

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

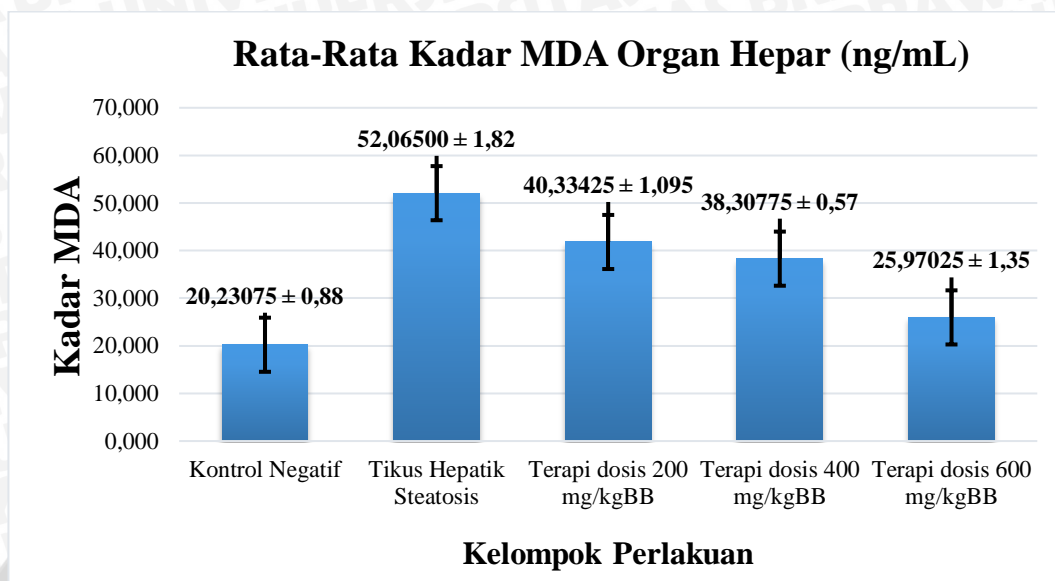
5.1 Pengaruh terapi Ekstrak Kapulaga Hijau (*Elettaria cardamomum*) terhadap kadar malondialdehid (MDA) tikus (*Rattus norvegicus*) model hepatik steatosis hasil induksi CCl₄

Malondialdehid merupakan penanda adanya stres oksidatif. Pengukuran kadar MDA organ hepar yang dilakukan pada penelitian ini adalah menggunakan metode *thiobarbituric acid* (TBA) yang selanjutnya dapat diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 532,8 nm. Hasil pengukuran kadar malondialdehid (MDA) organ hepar pada kelompok tikus perlakuan (**lampiran 10.**) dilakukan analisa secara statistik menggunakan *Statistical Product of Service Solution* (SPSS) 22.0 for windows 8 dengan uji *one way* ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau *Tukey* (**lampiran 12.**) dengan tingkat kepercayaan 95%. Hasil analisa tersebut ditunjukkan pada **tabel 5.1** dan grafik perbandingan kadar MDA organ hepar dapat dilihat pada **gambar 5.1**.

Tabel 5.1 Kadar Malondialdehid (MDA) Organ Hepar Tikus Pada Kelompok Perlakuan

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Kadar MDA (ng/ml) \pm SD	Kadar MDA Pada Masing-Masing Kelompok Perlakuan (%)
Tikus Kontrol Negatif	20,23075 \pm 0,881163 ^a	38,8
Tikus Model Hepatik Steatosis	52,06500 \pm 1,818774 ^d	100
Terapi 200 mg/kg BB	40,33425 \pm 1,094608 ^c	80,3
Terapi 400 mg/kg BB	38,30775 \pm 0,573505 ^c	73,6
Terapi 600 mg/kg BB	25,97025 \pm 1,353050 ^b	49,8

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang sangat signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan.



Gambar 5.1 Grafik perbandingan kadar malondialdehid (MDA) organ hepar tikus pada kelompok perlakuan

Berdasarkan kadar MDA pada masing-masing kelompok perlakuan (**tabel 5.1**), dihasilkan persentase perbandingan antara kelompok tikus kontrol negatif dan terapi dengan tikus model hepatic steatosis. Tikus model hepatic steatosis dianalogikan mempunyai kadar MDA tertinggi yaitu 100 %, sehingga didapatkan hasil pada masing-masing kelompok tikus kontrol negatif; terapi dosis 200 mg/kg BB; 400 mg/kg BB dan 600 mg/kg BB adalah 38,8 %; 80,3 %; 73,6 % dan 49,8 %.

Berdasarkan tabel diatas (**tabel 5.1**), hasil analisa uji *one way* ANOVA dan uji *Tukey* menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak kapulaga hijau dapat menurunkan kadar MDA organ hepar secara signifikan ($p < 0,05$) dan menunjukkan perbedaan yang sangat nyata. Analisa statistik pada kadar MDA kelompok tikus kontrol negatif dengan kadar MDA kelompok tikus hepatic steatosis menunjukkan hasil bahwa kedua kelompok perlakuan tersebut memiliki perbedaan yang sangat signifikan ($p < 0,05$) dimana ditunjukkan dengan adanya perbedaan notasi dari hasil

Post Hoc menggunakan uji *Tukey*. Pada persentase kadar MDA hepar kelompok tikus hepatic steatosis juga ditunjukkan mengalami peningkatan sebesar 61,2 % jika dibandingkan dengan tikus kelompok kontrol negatif. Hal ini disebabkan adanya pengaruh yang signifikan dari induksi CCl_4 dengan dosis tinggi sekali pemberian menurut Al-Yahya *et al.* (2013) dapat meningkatkan kadar MDA organ hepar. Malondialdehid (MDA) merupakan salah satu penanda adanya radikal bebas yang berlebih di dalam jaringan sehingga dapat menyebabkan kerusakan sel hepar.

Pada hasil uji *Tukey* kelompok terapi ekstrak kapulaga hijau dosis 200 mg/kg BB, 400 mg/kg BB dan 600 mg/kg BB mempunyai perbedaan yang sangat signifikan jika dibandingkan dengan kelompok tikus hepatic steatosis yang ditunjukkan dengan perbedaan notasi pada keempat kelompok tersebut. Adanya perbedaan yang signifikan tersebut menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak kapulaga hijau (*Elettaria cardamomum*) memberikan pengaruh yang nyata dalam menurunkan kadar MDA organ hepar. Hasil uji *Tukey* kelompok terapi memberikan hasil berbeda nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan kontrol negatif yang ditunjukkan dengan notasi yang berbeda, sedangkan antara kelompok dosis 200 mg/kg BB dengan dosis 400 mg/kg BB tidak memberikan pengaruh perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) yang ditunjukkan dengan notasi sama walaupun terdapat penurunan kadar MDA organ hepar yang dapat dilihat pada penurunan persentase kadar MDA masing-masing dosis 200 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB adalah 41,5 % dan 34,8 %. Terapi dosis 200 mg/kg BB dengan 400 mg/kg BB menunjukkan hasil bahwa efek antioksidan dalam menurunkan kadar MDA tidak jauh berbeda. Faktor yang dapat menyebabkan hal tersebut terjadi yaitu kandungan antioksidan yang terdapat pada

dosis terapi 200 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB memiliki jumlah antioksidan flavonoid yang hampir sama. Hal tersebut juga sesuai dengan pernyataan Husen dan Sastramihardja (2012), bahwa perbandingan efek antara dosis 125 mg/kg BB dengan dosis 250 mg/kg BB memberikan efek yang tidak berbeda secara signifikan karena kedua dosis yang digunakan lebih kecil daripada dosis terbaik dan jumlah antioksidan yang diberikan juga hampir sama dalam perbandingan dosis tersebut sehingga efek penurunan MDA pada hepar juga tidak jauh berbeda. Pemberian terapi ekstrak kapulaga hijau hasil uji *Tukey* pada dosis 600 mg/kg BB dapat menekan adanya peningkatan kadar MDA di dalam hepar yang diakibatkan oleh induksi CCl₄, maka dosis terapi tersebut merupakan dosis yang terbaik dan signifikan ($p < 0,05$) serta terdapat perbedaan nyata dalam menurunkan kadar MDA pada organ hepar yang ditunjukkan dengan persentase penurunan kadar MDA organ hepar yaitu 11% jika dibandingkan dengan kelompok yang tidak diterapi serta kelompok terapi dosis 200 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB.

Malondialdehid adalah senyawa organik yang mempunyai rumus kimia berupa CH₂(CHO)₂. MDA dalam sel dihasilkan dari proses peroksidase lipid oleh ROS. *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat mendegradasi *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) yang menghasilkan MDA di dalam tubuh. Peningkatan kadar MDA dipengaruhi oleh produksi ROS yang semakin meningkat, sehingga MDA digunakan sebagai salah satu penanda untuk mengetahui adanya stres oksidatif di dalam tubuh (Bruch and Janet, 2012).

Pada kelompok kontrol negatif terdapat kadar MDA tetapi masih dalam kondisi normal. Adanya kadar MDA pada kelompok kontrol negatif tersebut

menunjukkan bahwa pada kondisi normal ataupun sehat juga masih terdapat radikal bebas. Menurut Jian *et al.* (2010), tubuh secara fisiologis memproduksi radikal bebas yang salah satunya berasal dari proses respirasi aerob di mitokondria oleh enzim NADH oksidase, XO (*xanthine oksidase*), monooksigenase, dan siklooksigenase, menghasilkan radikal $O_2^{\cdot-}$. Radikal bebas juga dapat berasal dari proses fagositosis sel makrofag, berupa $O_2^{\cdot-}$. Sel fagosit tersebut memproduksi radikal $O_2^{\cdot-}$ dalam jumlah besar oleh enzim NADPH oksidase sebagai bentuk proses eliminasi patogen.

Hepar memetabolisme hampir setiap obat atau toksin yang masuk ke dalam tubuh, tetapi beberapa hasil dari metabolisme obat atau toksin tersebut dapat langsung menyebabkan toksisitas hepar tergantung individu masing-masing dan seberapa sering terpapar oleh obat atau toksin tersebut. Salah satu jenis hepatotoksikan yang dapat langsung menyebabkan toksisitas pada hepar adalah CCl_4 . Mekanisme kerja metabolisme obat atau toksin di hepar terjadi melalui dua langkah yaitu fase I dan fase II. Pada reaksi fase pertama, obat atau toksin akan diubah menjadi lebih polar melalui proses oksidasi atau hidrosilasi yang dikatalis oleh enzim sitokrom P450. Sebagian besar produk intermediet yang dihasilkan dari reaksi fase I bersifat sangat reaktif. Reaksi ini dapat menghasilkan pembentukan metabolit yang lebih bersifat toksin daripada senyawa obat atau toksin sebelumnya sehingga dapat menyebabkan kerusakan pada hepar. Pada fase II terjadi proses konjugasi dengan senyawa seperti asetat, asam amino, sulfat, glutation atau asam glukoronat. Obat atau toksin dengan berat molekul yang tinggi selanjutnya akan dieksresikan ke dalam empedu, sedangkan ginjal mengeksresikan molekul yang

lebih kecil dan bersifat larut air (Bigoniya *et al.*, 2009). Proses metabolisme CCl_4 berlangsung pada fase I, dimana pada fase ini CCl_4 dikatalis oleh enzim sitokrom P450 yang berada di retikulum endoplasma.

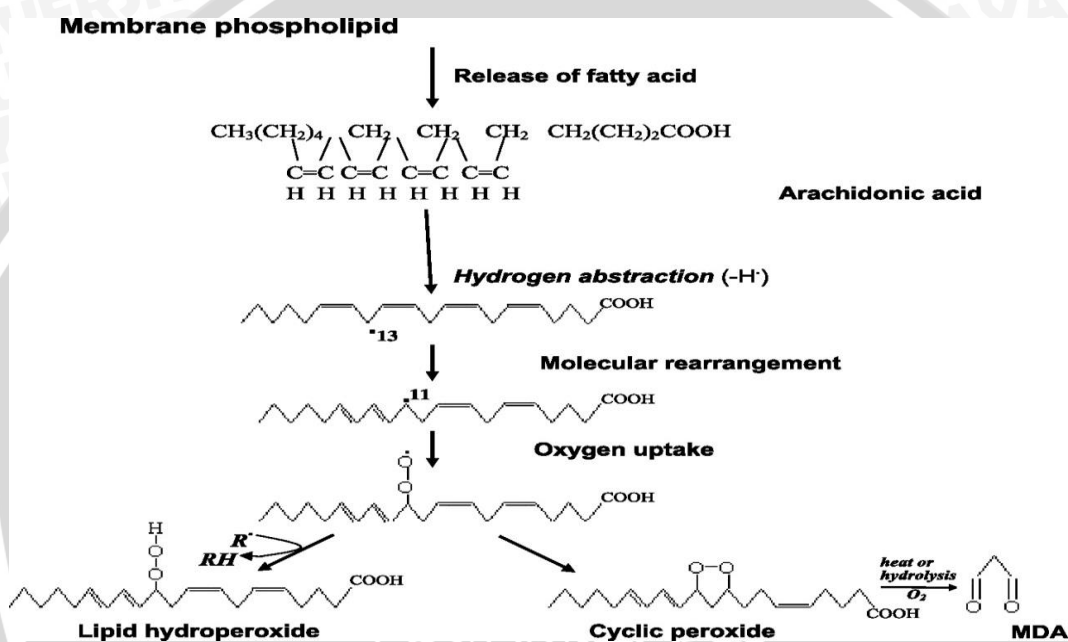
Pada tikus kelompok hepatic steatosis, kadar MDA mengalami peningkatan secara signifikan. Hal ini disebabkan karena induksi CCl_4 dengan dosis tinggi dalam sekali pemberian dapat meningkatkan jumlah *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang selanjutnya dapat meningkatkan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid tersebut juga berhubungan dengan meningkatnya kadar MDA pada organ hepar. Pada penelitian Al-Yahya *et al.* (2013), membuktikan bahwa kelompok tikus yang diinduksi CCl_4 dapat meningkatkan kadar MDA secara signifikan dan menghasilkan gambaran kerusakan hepar berupa steatosis.

Toksikan hepar berupa CCl_4 menyebabkan peroksidasi lipid biomembran, yang merupakan salah satu prinsip penyebab hepatotoksisitas. CCl_4 di dalam hepar dimetabolisme oleh enzim sitokrom P450 sehingga menghasilkan metabolit aktif berupa radikal bebas triklorometil (CCl_3^*), yang mana akan berikatan dengan makromolekul dan menginduksi adanya degradasi peroksidasi dari membran lipid retikulum endoplasma yang kaya akan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA). Hal ini menyebabkan pembentukan terjadinya peroksidasi lipid yang secara internal menghasilkan toksik aldehid yang menyebabkan kerusakan pada hepar. Mekanisme sekunder yang berkaitan dengan metabolisme CCl_4 yaitu meningkatkan pembentukan produk toksik secara langsung atau melalui proses degenarasi membran lipid pada reaksi peroksidatif. Molekul radikal yang berperan sebagai penyebab toksikasi pada hepar adalah triklorometil (CCl_3^*), triklorometil peroksi

(OOCCl_3^*) dan klorin (Cl^*) sebagaimana hasil peroksidasi lipid juga dapat menghasilkan produk berupa fosgen dan produk aldehid lainnya seperti malondialdehid (MDA). Radikal tersebut dapat berikatan dengan molekul seluler (asam nukleat, protein dan lipid) mengakibatkan efek negatif yang signifikan pada proses metabolisme lipid dengan menghasilkan adanya degenerasi melemak pada hepatosit (steatosis). Radikal ini dapat juga bereaksi dengan oksigen sehingga membentuk molekul radikal baru yang lebih reaktif seperti radikal triklorometil peroksi (CCl_3OO^*). CCl_3OO^* menyebabkan reaksi berantai peroksidase lipid yang menyerang dan merusak *polyunsaturated fatty acid* (PUFA). Kondisi tersebut mempengaruhi permeabilitas mitokondria, retikulum endoplasma dan membran plasma sehingga menyebabkan kebocoran sel hepar. Akibat kebocoran sel hepar, induksi karbon tetraklorida tersebut dapat meningkatkan kadar bilirubin total secara signifikan dan juga diikuti dengan meningkatnya kadar MDA hepar karena radikal bebas yang semakin meningkat. Pada hepar tikus yang diinduksi dengan CCl_4 menunjukkan adanya perubahan histopatologi berupa mikrovesikular steatosis (Bigoniya *et al.*, 2009).

Pembentukan malondialdehid (MDA) terbentuk melalui proses peroksidasi lipid yang bermula dari hilangnya atom hidrogen (H) dari ikatan rangkap molekul *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) akibat serangan radikal bebas. Ikatan rangkap tersebut selanjutnya menjadi lemah serta menyebabkan berpindahnya atom hidrogen (H) dan elektron menuju ke radikal bebas, sehingga menghasilkan radikal lipid. Radikal lipid tersebut teroksidasi kemudian membentuk radikal peroksil lipid. Radikal peroksil lipid selanjutnya bereaksi dengan

polyunsaturated fatty acid (PUFA) lainnya, kemudian menarik atom H dan elektron membentuk lipid hidroksiperoksida. Lipid hidroksiperoksida bersifat tidak stabil dan mengalami fragmentasi yang menghasilkan MDA (**gambar 5.2**) (Powers and Jackson, 2008).



Gambar 5.2 Mekanisme Pembentukan MDA (Powers and Jackson, 2008)

Peningkatan kadar MDA pada tikus kelompok hepatis steatosis dapat disebabkan karena adanya kelebihan produksi dari radikal bebas berupa *Reactive Oxygen Species* (ROS) akibat induksi CCl_4 sehingga menurunkan aktivitas antioksidan endogen di dalam hepar dan menginisiasi pembentukan reaksi berantai peroksidase lipid dari membran hepatosit (Ruidong *et al.*, 2011). Radikal bebas dapat diartikan sebagai suatu senyawa, molekul, atau atom yang mempunyai elektron satu atau lebih dan bersifat sangat reaktif serta mudah membentuk senyawa baru (Lee, 2004). Oleh sebab itu, jika terjadi peningkatan radikal bebas dalam tubuh



dan mengakibatkan aktivitas antioksidan endogen menurun maka dibutuhkan antioksidan eksogen dalam jumlah yang banyak untuk menetralkan dan mengeliminasi radikal bebas (Astuti, 2008).

Antioksidan dalam pengertian kimia adalah senyawa pemberi elektron, sedangkan dalam pengertian biologi antioksidan adalah semua senyawa yang dapat meredam radikal bebas. Berdasarkan asal dan pembentukannya antioksidan dibagi menjadi dua yaitu antioksidan endogen dan antioksidan eksogen. Antioksidan endogen adalah antioksidan secara alami terdapat dalam tubuh baik intra maupun ekstraselular. Antioksidan eksogen yaitu antioksidan yang berasal dari luar tubuh, biasanya berasal dari bahan alami atau sintetis (Widowati dkk., 2005). Ekstrak metanol kapulaga hijau mempunyai aktivitas antioksidan eksogen yang bermanfaat bagi tubuh dalam menetralkan dan mengeliminasi radikal bebas serta membantu meningkatkan jumlah antioksidan endogen di dalam tubuh.

Pada masing-masing kelompok terapi yang diberikan ekstrak metanol kapulaga hijau (*Elettaria cardamomum*) dengan dosis 200 mg/kg BB, 400 mg/kg BB dan 600 mg/kg BB mengalami penurunan kadar MDA hepar secara signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa terapi ekstrak kapulaga hijau mampu mengurangi adanya radikal bebas berdasarkan penurunan kadar MDA akibat induksi CCl₄. Semakin tingginya dosis terapi pada penelitian ini, maka kadar MDA juga semakin mengalami penurunan yang ditunjukkan pada dosis terapi terbaik yaitu dosis 600 mg/kg BB.

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan dibagi menjadi dua yaitu antioksidan primer dan sekunder. Antioksidan primer bekerja sebagai pemutus

reaksi berantai, bereaksi dengan radikal lipid kemudian mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. Antioksidan primer ini juga bersifat sebagai preventif dengan mengurangi kecepatan reaksi inisiasi, mencegah autooksidasi lipid melalui pemberian atom hidrogen yang cepat kepada radikal lipid. Antioksidan yang termasuk golongan ini adalah senyawa polifenol salah satunya senyawa alami flavonoid dari bahan herbal. Pada antioksidan sekunder bekerja memperlambat laju autooksidasi melalui berbagai mekanisme yaitu melalui pengikatan ion logam, penangkapan oksigen, penguraian hiperoksida menjadi produk non radikal, penyerapan radiasi UV, deaktivasi oksigen tunggal. Berdasarkan jenisnya antioksidan dibagi menjadi dua yaitu antioksidan alami dan sintesis (Widowati dkk, 2005).

Ekstrak metanol kapulaga hijau memiliki aktivitas antioksidan primer maupun sekunder. Pada aktivitas antioksidan primer, kapulaga hijau berperan penting dan lebih spesifik dalam proses pemutusan reaksi berantai yang bereaksi dengan radikal lipid kemudian mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil, mengurangi kecepatan reaksi inisiasi dan mencegah autooksidasi lipid melalui pemberian atom hidrogen yang cepat kepada radikal lipid. Pada aktivitas antioksidan sekunder, kapulaga hijau memiliki aktivitas dalam memperlambat laju autooksidasi melalui pengikatan ion logam (Amma *et al.*, 2010). Kapulaga hijau merupakan salah satu jenis rempah-rempah yang mengandung antioksidan alami. Antioksidan alami yang terdapat di dalam kapulaga hijau tersebut mengandung senyawa flavonoid yang termasuk golongan dari senyawa polifenol (Bhatti *et al.*, 2010). Antioksidan golongan polifenol mempunyai sifat dan kapasitas antioksidan

yang sangat kuat. Senyawa polifenol mampu melindungi tubuh terhadap stres oksidatif dan penyakit degeneratif (Han *et al.*, 2007).

Aktivitas *free radical scavenger* dari ekstrak kapulaga hijau berupa senyawa flavonoid (*1,8-cineol oil*, *α-terpineol* dan *protocatechualdehyde*) yang mampu mencegah adanya proses oksidasi. Oleh karena itu, oksidasi asam linoleat dapat dihambat oleh adanya antioksidan dari ekstrak metanol kapulaga hijau. Asam linoleat merupakan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) (Bhatti *et al.*, 2010).

Salah satu mekanisme antioksidan flavonoid adalah dengan meredam radikal bebas (*free radical scavenging*) dimana peroksidasi lipid dapat dicegah pada tahap propagasi dengan *peroxy-radical scavenger* diantaranya dengan antioksidan flavonoid. Kandungan senyawa flavonoid (FI-OH) yang ada di dalam ekstrak kapulaga hijau tersebut mempunyai mekanisme kerja yaitu dengan cara mentransferkan atom hidrogen (H) dari gugus hidroksil (OH) kepada radikal bebas (R*) sehingga membentuk radikal fenoksil flavonoid (FIO*). Radikal fenoksil flavonoid (FIO*) yang terbentuk akan diserang kembali oleh radikal bebas (R*) sehingga membentuk radikal fenoksil flavonoid yang kedua (FIO*). Radikal fenoksil flavonoid tersebut ternyata mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi sehingga dapat menetralkan radikal bebas yang terdapat di dalam tubuh dengan cara delokalisasi elektron menghasilkan suatu senyawa kuinon yang lebih stabil (Rahmah, 2012).

Adanya aktivitas antioksidan flavonoid yang terkandung dalam kapulaga hijau dapat membantu menetralkan molekul radikal bebas yang menyerang komponen membran lipid, seperti pada membran mitokondria, retikulum

endoplasma, hingga membran sel, dan melalui mekanisme regenerasi secara fisiologis maka fungsi berbagai organel sel yang mengalami gangguan secara bertahap dapat kembali normal. Beberapa contoh fungsi organel tersebut yaitu β -oksidasi pada mitokondria dan sekresi apolipoprotein pada retikulum endoplasma. Apabila fungsi β -oksidasi mitokondria telah kembali normal maka proses glukoneogenesis dapat berlangsung. Glukoneogenesis adalah proses sintesis glukosa dari bahan non-karbohidrat, seperti lemak atau protein, sehingga kuantitas akumulasi lemak pada kondisi hepatic steatosis dapat secara bertahap diturunkan dengan adanya proses glukoneogenesis tersebut. Pada fungsi retikulum endoplasma yang telah kembali normal juga diikuti dengan kemampuan sintesis dan sekresi Apolipoprotein, terutama Apo-B. Fungsi ApoB yaitu mengikat trigliserida yang terakumulasi di sitoplasma hepatosit untuk kemudian membentuk VLDL dan disekresikan ke sirkulasi darah menuju jaringan adiposa sebagai tempat deposit lemak, sehingga secara bertahap kondisi hepatic steatosis dapat diminimalisir. Berdasarkan perbaikan fungsi dari berbagai komponen pendukung fungsi hepatosit yang memiliki efek positif, dengan ditandai penurunan kadar MDA hepar sehingga fungsi fisiologis hepar dapat kembali berjalan secara normal.

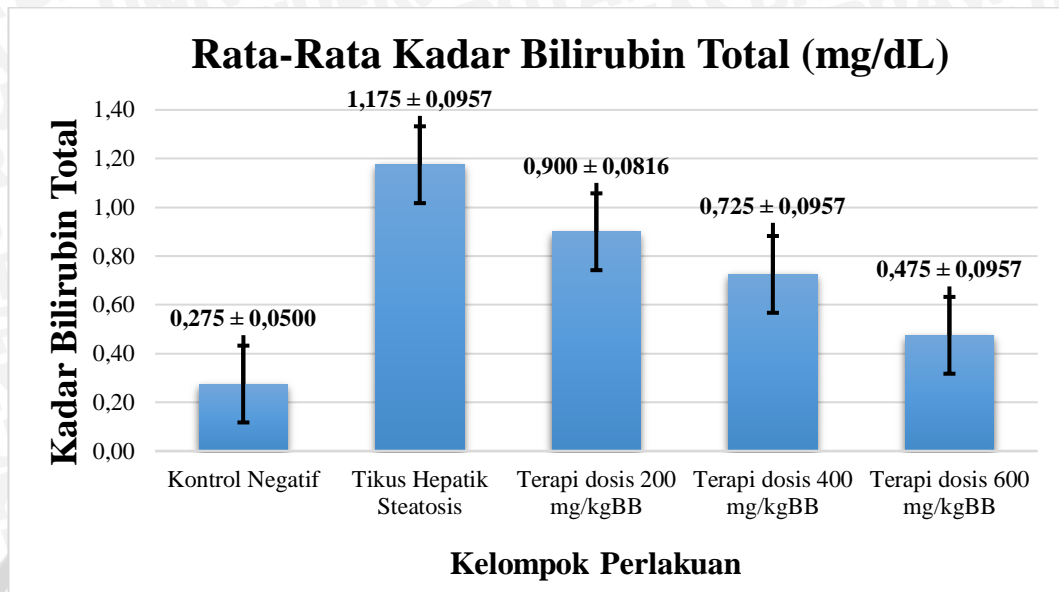
5.2 Pengaruh terapi Ekstrak Kapulaga Hijau (*Elettaria cardamomum*) terhadap kadar Bilirubin Total tikus (*Rattus norvegicus*) model hepatik steatosis hasil induksi CCl₄

Parameter lain yang diukur pada penelitian ini adalah kadar bilirubin total serum tikus yang diinduksi oleh CCl₄. Bilirubin total merupakan salah satu parameter spesifik dari kerusakan hepar. Bilirubin total dapat diukur menggunakan metode spektrofotometri. Hasil pengukuran kadar bilirubin total serum pada kelompok tikus perlakuan (**lampiran 16.**) yang dianalisa menggunakan *Statistical Product of Service Solution* (SPSS) 22.0 dengan uji ANOVA dan dilanjutkan uji *Tukey* (**lampiran 15.**) menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,05$) pada tikus kontrol negatif, tikus hepatik steatosis dan terapi ekstrak kapulaga dosis 600 mg/kg BB, sedangkan pada terapi dosis 200 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) walaupun terdapat penurunan kadar bilirubin total seperti **tabel 5.2** Grafik perbandingan kadar bilirubin total tikus pada kelompok perlakuan dapat dilihat pada **gambar 5.3**.

Tabel 5.2 Kadar Bilirubin Total Tikus Pada Kelompok Perlakuan

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Kadar Bilirubin Total (mg/dL) ± SD	Kadar Bilirubin Total Pada Masing-Masing Kelompok Perlakuan (%)
Tikus Kontrol Negatif	0,275 ± 0,0500 ^a	23,4
Tikus Model Hepatik Steatosis	1,175 ± 0,0957 ^d	100
Terapi dosis 200 mg/kg BB	0,900 ± 0,0816 ^c	76,6
Terapi dosis 400 mg/kg BB	0,725 ± 0,0957 ^c	61,7
Terapi dosis 600 mg/kg BB	0,475 ± 0,0957 ^b	40,4

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang sangat signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan.



Gambar 5.3 Grafik perbandingan kadar bilirubin total pada tikus kelompok perlakuan

Berdasarkan kadar bilirubin total pada masing-masing kelompok perlakuan (**tabel 5.2**), dihasilkan persentase perbandingan antara kelompok tikus kontrol negatif dan terapi dengan tikus model hepatic steatosis. Tikus model hepatic steatosis dianalogikan mempunyai kadar bilirubin total tertinggi yaitu 100 %, sehingga didapatkan hasil pada masing-masing kelompok tikus kontrol negatif; terapi dosis 200 mg/kg BB; 400 mg/kg BB dan 600 mg/kg BB adalah 23,4 %; 76,6 %; 61,7 % dan 40,4 %.

Efek pemberian terapi ekstrak kapulaga hijau (*Elettaria cardamomum*) terhadap kadar bilirubin total dapat dilihat pada **tabel 5.2** dan **gambar 5.3**. Hasil analisa uji statistik berupa ANOVA dan *Tukey* menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak kapulaga hijau (*Elettaria cardamomum*) dapat menurunkan kadar bilirubin total secara signifikan ($p < 0,05$) dan terdapat perbedaan secara nyata. Analisa statistik pada kadar bilirubin total kelompok tikus kontrol negatif dengan

kadar bilirubin total kelompok tikus hepatic steatosis menunjukkan hasil bahwa kedua kelompok perlakuan tersebut memiliki perbedaan yang sangat signifikan ($p < 0,05$) dimana ditunjukkan dengan adanya perbedaan notasi dari hasil *Post Hoc* menggunakan uji *Tukey*. Persentase kadar bilirubin total pada kelompok hepatic steatosis juga ditunjukkan mengalami peningkatan sebesar 76,6 % jika dibandingkan dengan tikus kelompok kontrol negatif. Hal ini disebabkan adanya pengaruh yang signifikan dari induksi CCl_4 dengan dosis tinggi sekali pemberian yang dapat menyebabkan hepatic steatosis akibat hepatotoksik yang dapat meningkatkan kadar bilirubin total. Hal ini didukung dengan penelitian Al-Yahya *et al.*, (2013) yang menyatakan bahwa kadar bilirubin pada tikus wistar yang diinduksi CCl_4 mengalami peningkatan yang signifikan. Bilirubin total merupakan salah satu penanda adanya kerusakan sel hepar. Pada penelitian ini, kadar bilirubin total meningkat dikarenakan kadar *indirect* bilirubin meningkat (**lampiran 16**).

Pada hasil uji *Tukey* kelompok terapi ekstrak kapulaga hijau dosis 200 mg/kg BB, 400 mg/kg BB dan 600 mg/kg BB mempunyai perbedaan yang sangat signifikan jika dibandingkan dengan kelompok tikus hepatic steatosis yang ditunjukkan dengan adanya perbedaan notasi pada keempat kelompok tersebut. Adanya perbedaan yang signifikan tersebut menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak kapulaga hijau (*Elettaria cardamomum*) memberikan pengaruh yang nyata dalam menurunkan kadar bilirubin total. Kelompok terapi memberikan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan kontrol negatif yang ditunjukkan dengan notasi yang berbeda, sedangkan antara kelompok dosis 200 mg/kg BB dengan dosis 400 mg/kg BB tidak memberikan pengaruh perbedaan nyata ($p > 0,05$)

yang ditunjukkan dengan notasi sama walaupun terdapat penurunan kadar bilirubin total yang dapat dilihat pada penurunan persentase kadar bilirubin total masing-masing dosis 200 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB adalah 53,2 % dan 38,3 %. Terapi dosis 200 mg/kg BB dengan 400 mg/kg BB menunjukkan hasil bahwa efek antioksidan dalam menurunkan kadar bilirubin tidak jauh berbeda. Faktor yang dapat menyebabkan hal tersebut terjadi yaitu kandungan antioksidan yang terdapat pada dosis terapi 200 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB memiliki jumlah antioksidan flavonoid yang hampir sama. Antioksidan yang berperan dalam menetralkan radikal bebas yang terdapat di dalam hepar berpengaruh dalam menghambat reaksi lipid peroksidasi, mengakibatkan menurunnya tingkat kerusakan hepatosit dan kadar bilirubin serum. Adanya jumlah antioksidan yang hampir sama pada kedua dosis tersebut mengakibatkan efek penurunan kadar bilirubin total yang tidak jauh berbeda juga. Pemberian terapi ekstrak kapulaga hijau hasil uji *Tukey* pada dosis 600 mg/kg BB dapat menekan adanya peningkatan kadar bilirubin total di dalam serum yang diakibatkan oleh induksi CCl₄, maka dosis terapi tersebut merupakan dosis yang sangat signifikan ($p < 0,05$) dan terdapat perbedaan nyata dalam menurunkan kadar bilirubin total yang ditunjukkan dengan persentase penurunan kadar yaitu 17% jika dibandingkan dengan kelompok yang tidak diterapi serta kelompok terapi dosis 200 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB. Pada penelitian ini, dosis 600 mg/kg BB merupakan dosis terbaik dengan penurunan rata-rata kadar serum bilirubin total tikus mendekati rata-rata kelompok tikus kontrol yaitu sebesar $0,275 \pm 0,0500$ mg/dL. Artinya, dengan diberikannya terapi pada dosis 600 mg/kg BB tersebut dapat memberikan efek kesembuhan pada tikus (hewan model).

Bilirubin merupakan suatu produk penguraian eritrosit, sebagian besar (80-85%) berasal dari haemoglobin dan sisanya berasal dari protein yang mengandung heme contohnya sitokrom P450, *myoglobin* dan lain-lain (Sherlock and Dooley, 2002; Fevery, 2008). Gabungan dari *direct (conjugated bilirubin)* dan *indirect bilirubin (unconjugated bilirubin)* adalah bilirubin total. Pada pengukuran kadar bilirubin hanya bisa mengukur bilirubin total dan *direct bilirubin*, sedangkan *indirect bilirubin* didapatkan dari pengurangan antara bilirubin total dengan *direct bilirubin*.

Menurut Research Animal Resources (2009) menyatakan bahwa kadar normal bilirubin total serum pada tikus adalah sekitar 0,2-0,55 mg/dL. Pada kelompok tikus kontrol negatif, kadar serum bilirubin total masih dalam kondisi kadar normal, sehingga dapat dibuktikan bahwa fungsi metabolisme hepar salah satunya dalam memetabolisme bilirubin tidak mengalami gangguan.

Pada kondisi dimana hepar mengalami kerusakan, terjadi penurunan fungsi pada hepar sehingga salah satu biomarker kerusakan hepar yaitu bilirubin total yang terdapat dalam darah juga mengalami penurunan fungsi metabolisme. Ketika kadar serum bilirubin total semakin meningkat dalam darah menunjukkan kemungkinan gangguan fungsi hepar yang dapat menyebabkan kerusakan hepar (Gupta, 2014). Kondisi gangguan fungsi hepar tersebut dapat menimbulkan adanya ikterus (*jaundice*). Ikterus merupakan perubahan pigmentasi kekuningan pada kulit, konjungtiva dan membran mukosa lainnya yang disebabkan oleh hiperbilirubinemia. Hiperbilirubinemia disebabkan oleh peningkatan kadar bilirubin pada cairan ekstraseluler. Kadar bilirubin total dalam plasma yang dapat

menyebabkan ikterus $>1,5$ mg/dL atau tiga kali dari kadar normal (0,5 mg/dL) untuk dapat menampilkan warna kuning yang jelas (Constantin, 2011). Pada penelitian ini, hasil kadar serum bilirubin total kelompok tikus hepatic steatosis didapatkan bahwa tidak melebihi kadar ikterus ($< 1,5$ mg/dL) yang ditetapkan oleh Constantin (2011), sehingga gejala klinis berupa ikterus pada tikus tidak tampak.

Faktor penyebab peningkatan kadar serum bilirubin total adalah hepar tidak mampu membuang zat buangan bilirubin dan terjadi kebocoran bilirubin dari sel-sel hepar atau sel duktuli intrahepatik sehingga bilirubin dapat masuk ke dalam aliran darah dan dapat memasuki ke dalam semua cairan tubuh seperti cairan otak, cairan asites atau mewarnai kulit, sklera dan lain-lain (Panjaitan dkk, 2007). Hal ini terjadi dengan ditunjukkannya peningkatan kadar serum total bilirubin secara signifikan pada kelompok tikus hepatic steatosis yang diinduksi CCl_4 , sehingga fungsi metabolisme hepar terganggu. Induksi dari CCl_4 dapat menyebabkan stress oksidatif atau adanya *reactive oxygen species* (ROS) di dalam hepatosit setelah melewati jalur bioaktivasi melalui sitokrom P450 yang terdapat di retikulum endoplasma. Senyawa radikal bebas reaktif tersebut berupa CCl_3^{\cdot} dan $\text{CCl}_3\text{O}_2^{\cdot}$. Membran lipid pada bagian *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) sangat rentan terhadap radikal bebas, dengan adanya peningkatan ROS tersebut mengakibatkan membran lipid mengalami kerusakan. Selain itu, adanya akumulasi radikal bebas yang diakibatkan oleh CCl_4 yang berada di dalam hepatosit juga dapat menyerang bagian-bagian intraseluler, khususnya pada retikulum endoplasma dan mitokondria. Jika kedua organel tersebut mengalami kerusakan maka fungsi dalam mensekresikan asam lemak dan trigliserida keluar dari hepatosit terganggu,

sehingga dapat menyebabkan akumulasi lemak di dalam hepatosit atau biasa disebut dengan hepatic steatosis (Chang *et al.*, 2013; Begriche *et al.*, 2011). Menurut Panjaitan dkk (2007), menyatakan bahwa CCl₄ dengan dosis 1 ml/kg BB dapat menimbulkan kolestasis yang ditandai dengan adanya peningkatan kadar ALP dan bilirubin total.

Adanya peningkatan kadar serum bilirubin total pada kelompok tikus hepatic steatosis dikarenakan RE mengalami kerusakan akibat stres oksidatif CCl₄ sehingga proses konjugasi bilirubin tidak dapat terjadi. Secara normal bilirubin tidak terkonjugasi akan berikatan dengan asam glukoronat yang berada di dalam RE, kemudian bilirubin tersebut menjadi bilirubin terkonjugasi yang selanjutnya disekresikan dari hepatosit menuju usus melalui duktus biliari. Membran sel pada hepatosit yang mengalami akumulasi asam lemak tersebut juga mengalami kebocoran yang diakibatkan oleh ROS, sehingga bilirubin tidak terkonjugasi tersebut dapat masuk menuju ke aliran darah. Hal ini sesuai dengan pernyataan Adewale *et al.* (2014) dan Al-Yahya *et al.* (2013) bahwa pemberian CCl₄ secara akut dalam sehari dapat menginduksi kerusakan hepatosit, sehingga radikal bebas hasil metabolisme CCl₄ tersebut menyebabkan integritas membran sel terganggu menghasilkan kebocoran sel. Akibatnya, kadar bilirubin total dapat masuk ke dalam plasma dan mengalami peningkatan. Hasil yang didapat dari tidak terbentuknya *conjugated bilirubin* menyebabkan meningkatnya kadar *unconjugated bilirubin* yang terdapat di plasma. Selain itu, induksi CCl₄ dapat meningkatkan produksi radikal bebas di dalam hepar. Tingginya jumlah radikal bebas mengakibatkan sel hepar mengalami kebocoran sel yang ditunjukkan dengan meningkatnya kadar

serum bilirubin total dan juga diikuti dengan peningkatan kadar malondialdehid (MDA) di dalam hepar (Ramakrishna *et al.*, 2011).

Unconjugated hyperbilirubinemia atau peningkatan *indirect bilirubin* ditetapkan jika rasio antara *direct bilirubin* dengan bilirubin total adalah sekitar 20-30%. *Conjugated hyperbilirubinemia* atau peningkatan *direct bilirubin* ditetapkan jika rasio antara *direct bilirubin* dengan bilirubin total adalah > 70%. *Unconjugated hyperbilirubinemia* dan *conjugated hyperbilirubinemia* dapat terjadi secara bersamaan jika rasio antara *direct bilirubin* dan bilirubin total adalah sekitar 30-60% (Feverly, 2008). Pada penelitian ini, kadar serum bilirubin total meningkat dikarenakan kadar *indirect bilirubin / unconjugated bilirubin* mengalami peningkatan jika rasio antara bilirubin terkonjugasi dengan bilirubin total sekitar 20-30% yang dapat dilihat pada **lampiran 16.**, sehingga dapat disimpulkan bahwa pada tikus kelompok hepatic steatosis mengalami *unconjugated hyperbilirubinemia*. Meningkatnya *unconjugated bilirubin* di dalam plasma dapat dibuktikan pada penelitian Bigoniya *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa jika kadar bilirubin terkonjugasi rendah, tetapi kadar bilirubin total meningkat, hal tersebut mencerminkan terjadinya kerusakan pada sel-sel hepar.

Pada kelompok terapi yang diberikan ekstrak kapulaga hijau (*Elettaria cardamomum*) dengan berbagai macam dosis yaitu 200 mg/kg BB, 400 mg/kg BB dan 600 mg/kg BB, kadar serum bilirubin total mengalami penurunan. Ekstrak kapulaga hijau tersebut memiliki komponen senyawa flavonoid terbesar berupa *1,8-cineol oil*, *α-terpineol* dan *protocatechualdehyde* (Amma *et al.*, 2010; Darwish and Azime, 2012). Komponen senyawa tersebut berfungsi sebagai antioksidan alami

yang memiliki aktivitas *free radical scavenger* yang tinggi yang dapat menetralkan radikal bebas di dalam tubuh akibat pemberian CCl_4 dosis tinggi dan dalam sekali pemberian atau dalam keadaan akut. Ekstrak kapulaga hijau ini berperan penting sebagai antioksidan eksogen yang mampu mengurangi pembentukan radikal bebas sehingga dapat menekan adanya peroksidasi lipid dan juga dapat mengurangi resiko terjadinya kerusakan pada hepatosit (Darwish and Azime, 2012).

Kandungan senyawa flavonoid (Fl-OH) yang ada di dalam ekstrak kapulaga hijau tersebut mempunyai mekanisme kerja yaitu dengan cara mentransferkan atom hidrogen (H) dari gugus hidroksil (OH) kepada radikal bebas (R^*) sehingga membentuk radikal fenoksil flavonoid (FIO*). Radikal fenoksil flavonoid (FIO*) yang terbentuk akan diserang kembali oleh radikal bebas (R^*) sehingga membentuk radikal fenoksil flavonoid yang kedua (FIO*). Radikal fenoksil flavonoid tersebut ternyata mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi sehingga dapat menetralkan radikal bebas yang terdapat di dalam tubuh dengan cara delokalisasi elektron menghasilkan suatu senyawa kuinon yang lebih stabil (Rahmah, 2012).

Aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh senyawa flavonoid dalam kapulaga hijau berperan membantu menetralkan molekul radikal bebas yang menyerang komponen membran lipid pada organel retikulum endoplasma hepatosit hingga membran hepatosit, dan melalui mekanisme regenerasi fisiologis maka fungsi retikulum endoplasma dan membran hepatosit tersebut yang sebelumnya mengalami gangguan dapat kembali normal. Retikulum endoplasma hepatosit secara fisiologis berperan dalam sintesis Apolipoprotein yang berfungsi sebagai pengangkut trigliserida yang terdapat di dalam hepatosit keluar menuju jaringan

adiposa dan sintesis asam glukoronat yang berfungsi dalam mereaksikan bilirubin tidak terkonjugasi yang bersifat larut air (hidrofilik) untuk kemudian diubah menjadi bilirubin terkonjugasi yang bersifat larut lemak (hidrofobik), sehingga dapat disekresikan menuju saluran empedu (*ductus biliaris*) dan diteruskan ke usus untuk selanjutnya dieksresikan melalui urin dan feses. Adanya perbaikan fungsi retikulum endoplasma hepatosit akan mengoptimalkan kembali proses metabolisme ekskresi trigliserida keluar menuju jaringan adiposa dan metabolisme bilirubin yang sebelumnya mengalami gangguan akibat radikal bebas. Efek positif tersebut diketahui dari adanya penurunan kadar bilirubin total dalam serum, sehingga fungsi metabolisme dalam mengeksresikan bilirubin dapat kembali normal.

Pemberian ekstrak kapulaga hijau pada dosis yang semakin tinggi (600 mg/kg BB) dapat memperbaiki fungsi metabolisme hepar sehingga kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas pada hepatosit dan resiko terjadinya hepatic steatosis akibat toksikasi hepar dapat diminimalisir. Menurut penelitian Chacko *et al.*, (2012) membuktikan bahwa ekstrak metanol kapulaga hijau (*Elettaria cardamoum*) diketahui sangat aman dikonsumsi dan bersifat nontoksik jika tidak melebihi LD₅₀ yaitu 2 g/kgBB atau setara dengan 2.000 mg/kg BB.