uji *One-way* ANOVA

ANOVA					
SOD	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.451	4	1.363	441.768	.000
Within Groups	.046	15	.003		
Total	5.498	19			

#### 5. Uji *Post Hoc* Tukey

SOD					
Tukey HSD					
Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Kontrol +	4	3.38000			
500	4		3.59000		
1000	4			4.19500	
1500	4			4.23250	
Kontrol -	4				4.85500
Sig.		1.000	1.000	.871	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 11. Determinasi Tanaman Jambu Mete (*Anacardium occidentale*)



DINAS KESEHATAN PROPINSI JAWA TIMUR  
UPT MATERIA MEDICA

Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313)

KOTA BATU

Nomor : 074/620/101.8/2015  
Sifat : Biasa  
Perihal : **Determinasi Tanaman Jambu Mete**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama/ NIM : VISTI AJENG NAVAL / 115130101111067  
MARIANA RUTH T. H. / 125130100111025  
PRAYOGA DWI S. / 125130100111032  
ISTIMOROL INSHIROH / 125130101111026  
SANDRA RINI S. / 125130101111034  
Instansi : FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Perihal determinasi tanaman jambu mete

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)  
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)  
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)  
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)  
Kelas : Dicotyledonae  
Bangsa : Sapindales  
Suku : Anacardiaceae  
Marga : Anacardium  
Jenis : *Anacardium occidentale* L.  
Nama Daerah : Jambu monyet, jamu mente (Indonesia); jambu mete (Jawa), jambu mede (Sunda); gaju (Lampung).

Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15ba-197b-208b- 219b-220b-224b-225b-227b-229b-230b-234b-235b-236b-237a-238b-1a-2b-2.

2. Morfologi

Habitus: Pohon, tinggi ±12 m. Batang: Berkayu, bulat, bergetah, putih kotor. Daun: Tunggal, bulat telur, tepi rata, pangkal runcing, ujung membulat, panjang 8-22 cm, lebar 5-13 cm, pertulangan menyirip, hijau. Bunga: Majemuk, bentuk malai, di ketiak daun dan di ujung cabang, daun pelindung bulat telur, panjang 5-10 mm, hijau, kelopak berambut, panjang 4-5 mm, hijau muda, mahkota runcing, masih muda putih setelah tua merah. Buah: Batu, keras, melengkung, panjangnya ±3 cm, hijau kecoklatan. Biji: Bulat panjang, melengkung, pipih, putih. Akar: Tunggang, coklat.

3. Nama Simplicia

: Anacardii Folium/ Daun Jambu Mete.

4. Kandungan

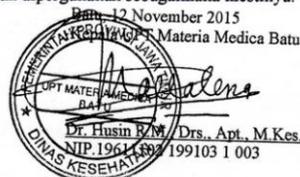
: Daun jambu mete mengandung senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid, saponin, tanin dan steroid yang mempunyai aktivitas antioksidan. Selain sebagai antioksidan, ekstrak daun jambu mete juga mempunyai efek antimikroba/ antibakteri. Ekstrak dari daun kering terbukti mempunyai efek anti-inflamasi dan analgesik. Daun jambu monyet yang masih muda mempunyai komposisi kandungan kimia (per 100 g): vitamin A 2689 SI, vitamin C 65 g, kalori 73 g, protein 4.6 g, lemak 0.5 g, hidrat arang 16.3 g, kalsium 33 mg, fosfor 64 mg, besi 8.9 mg, dan air 78 g.

5. Penggunaan : Penelitian.

6. Daftar Pustaka

- Anonim. <http://www.iptek.net.id/jambumonyet>, diakses 20 Oktober 2010.
- Anonim. [http://www.plantamor.com/jambu\\_monyet](http://www.plantamor.com/jambu_monyet), diakses 9 Desember 2010.
- Anonim. [http://www.warintek.ristek.go.id/jambu\\_monyet](http://www.warintek.ristek.go.id/jambu_monyet), diakses 30 Oktober 2010.
- Kusumowati, I.T.D., R. Melannisa, K. Ratri. 2011. Korelasi Kandungan fenolik dan aktivitas antioksidan daun jambu mete. *Biomedika* 3(2): 25-30.
- S.P. Pawar, P.N.Sathwane, B.R. Metkar, S.C.Pal, V.S. Kasture, S.B. Kasture. 2000. Anti - Inflammatory and analgesic Activity of *Anacardium occidentale* Leaf Extracts. *Ancient Science of Life* XIX (3&4): 169-173.
- Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Hutapea, Johny Ria. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (IV)*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA*. Pradnya Paramita, Jakarta.
- Vijayakumar A.D. & K.P. Thangavel. 2011. Antioxidant and antimicrobial activity using different extracts of *Anacardium occidentale* L. *Intl. Journal of App. Biol. and Pharm. Tech.* 2 (3): 436-443.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.



## Lampiran 12. Komparasi Kandungan Flavonoid Tanaman di Jawa Barat

Sampel	total fenol <sup>A</sup>	konsentrasi (mg/100 sampel kering)							KA (% wet basis)
		total flavonoid	total flavonol	flavonol			flavone		
				quarcetin	kaempferol	myricetin	luteolin	apigenin	
Bunga turi	<sup>h</sup> 223,7 ± 5.1	<sup>c</sup> 217,4 ± 3.6	<sup>c</sup> 217,4 ± 3.6	<sup>i</sup> 28,3 ± 0,6	<sup>a</sup> 189,1 ± 3,2	-	-	-	<sup>a</sup> 90.2 ± 0.1
Kuca	<sup>j</sup> 211,7 ± 20.1	<sup>h</sup> 89,4 ± 1.5	<sup>h</sup> 89,4 ± 1.5	<sup>i</sup> 27,0 ± 0,5	<sup>f</sup> 46,2 ± 0,9	<sup>d</sup> 16,2 ± 0,1	-	-	<sup>g</sup> 83.4 ± 0.3
Takokak	<sup>b</sup> 860,3 ± 9.7	<sup>i</sup> 27,4 ± 0.7	<sup>i</sup> 27,4 ± 0.7	<sup>j</sup> 6,1 ± 0,1	-	<sup>e</sup> 21,3 ± 0,6	-	-	<sup>h</sup> 89.2 ± 0.2
Daun kelor	<sup>d</sup> 536,1 ± 7.9	<sup>b</sup> 473,3 ± 9.6	<sup>b</sup> 468,3 ± 9.3	<sup>b</sup> 384,6 ± 7,9	<sup>b</sup> 83,4 ± 1,4	-	5,3 ± 0,2	-	<sup>h</sup> 75.1 ± 0.2
Pucuk mengkudu	<sup>i</sup> 236,4 ± 1.6	<sup>g</sup> 201,4 ± 14.5	<sup>f</sup> 201,4 ± 14.5	<sup>e</sup> 142,6 ± 9,7	<sup>d</sup> 58,8 ± 4,2	-	-	-	<sup>e</sup> 83.4 ± 0.5
Lembayung	<sup>f</sup> 438,3 ± 5.7	<sup>c</sup> 386,3 ± 10.2	<sup>d</sup> 253,4 ± 7.6	<sup>e</sup> 242,0 ± 6,6	<sup>g</sup> 29,5 ± 1,0	-	-	<sup>a</sup> 114,8 ± 2,6	<sup>bc</sup> 88.7 ± 0.5
Terubuk	<sup>a</sup> 204,4 ± 14.4	<sup>j</sup> 3,8 ± 0,1	<sup>j</sup> 3,8 ± 0,1	<sup>j</sup> 3,8 ± 0,1	-	-	-	-	<sup>e</sup> 88.4 ± 0.1
Mangkogan putih	<sup>e</sup> 491,0 ± 7.5	<sup>c</sup> 215,0 ± 4.6	<sup>g</sup> 169,5 ± 2.4	<sup>f</sup> 83,8 ± 0,7	<sup>b</sup> 85,7 ± 1,7	-	-	<sup>c</sup> 45,5 ± 2,2	<sup>d</sup> 84.9 ± 0.1
Daun labu siam	<sup>f</sup> 412,6 ± 9.9	<sup>g</sup> 200,1 ± 2.4	<sup>f</sup> 200,1 ± 2.4	<sup>g</sup> 76,7 ± 0,9	<sup>e</sup> 54,0 ± 0,8	<sup>a</sup> 69,4 ± 0,7	-	-	<sup>f</sup> 82.0 ± 0.6
Bunga papaya	<sup>g</sup> 376,2 ± 12.2	<sup>c</sup> 306,8 ± 5.2	<sup>f</sup> 205,7 ± 2.8	<sup>d</sup> 159,4 ± 0,9	<sup>f</sup> 46,3 ± 1,9	-	-	<sup>b</sup> 101,1 ± 2,4	<sup>e</sup> 88.2 ± 0.4
Pucuk mete	<sup>a</sup> 2809,5 ± 11.1	<sup>a</sup> 656,3 ± 6.9	<sup>a</sup> 656,3 ± 6.9	<sup>a</sup> 573,1 ± 5,9	<sup>f</sup> 45,3 ± 0,3	<sup>b</sup> 37,9 ± 0,7	-	-	<sup>g</sup> 78.1 ± 0.1
Pakis	<sup>h</sup> 306,7 ± 2.2	<sup>h</sup> 84,4 ± 0.6	<sup>h</sup> 84,4 ± 0.6	<sup>h</sup> 65,8 ± 0,5	<sup>h</sup> 18,6 ± 0,1	-	-	-	<sup>bc</sup> 88.7 ± 0.1
Antanan beurit	<sup>e</sup> 805,5 ± 12.8	<sup>d</sup> 332,2 ± 5.5	<sup>c</sup> 332,2 ± 5.5	<sup>c</sup> 249,5 ± 4,4	<sup>e</sup> 72,2 ± 1,0	<sup>e</sup> 10,5 ± 0,1	-	-	<sup>d</sup> 85.0 ± 0.2

<sup>A</sup> : total fenol dihitung berdasarkan mg asam gallat / 100 g sampel kering, (-) tidak terdeteksi

Sumber : Hardianzah, 2009.