



## Studi Preventif Ekstrak Etanol Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) pada Tikus (*Rattus Novergicus*) Model Sepsis Hasil Induksi Lipopolisakarida Terhadap Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase (SOD) dan Gambaran Histopatologi Duodenum

### ABSTRAK

Sepsis merupakan sindroma klinik sebagai manifestasi proses inflamasi akibat infeksi mikroorganisme. Penyebab utama sepsis adalah bakteri gram negatif seperti *Escherichia coli* yang memiliki lipopolisakarida (LPS) pada dinding terluar sebagai endotoksin. Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) memiliki bioaktif flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Berdasarkan latar belakang tersebut dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui efek preventif ekstrak etanol daun sambiloto dalam mencegah sepsis berdasarkan aktivitas enzim SOD dan histopatologi duodenum. Hewan coba yang digunakan adalah 20 ekor tikus jantan strain Wistar dan dibagi menjadi lima kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1 (P1) dosis 250 mg/kg BB, perlakuan 2 (P2) dosis 500 mg/kg BB, dan perlakuan 3 (P3) dosis 1000 mg/kg BB. Data kuantitatif untuk aktivitas enzim SOD dianalisa dengan One Way ANOVA dan dilanjutkan dengan uji tukey ( $\alpha < 5\%$ ). Data kualitatif untuk histopatologi duodenum dianalisa secara deskriptif. Hasilnya, pemberian ekstrak etanol daun sambiloto mampu mencegah penurunan aktivitas enzim SOD dan mencegah kerusakan histopatologi duodenum ditinjau dari struktur sel epitel dan produksi sel goblet pada dosis preventif terbaik dalam penelitian ini yaitu 1000 mg/kg BB. Kesimpulan yang didapat adalah ekstrak etanol daun sambiloto mampu mencegah sepsis pada hewan coba tikus hasil induksi LPS ditinjau dari aktivitas enzim SOD dan histopatologi duodenum.

Kata kunci: Duodenum, Lipopolisakarida, Sambiloto, Sepsis, Superoksida Dismutase (SOD).



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Sepsis dan syok septik telah dikenal sebagai masalah kesehatan serius baik dalam dunia kedokteran hewan maupun kedokteran umum. Hal ini disebabkan karena angka kejadian dan mortalitas sepsis yang cukup tinggi setiap tahunnya. Berdasarkan beberapa studi kasus yang ada (CA Brady, 2000) melaporkan bahwa di New York pada tahun 1986-1998 sebanyak 29 kucing diidentifikasi mengalami sepsis berat. Tahun 2003-2007 di Kanada terdapat 114 kasus anjing mengalami abdominal sepsis, 89 ekor terkena  $\geq 1$  disfungsi sistem organ dengan mortalitas 25% dan 57 ekor terkena  $\geq 2$  disfungsi sistem organ dengan mortalitas 70% (Kenney, 2010). Tahun 2013 di Brazil terdapat 19 ekor anjing mengalami kematian dalam kurun waktu 24 jam, 15 ekor terkena sepsis berat dengan mortalitas 33,33% dan 4 ekor terkena syok septik dengan mortalitas 100% (Isola *et al*, 2013).

Sepsis merupakan sindroma klinis sebagai manifestasi proses inflamasi karena respon tubuh yang berlebihan akibat infeksi mikroorganisme seperti bakteri gram negatif dan gram positif, jamur, virus serta parasit (James *et al*, 2005). Sepsis berat adalah sepsis yang disertai dengan disfungsi sistem organ (Routsis *et al*, 2005). Sepsis menyebabkan inflamasi sistemik didalam tubuh terutama pada usus, paru-paru, hati, dan ginjal. Pada usus, sepsis menyebabkan hipoperfusi berupa gangguan mikrosirkulasi serta inflamasi. Faktor resiko terjadinya sepsis dalam dunia kedokteran hewan antara lain



2  
evaluasi dari pasien rawat inap di rumah sakit atau klinik hewan yang mengalami infeksi nosokomial, penggunaan *iv catheter* yang kurang tepat sehingga menyebabkan vena mudah terakses oleh bakteri, infeksi akibat kateterisasi urine, translokasi bakteri dari penyakit atau inflamasi saluran pencernaan serta awal mula yang berkepanjangan dari infeksi kulit dan saluran urin bagian atas (Pachtinger, 2015).

Penyebab terbesar sepsis adalah bakteri gram negatif seperti *Escherichia coli* yang menghasilkan produk untuk menstimulasi sel imun. Produk tersebut adalah lipopolisakarida (LPS) yang akan merangsang sel imun untuk melepaskan mediator inflamasi seperti sitokin, nitrat oxide (NO), superoxide, anion, dan mediator lipid. Lipopolisakarida atau endotoksin glikoprotein kompleks merupakan suatu komponen utama membran terluar dari bakteri gram negatif dan berperan penting pada inisiasi proses sepsis (Sumarmi dan Guntur, 2008).

Selama ini penanganan sepsis hanya berdasarkan pada terapi dan pengobatan, bukan pada preventif atau pencegahan sebelum sepsis terjadi. Terapi yang umum digunakan adalah antibiotik dan obat-obatan kortikosteroid. Namun antibiotik memiliki efek samping yaitu resistensi, alergi, mual, diare dan kortikosteroid sebagai antiinflamasi akan menyebabkan infeksi sekunder serta perdarahan pada saluran cerna. Hal ini menyebabkan sebagian besar masyarakat mulai beralih dan memanfaatkan obat herbal yang popularitasnya semakin meningkat. Salah satu tanaman obat yang secara empiris digunakan sebagai obat herbal adalah sambiloto (*Andrographis*



*paniculata* Ness). Senyawa bioaktif yang terdapat di didalam daun sambiloto dan dapat dimanfaatkan untuk preventif terhadap sepsis adalah flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi (Kurniawati, 2005).

Kondisi sepsis dapat menyebabkan stress oksidatif berat dimana terjadi ketidakseimbangan antara jumlah antioksidan dan radikal bebas didalam tubuh (Barnes, 1997). Kandungan flavonoid di dalam ekstrak daun sambiloto diharapkan dapat memperlambat atau mencegah proses oksidasi untuk menghentikan kerusakan sel akibat radikal bebas yang terbentuk pada kondisi sepsis dengan menstimulasi peningkatan antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD) dan sebagai antiinflamasi diharapkan dapat mencegah kerusakan epitel duodenum akibat infiltrasi sel radang.

Berdasarkan latar belakang diatas, maka penulis melakukan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh preventif ekstrak etanol daun sambiloto terhadap kondisi sepsis yang dilihat pada kenaikan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) dan perubahan gambaran histopatologi duodenum.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut :

1. Bagaimana pengaruh ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) dalam mencegah sepsis pada tikus (*Rattus novvergicus*) hasil induksi LPS berdasarkan aktivitas enzim SOD plasma?



2. Bagaimana pengaruh ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) dalam mencegah sepsis pada tikus (*Rattus norvegicus*) hasil induksi LPS berdasarkan gambaran histopatologi duodenum?

### 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disebutkan, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar berjenis kelamin jantan dengan umur 8-12 minggu dan berat badan 200 gram yang diperoleh dari Peternakan Tikus Sumbersekar, Dau, Malang.
2. Pembuatan hewan model sepsis dengan cara injeksi secara intraperitoneal lipopolisakarida (LPS) *E-Coli* Sigma Aldrich 0111: B4 dengan dosis 2,0 mg/kg BB (Qun Fu, 2014). Lipopolisakarida digunakan untuk memperparah gejala sindroma sepsis dan diberikan sebanyak 1 kali pada hari ke-15 penelitian.
3. Daun sambiloto yang digunakan dideterminasi oleh UPT Matera Medika Batu dengan karakteristik daun tunggal, berbentuk pedang (lanset) dengan tepi rata (integer) dan permukaannya halus, berwarna hijau dan memiliki bunga putih keunguan, berbentuk jorong dengan pangkal dan ujung lancip. Dosis preventif ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata* ness) yang diberikan pada tikus model sepsis yaitu sebesar 250 mg/gram BB, 500 mg/gram BB dan 1000 mg/gram BB selama 8 hari dimulai pada hari ke-8 (Ulumiyah, 2012).





## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Sepsis

#### 2.1.1 Pengertian Sepsis

Sepsis merupakan suatu sindroma klinis sebagai manifestasi proses inflamasi karena respon tubuh akibat infeksi mikroorganisme maupun produknya, sedangkan sepsis berat adalah sepsis yang ditandai dengan hipotensi, disfungsi atau hipoperfusi organ. Sepsis ditandai dengan perubahan temperatur tubuh, perubahan jumlah leukosit, *tachycardia* dan *tachypnea* (Faridah, 2009).

#### 2.1.2 Etiologi dan Patomekanisme Sepsis

Sepsis disebabkan oleh mikroorganisme patogenik atau berpotensi patogenik yang secara normal terjadi invasi jaringan, cairan atau rongga-rongga tubuh. Mikroorganisme tersebut adalah bakteri gram negatif, bakteri gram positif, jamur, virus dan parasit (Faridah, 2009). Bakteri gram negatif dengan endotoksinnnya yaitu lipopolisakarida (LPS) merupakan penyebab sepsis terbesar dengan prosentase kasus 60 - 70%, sedangkan bakteri gram positif menyebabkan 20-40% kasus (Guntur, 2008).

Sepsis pada manusia maupun hewan coba, keduanya terdapat ketidakseimbangan antara sitokin pro-inflamasi dan anti-inflamasi (Chen *et al.*, 2000). Produksi sitokin inflamasi secara berlebihan menyebabkan injuri pada jaringan secara luas dan aktivasi sistemik. Hal ini akan berakibat pada permeabilitas vaskuler, syok dan menginduksi perubahan metabolik yang



7  
dapat meningkatkan nekrosis jaringan. Pada akhirnya terjadi MOF (*Multiple Organ Failure*) dan kematian. MOF ditunjukkan sebagai kongesti berat, perdarahan, hiperemia, deposit fibrin, edema, trombosis, akumulasi leukosit pada paru-paru dan saluran cerna, nekrosis hepatosit, iskemia segmental dari kolon dengan daerah nekrosis atau perdarahan (Rey *et al.*, 2006).

Patomekanisme terjadinya sepsis diawali dengan interaksi antara proses infeksi patogen, inflamasi dan jalur koagulasi (Jessen *et al.*, 2007).

Adanya patogen pertama kali dikenali oleh sel-sel sistem imun, misalnya makrofag dan sel dendritik yang berada di jaringan. Makrofag merupakan bagian utama dari *innate immunity*, berperan dalam inisiasi respon inflamasi dengan membunuh patogen melalui proses fagositosis. Mediator-mediator proinflamasi bekerja pada sel endotel pembuluh darah dan menyebabkan vasodilatasi, peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan perekrutan neutrofil ke jaringan. Proses ini akan menghasilkan oksigen sitotoksik, kemokin dan sitokin yang menarik dan mengaktifkan sel imun lain (Rey *et al.*, 2006). Dengan sirkulasi granulosit dan monosit yang cepat menuju daerah infeksi, sehingga sitokin akan meningkat dalam hitungan menit sampai jam, untuk mengeradikasi patogen invasif (Calandra and Roger 2003). Anamnesa, *signalment* dan pemeriksaan fisik pada hewan sangat mempengaruhi peneguhan diagnosa terhadap sepsis. Sepsis pada hewan dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah infeksi nosokomial yang didapatkan dari rumah sakit maupun klinik hewan dan akibat dari pelaksanaan operasi yang tidak aseptis (Boyle, 2012).



## 2.2 Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)

Sambiloto berasal dari India dan merupakan tumbuhan liar yang kemudian menyebar ke daerah tropis hingga sampai ke Indonesia. Pada pertengahan abad ke-20 berbagai studi telah dilakukan untuk mengetahui komposisi, keamanan, khasiat, dan mekanisme kerja sambiloto. Saat ini sambiloto telah ditetapkan sebagai tanaman obat yang dikembangkan sebagai fitofarmaka. Berikut merupakan klasifikasi lengkap dari tanaman sambiloto (Widyawati, 2007).

Kingdom : Plantae  
 Divisi : Angiospermae  
 Kelas : Dicotyledoneae  
 Sub-kelas : Gamopetalae  
 Ordo : Personales  
 Famili : Acanthaceae  
 Sub-famili : Acanthoidae  
 Genus : *Andrographis*  
 Spesies : *Andrographis paniculata* Nees

Tanaman sambiloto dikenal sebagai “*King of Bitters*” atau raja dari rasa pahit. Hal ini dikarenakan semua bagian tanaman sambiloto seperti batang, bunga dan akar sangat pahit jika dikonsumsi. Rasa pahit tersebut berasal dari zat andrographolid yang berada didalam kandungannya. Semua bagian tanaman ini dapat dimanfaatkan sebagai obat, namun bagian yang paling sering digunakan sebagai bahan obat tradisional adalah daun dan



batangnya. Secara alami, sambiloto mampu tumbuh mulai dari dataran pantai hingga dataran tinggi dengan kondisi jenis tanah dan iklim beragam. Di Indonesia sambiloto dipasarkan baik dalam sediaan tunggal atau gabungan dengan bahan alami dalam bentuk tablet yang masih tergolong sediaan jamu (Sukandar, 2004).

Sambiloto memiliki batang berkayu berbentuk bulat dan segi empat serta memiliki banyak cabang (monopodial). Daun tunggal saling berhadapan, berbentuk pedang (lanset) dengan tepi rata (integer) dan permukaannya halus, berwarna hijau seperti pada **Gambar 2.1**. Bunganya berwarna putih keunguan, berbentuk jorong (bulan panjang) dengan pangkal dan ujungnya yang lancip (Widyawati, 2007).



**Gambar 2.1** Tanaman sambiloto (Ratnani, 2012).

Senyawa fitokimia yang terkandung dalam sambiloto meliputi lakton dan flavonoid. Pada lakton, komponen utamanya adalah andrographolid yang merupakan zat aktif utama dari tanaman ini. Andrographolid menghasilkan rasa pahit dan berfungsi sebagai imunostimulan, antiinflamasi, dan antibakteri. Sedangkan flavonoid bekerja menghambat fase penting dalam



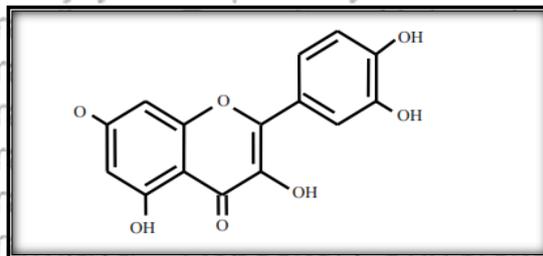
biosintesis prostaglandin, yaitu pada lintasan siklooksigenase dan menghambat fosfodiesterase, aldoreduktase, monoamine oksidase, protein kinase, polimerase DNA dan lipooksigenase (Fitriyani, 2011)

Hasil dari fitokimia simpilisia dari ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid dan aktivitas antioksidan yang tinggi. Flavonoid merupakan senyawa fenol dengan struktur kimia C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> seperti yang tertera pada **Gambar 2.2** yang dimiliki oleh sebagian besar tumbuhan hijau dan biasanya terkonsentrasi pada biji, buah, kulit buah, kulit kayu, daun dan bunga (Jayakumar, 2012).

Flavonoid memiliki efek biologis seperti antioksidan, antiinflamasi, antialergi, antikarsinogenik, antiobesitas, antidiabetes, dan imunostimulan. Mekanisme kerja dari flavonoid adalah menghambat enzim yang terlibat dalam pembentukan ROS. Berdasarkan hasil-hasil penelitian yang telah dilakukan, dinyatakan bahwa flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa fenolik yang memiliki sifat antioksidatif serta berperan dalam pencegahan kerusakan sel dan komponen selulernya yang diakibatkan oleh radikal bebas. Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan dua cara yaitu langsung dan tidak langsung. Secara langsung dengan cara menangkap radikal bebas dan membebaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya. Secara tidak langsung dengan peningkatan ekspresi gen antioksidan melalui aktivasi nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2) sehingga terjadi



peningkatan gen yang berperan dalam sintesis enzim antioksidan endogen (Retnaningsih, 2013).



Gambar 2.2 Kerangka flavonoid  $C_6C_3C_6$

Dalam suatu penelitian pada hewan percobaan menunjukkan bahwa 48 jam setelah pemberian andrographolide, komponen ini dijumpai tersebar luas ke seluruh organ tubuh. Konsentrasi yang dijumpai di otak sebesar 20,9%, limfa 14,9%, jantung 11,1%, paru-paru 10,9%, rektum 8,6%, ginjal 7,9%, hati 5,6%, uterus 5,1%, ovarium 5,1%, dan usus halus sebesar 3,2%. Pemberian sambiloto menunjukkan efek protektif terhadap aktivitas enzim superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase dan glutathione yang menurun dengan pemberian hexachloro cyclohexane (BHC) dan hasilnya menunjukkan adanya khasiat antioksidan dan hepatoprotektif dari sambiloto (Castell, 2006).

## 2.2 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*)

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ilmiah ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) berjenis kelamin jantan strain Wistar. Ciri-ciri morfologi *Rattus norvegicus* antara lain memiliki berat 150-600 gram, hidung tumpul dan badan besar dengan panjang 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20-23 mm.



*Rattus norvegicus* memiliki rambut tubuh berwarna putih dan mata yang merah, panjang tubuh 440 mm, panjang ekor 205 mm bobot jantan dewasa berkisar 450-520 g dan betina 250-300 g (**Gambar 2.3**). *Rattus norvegicus* memiliki waktu hidup 2,5 tahun hingga 3,5 tahun, denyut jantung 330-480 kali permenit, frekuensi respirasi 85 kali permenit dan memasuki masa dewasa pada usia 40-60 hari (Armitage, 2004). Berikut ini merupakan taksonomi dari tikus (Besselsen, 2004):

Kingdom : Animalia  
Filum : Chordata  
Kelas : Mamalia  
Ordo : Rodensia  
Famili : Muridae  
Genus : *Rattus*  
Spesies : *Rattus norvegicus*



**Gambar 2.3** *Rattus norvegicus* (Johnson, 2012).

Tikus merupakan hewan mamalia yang paling umum digunakan sebagai hewan percobaan pada laboratorium. Hal ini dikarenakan banyak keunggulan yang dimiliki oleh tikus sebagai hewan percobaan, yaitu memiliki



kesamaan fisiologis dengan manusia, siklus hidup yang relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, dan mudah dalam penanganan (Johnson, 2012).

#### 2.4 Lipopolisakarida (LPS)

Lipopolisakarida atau endotoksin glikoprotein kompleks merupakan komponen utama membran terluar dari bakteri gram negatif (Guntur, 2008; Garrido *et al.*, 2004). Kadar LPS ditemukan lebih dari 75% pada pasien sepsis. Sisanya, kadar endotoksin di serum sering tidak terdeteksi pada sepsis yang perkembangannya lambat dan tidak ada komplikasi (Garrido *et al.*, 2004).

Lipopolisakarida bersifat stabil, senyawa yang relatif murni yang dapat disimpan dalam bentuk *lyophilized*. Dosis yang akurat dapat diukur dan diatur seperti bolus atau infus (Garrido *et al.*, 2004). Lipopolisakarida tidak mempunyai sifat toksis, tetapi merangsang mediator inflamasi dari bermacam tipe sel dan bertanggungjawab pada inisiasi proses sepsis (Sumarmi dan Guntur, 2008; Garrido *et al.*, 2004). Mediator inflamasi tersebut antara lain sitokin, nitrat oxide, superoxide, anion dan mediator lipid (Sumarmi dan Guntur, 2008).

Lipopolisakarida tersusun atas rantai O-polysaccharide, cincin gula dan lipid A (asam lemak *lipophilic*) (Giacometti *et al.*, 2002). Struktur lipid A bertanggung jawab terhadap reaksi dalam tubuh penderita (Guntur, 2008).

LPS merangsang respon imun dengan menstimulasi sitokin proinflamasi, seperti TNF, IL-1, IL-6, IL-8, *platelet activating factor*, metabolit asam



arakidonat, eritropoietin dan endotelin (Giacometti *et al.*, 2002; Daniel dan Remick 2007; Sumarmi dan Guntur, 2008).

## 2.5 Enzim SOD (Superoxide Dismutase)

Superoxide Dismutase adalah enzim yang mengkatalisis dismutasi ion superoksida radikal ( $O_2^-$ ) menjadi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan molekul oksigen ( $O_2$ ). Berdasarkan kofaktor logam dan distribusinya di dalam tubuh, SOD terbagi menjadi 4 macam yaitu cooper, zinc superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) yang umumnya terdapat dalam sitoplasma eukariot, manganase superoxide dismutase (Mn-SOD) yang terdapat pada mitokondria organisme aerobik, iron superoxide dismutase (Fe-SOD) yang terdapat pada prokariot dan extra selluler superoxide dismutase (ec-SOD) yang ditemukan pada cairan ekstraselular mamalia (West, 2004).

SOD tergolong enzim yang sangat stabil karena tiap subunit tergabung oleh ikatan non-kovalen dan terangkai oleh rantai disulfida. Enzim ini memainkan peran penting pada garis depan sistem pertahanan antioksidan endogen (Mates *et al.*, 1999). Aktivitas SOD bervariasi pada beberapa organ tikus. Jumlah tertinggi terdapat didalam hati, kemudian berturut-turut dalam kelenjar adrenal, ginjal, limfa, pankreas, otak, paru-paru, lambung, usus, ovarium, timus dan lemak (Nurmawati, 2002). Aktivitas SOD akan meningkat seiring dengan pemberian antioksidan eksogen (flavonoid) secara bertahap. Proses tersebut terjadi karena antioksidan flavonoid menstimulasi aktivitas enzim SOD dan enzim SOD didalam tubuh akan menangkal anion

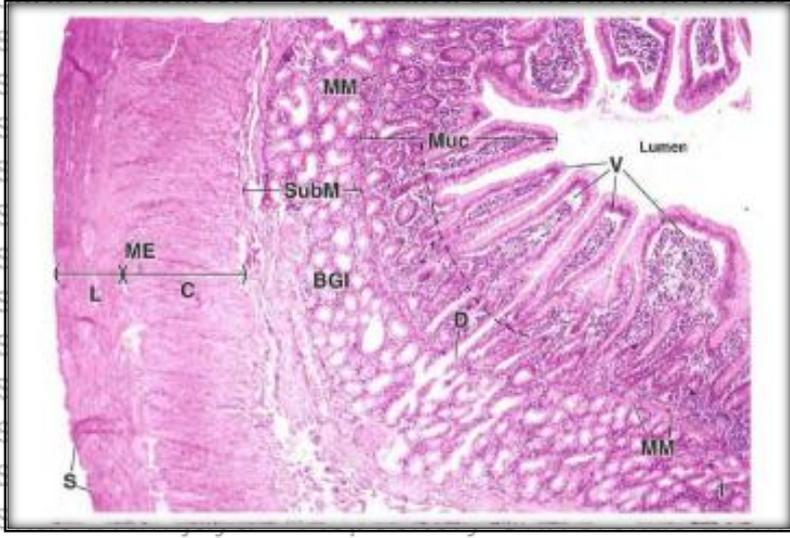


superoksida sehingga tidak terbentuk hidrogen peroksida dan radikal hidroksil (Retnaningsih, 2013).

Sepsis menyebabkan peningkatan penanda dari stress oksidatif pada hewan coba. Efek ini berkorelasi dengan ketidakseimbangan pada jumlah antioksidan. Bukti dari stress oksidatif pada sepsis dan hubungannya dengan ekspresi gen inflamasi telah memberikan dasar dalam intervensi yang dapat dilakukan baik dalam menurunkan stress oksidatif maupun dengan cara menghambat aktivasi proses transkripsi (Nurmawati, 2002).

## 2.6 Histopatologi Organ Duodenum

Duodenum merupakan bagian dari usus halus yang terpendek dan berperan dalam sistem pencernaan. Sistem pencernaan memiliki fungsi utama yaitu mencerna dan memecah makanan di dalam lumen menjadi molekul yang lebih kecil dan sederhana. Molekul tersebut akan diserap dan diedarkan ke seluruh tubuh. (Denbow, 2000) menjelaskan bahwa proses pencernaan pertama kali berlangsung di duodenum, asam empedu dari hati dan enzim pankreas di kirim ke duodenum dan ditambah dengan enzim dari usus sehingga bersama-sama mencerna makanan. Secara makroskopis dan mikroskopis, lapisan-lapisan penyusun dinding duodenum mulai dari dalam ke luar lumen usus terdiri atas tunika mukosa, tunika submukosa, tunika muskularis, dan tunika serosa (Frappier, 2006). Struktur histologi duodenum disajikan pada (**Gambar 2.4**)



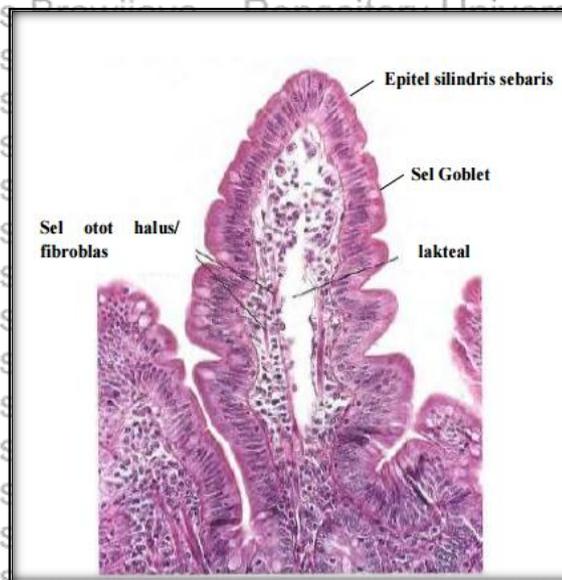
**Gambar 2.4** Struktur histologi duodenum. Keterangan: (S) serosa, (ME) musculus ekstrenal, (L) longitudinal, (C) sirkular, (SubM) submukosa, (BGI) kelenjar Brunner, (D) duktus kelenjar Brunner, (MM) muskularis mukosa, (Muc) mukosa, dan (V) vili. Pewarnaan HE dengan perbesaran mikroskop 200x (Ross et al, 2002).

Lapisan terluar dari dinding duodenum yaitu lapisan serosa. Lapisan serosa tersusun atas selapis pipih sel-sel mesothelial diatas jaringan ikat longgar dan pembuluh darah (Eroschenko, 2003). Lapisan muskuler disebut juga tunika muskularis yang terdiri atas serabut otot longitudinal dan sirkuler (Price and Wilson, 2005; Guyton and Hall, 2007). Bagian tunika submukosa terdiri dari jaringan ikat dan kelenjar Brunner atau kelenjar submukosa yang hanya terdapat pada bagian pangkal duodenum. Tunika mukosa adalah lapisan dinding terdalam yang terdiri atas epitel, kelenjar intestinal dan lamina propia (Frappier, 2006). Epitel usus halus berbentuk epitel kolumner selapis yang terdiri atas sel absortif, sel goblet, sel endokrin, dan sel peaneth. Pencernaan di usus halus ditunjang oleh bentuk khusus tunika mukosa, yakni vili. Vili merupakan penjurulan mukosa yang berbentuk jari dan ciri khas dari





usus halus. Vili tersusun atas kumpulan sel epitel silindris sebaris yang berjejer dan jaringan ikat longgar lamina propia (**Gambar 2.5**) Tinggi vili bervariasi tergantung pada daerah dan jenis hewan, sehingga luas permukaan ditingkatkan oleh mikrovili. Mikrovili merupakan penjurusan sitoplasma ada permukaan bebas epitel vili. Vili dan mikro vili berfungsi memperluas permukaan usus sehingga penyerapan lebih efisien.



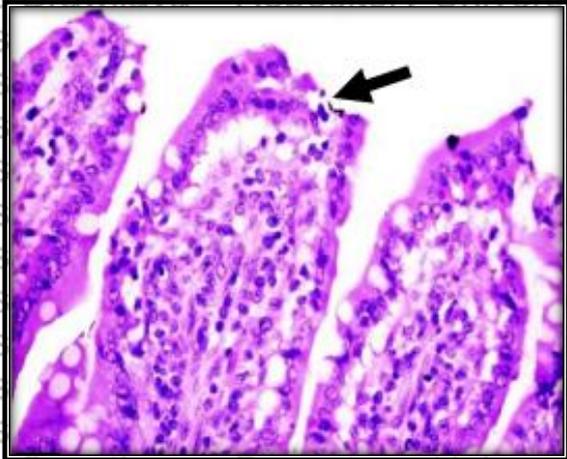
**Gambar 2.5** Gambaran mikroskopis vili duodenum. Pewarnaan HE dengan perbesaran mikroskop 200x (Ross et al, 2002)

Vili memiliki struktur jaringan lunak bagian dalam yaitu lamina propia. Lamina propia dilengkapi dengan jaringan limfatikus yang berfungsi sebagai pertahanan imunologis terintegrasi yang mampu mencegah patogen maupun substansi antigen lainnya berpotensi masuk ke dalam mukosa dari lumen saluran cerna. Jaringan limfatikus terdiri dari jaringan yang menyebar (limfosit dan sel plasma) didalam lamina propia, transit limfosit yang



terdapat pada ruang antar epitel, nodul limfatik, eosinofil, makrofag, dan neutrofil (Ross *et al.*, 2002).

Lipopolisakarida (LPS) di dalam darah akan berikatan dengan protein darah membentuk LBP (Jessen *et al.*, 2007; Shahin *et al.*, 2006). LBP dapat langsung mengaktifkan sistem imun seluler dan humoral, yang dapat menimbulkan perkembangan gejala septikemia (Shahin *et al.*, 2006; Guntur, 2008). Overproduksi sitokin inflamasi menyebabkan hiperinflamasi seperti aktivasi respon sistemik berupa SIRS pada berbagai organ, salah satunya pada duodenum (Chinnaiyan, 2001). Hal ini menyebabkan hipoperfusi intestinal berupa gangguan mikrosirkulasi mukosa usus, disfungsi *barrier* intestinal dengan peningkatan permeabilitas usus, invasi bakteri patogen dan toksinnya kedalam sirkulasi sistemik (Jurgen *et al.*, 2006) serta pelepasan sitokin inflamasi yang merupakan tanda reaksi inflamasi (Jones, 2007; Jürgen *et al.*, 2006). Inflamasi terjadi akibat gangguan sintesa asam empedu sehingga memicu terjadinya peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid bersifat sangat destruktif karena menghasilkan radikal bebas (Catala, 2006). Inflamasi yang terjadi pada duodenum ditandai dengan adanya infiltrasi sel-sel radang seperti limfosit dan neutrofil, selain itu juga terlihat kerusakan pada bagian vili duodenum (**Gambar 2.6**) pada tunika submukosa mengalami edema, destruksi sel epitel silindris, serta proliferasi dan hipertofi sel goblet (Horii, 2002)

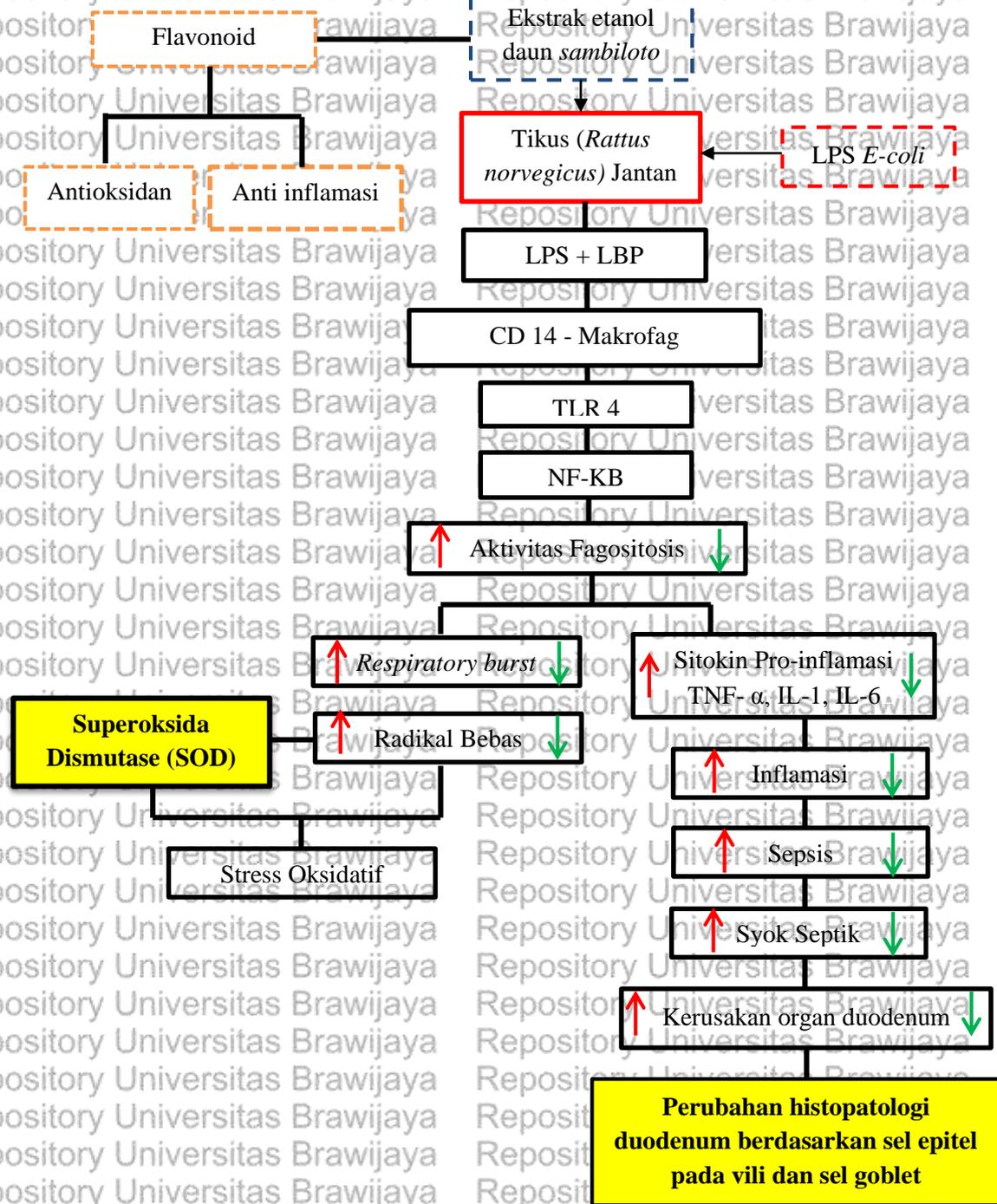


**Gambar 2.6** Struktur histopatologi duodenum yang mengalami proses inflamasi pada bagian tunika mukosa. Kerusakan villi akibat pelepasan sel epitel silindris ditunjukkan oleh tanda panah. Pewarnaan HE dengan perbesaran mikroskop 400x (Ningsih, 2012)

Hipertrofi sel goblet merupakan salah satu bentuk respon inflamasi yang terjadi pada usus halus. Sel goblet secara normal berfungsi sebagai penghasil cairan mukus yang digunakan untuk sterilisasi makanan (Frappier, 2006). Sel-sel radang seperti neutrofil dan limfosit banyak ditemukan pada kondisi inflamasi akut yang berperan untuk menghancurkan sel-sel yang rusak. Neutrofil yang muncul pada suatu inflamasi dapat menghasilkan enzim protease yang berperan dalam kerusakan jaringan (Dunlop dan Malbert, 2004).

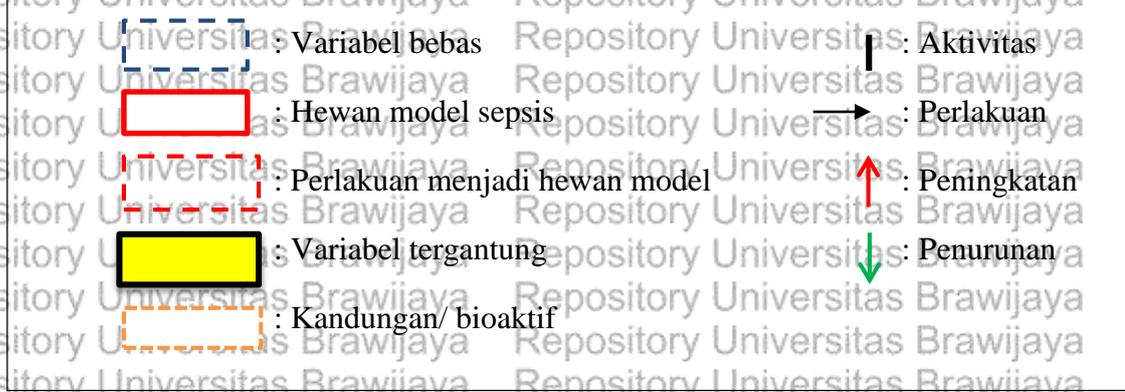


### BAB 3 KERANGKA KONSEP



Gambar 3.1. Kerangka-Konsep Penelitian

**Keterangan Gambar:**



Berdasarkan kerangka konsep tersebut, hewan coba tikus jantan strain Wistar di berikan ekstrak etanol daun sambiloto yang mengandung senyawa flavonoid secara sonde lambung selama 8 hari berturut-turut, sehingga diharapkan dapat memberi efek antioksidan dalam mencegah terbentuknya stress oksidatif ketika terjadi paparan. Setelah itu tikus di induksi lipopolisakarida (LPS) *E-coli* dengan dosis 2,0 mg/ kg BB secara intraperitoneal. Lipopolisakarida didalam darah akan berikatan dengan protein darah membentuk kompleks LPS-LBP. *Lipopolysaccharide Binding Protein* (LBP) merupakan protein fase akut didalam plasma yang disintesis oleh hepatosit, berperan penting dalam metabolisme LPS, dan sebagai tanda adanya infeksi. Kompleks LPS-LBP kemudian akan mentransfer LPS ke CD14 yang terdapat di permukaan makrofag. Setelah berikatan dengan LPS, CD14 berinteraksi dengan TLR4 sehingga menyebabkan aktivasi dari NF-kB. NF-kB merupakan faktor transkripsi pada makrofag yang akan meningkatkan produksi dari sitokin proinflamasi dan akan menghasilkan efek yang merusak jaringan saat terjadi sepsis. Aktivasi NFkB akan memicu aktivasi fagositosis makrofag sehingga menyebabkan sel-sel fagosit mengeluarkan



mediator inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 dan menginduksi transkripsi gen-gen inflamasi seperti radikal bebas dalam bentuk peroksidase lipid (Barnes, 1997).

Adanya radikal bebas yang masuk akan dinetralisir oleh antioksidan endogen didalam tubuh yaitu SOD (Superoxida dismutase). Namun, jika radikal bebas semakin meningkat akibat paparan LPS maka terjadi ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan endogen (SOD). Hal ini dapat menimbulkan kondisi stress oksidatif sehingga tubuh membutuhkan antioksidan lain yang berasal dari luar (aktioksidan eksogen). Flavonoid dari ekstrak etanol daun sambiloto diharapkan memiliki potensi untuk dapat mengurangi resiko sepsis melalui efek antioksidan yang dimiliki, sehingga dapat mengurangi jumlah radikal bebas yang dihasilkan pada kondisi sepsis. Flavonoid memiliki aktivitas antioksidan dengan cara menangkap radikal bebas melalui atom hidrogen yang berasal dari gugus hidroksil sehingga molekul radikal menjadi lebih stabil (Barnes, 1997).

Rangsangan inflamasi pada sel makrofag akan menyebabkan terjadinya kerusakan endotel pembuluh darah. Kerusakan endotel akan menyebabkan gangguan/defek vaskuler sehingga menjadi awal mula pada kondisi SIRS. SIRS yang disertai infeksi dari LPS akan menjadi sepsis. Terjadinya sepsis akan menimbulkan gejala kliniks hingga syok septik dan terjadi kerusakan organ multipel (Barnes, 1997). Sehingga dengan pemberian ekstrak daun sambiloto yang mengandung flavonoid sebagai penangkap radikal bebas akan menghambat aktivasi sel-sel inflamasi sehingga tidak terjadi respon inflamasi. Radikal yang ditangkap oleh flavonoid akan menjadi senyawa yang stabil dan akan mengurangi





jumlah senyawa radikal sehingga dapat mempercepat proses perbaikan dan melindungi epitel dari kerusakan organ duodenum sehingga dapat mencegah kerusakan organ duodenum yang dilihat dari gambaran histopatologi (Kashiwabara dan Asano, 2013).

### 3.2 Hipotesa Penelitian

Berdasarkan rumusan permasalahan, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) dapat mencegah sepsis pada tikus putih (*Rattus novergicus*) hasil induksi LPS berdasarkan pencegahan penurunan dari aktivitas enzim SOD.
2. Ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) dapat mencegah sepsis pada tikus putih (*Rattus novergicus*) hasil induksi LPS berdasarkan pencegahan kerusakan gambaran histopatologi duodenum.



## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April – Mei 2017 di beberapa laboratorium antara lain:

- Perawatan, perlakuan dan euthanasia hewan coba akan dilakukan di Laboratorium Epidemiologi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang.
- Proses ekstraksi daun sambiloto dideterminasi dan dilakukan di UPT. Materia Medika Batu.
- Pengukuran aktivitas SOD plasma akan dilakukan di Laboratorium FAAL Fakultas Kedokteran UB.
- Pembuatan preparat histopatologi duodenum akan dilakukan di Laboratorium Kesima Patologi Anatomi RSI Aisyiah Malang.
- Pengamatan preparat histologi akan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 4.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam pemeliharaan hewan coba antara lain adalah kandang pemeliharaan beserta serutan kayu sebagai alasnya, lampu, tempat pakan dan minum tikus putih. Alat untuk persiapan pemberian ekstrak daun sambiloto adalah sonde lambung khusus tikus dan gelas ukur. Alat untuk injeksi LPS *E-coli* adalah *disposable syringe*. Pengambilan darah

menggunakan alat *disposable syringe*, tabung *venoject* tutup ungu, *ice box*, dan *sprayer* alkohol. Pengukuran kadar enzim SOD dengan *disposable syringe*, tabung *venoject* EDTA, mikropipet, sentrifus dan spektrofotometer. Alat untuk euthanasi hewan coba adalah papan bedah, *dissecting set* (peralatan bedah), sarung tangan (*glove*), dan masker. Alat untuk pembuatan dan pengamatan sediaan histopatologi duodenum adalah *object glass*, *cover glass*, mikrotom, dan mikroskop cahaya. Alat-alat penunjang lain yang dibutuhkan adalah kamera, lemari pendingin, dan peralatan tulis.

#### 4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar*, LPS *E-Coli* (Sigma-Aldrich 0111:B4), ekstrak daun sambiloto, pelarut etanol 70%, alkohol 70%, dan akuades. Bahan yang dibutuhkan untuk mengukur kadar SOD plasma terdiri dari plasma darah, bufer natrium karbonat, bovine serum albumin (BSA), xantin, xantin oksida, dan NBT. Bahan yang dibutuhkan untuk pembuatan preparat histopatologi duodenum antara lain *buffer formalin* 4%, alkohol bertingkat, alkohol absolute, larutan xilol, paraffin cair, dan pewarna hematoxylin-eosin (HE).

#### 4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan yaitu:

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba.
2. Pembuatan sediaan, penentuan dosis dan pemberian preventif ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness).



3. Pemberian LPS *E-coli* pada hewan coba
4. Pengukuran kadar SOD plasma
5. Isolasi organ duodenum
6. Pembuatan dan pengamatan preparat histopatologi duodenum

#### 4.4 Prosedur Penelitian

##### 4.4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan Acak Lengkap digunakan apabila ragam satuan percobaan yang digunakan homogen atau seragam. Hewan model dibagi menjadi lima kelompok perlakuan dan masing-masing kelompok empat ulangan berdasarkan rumus menurut Montgomery and Kowalsky (2011):

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk lima kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal empat kali dalam setiap kelompok perlakuan sehingga dibutuhkan 20 ekor tikus. Lima kelompok perlakuan tersebut seperti pada **Tabel 4.1** yaitu kontrol positif (K+), kontrol negatif (K-), perlakuan 1, 2, dan 3. Kelompok kontrol positif (K+) merupakan tikus yang diinjeksi *LPS E-coli* secara intraperitoneal dengan dosis 2,0 mg/kg



BB. Kelompok kontrol negatif (K-) merupakan tikus sehat yang tidak diberi perlakuan. Kelompok perlakuan 1 (P1) merupakan tikus yang diberi ekstrak daun sambiloto dengan dosis 250 mg/ kg BB pada hari ke-8 hingga ke-15 kemudian diinjeksi *LPS E-coli* secara intraperitoneal pada hari ke-15 dengan dosis 2,0 mg/ kg BB. Kelompok perlakuan 2 (P2) merupakan tikus yang diberi ekstrak daun sambiloto dengan dosis 500 mg/ kg BB pada hari ke-8 hingga ke-15 kemudian diinjeksi *LPS E-coli* secara intraperitoneal pada hari ke-15 dengan dosis 2,0 mg/ kg BB. Kelompok perlakuan 3 (P3) merupakan tikus yang diberi ekstrak daun sambiloto dengan dosis 1000 mg/ kg BB pada hari ke-8 hingga ke-15 kemudian diinjeksi *LPS E-coli* secara intraperitoneal pada hari ke-15 dengan dosis 2,0 mg/ kg BB. Tikus diberikan preventif ekstrak daun sambiloto sebanyak satu kali dalam sehari.

**Tabel 4.1** Rancangan kelompok penelitian

Kelompok Perlakuan	Perlakuan
<b>Kelompok kontrol negatif (K-)</b>	Tikus sehat (tanpa perlakuan)
<b>Kelompok kontrol positif (K+)</b>	Tikus dengan pemberian <i>LPS E-coli</i> dosis 2,0 mg/ kg BB (pada hari ke-15) secara intraperitoneal
<b>Kelompok Perlakuan 1 (P1)</b>	Pemberian ekstrak daun sambiloto dengan dosis 250 mg/ kg BB (pada hari ke-8 hingga ke-15) dan <i>LPS E-coli</i> 2,0 mg/ kg BB (pada hari ke-15)
<b>Kelompok Perlakuan 2 (P2)</b>	Pemberian ekstrak daun sambiloto



### Kelompok Perlakuan 3 (P3)

dengan dosis 500 mg/ kg BB (pada hari ke-8 hingga ke-15) dan LPS *E-coli* 2,0 mg/ kg BB (pada hari ke-15)

Pemberian ekstrak daun sambiloto dengan dosis 1000 mg/ kg BB (pada hari ke-8 hingga ke-15) dan LPS *E-coli* 2,0 mg/ kg BB (pada hari ke-15)

#### 4.4.2 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini yaitu :

Variabel bebas : Dosis Ekstrak Daun Sambiloto dan LPS

Variabel tergantung : Aktivitas SOD dan histopatologi organ duodenum

Variabel kontrol : Tikus (*Rattus norvegicus*), jenis kelamin, umur, berat badan, lingkungan, suhu, pakan.

#### 4.4.3 Preparasi Hewan Coba (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dipersiapkan dan diadaptasi (aklimatisasi) selama tujuh hari untuk menyesuaikan kondisi laboratorium.

Tikus putih dipelihara dalam kandang bak plastik berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm yang dilengkapi dengan penutup kawat dikandangkan dengan pakan dan minum ad libitum. Lokasi kandang dan tempat pemeliharaan bebas dari polusi kendaraan dan industri, dengan suhu 27°C. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4 ekor tikus dan diberikan pakan berdasarkan dengan standar penyusunan ransum

untuk hewan coba *Association of Analytical Communities* (AOAC, 2005) yaitu ransum yang mengandung karbohidrat, lemak 3 %, protein 10%, mineral, vitamin dan air 12%.

#### 4.4.4. Pembuatan Sediaan Lipopolisakarida (LPS) *E-coli*

Lipopolisakarida (LPS) *E-coli* dari Sigma Aldrich 0111: B4 sebanyak 10 mg dilarutkan kedalam 10 ml *Phosphat Buffer Saline* (PBS) steril. Sediaan LPS dengan PBS steril kemudian di campur dengan menggunakan vortex mixer agar membentuk larutan yang homogen dengan kecepatan 500 rpm selama 5 menit dan di simpan didalam freezer dengan suhu -4°C (Laboratorium Ilmu FAAL FK UB, 2017).

#### 4.4.5. Pembuatan Hewan Model Sepsis

Injeksi sediaan LPS kedalam tubuh hewan coba tikus dilakukan secara intraperitoneal sebanyak satu kali pada hari ke-15. Dosis LPS yang digunakan adalah 2,0 mg/ kg BB (Qun Fu, 2014). Pemberian LPS ini diharapkan dapat menjadi radikal bebas didalam tubuh sehingga menyebabkan kondisi stress oksidatif dan terjadi sindroma sepsis.

#### 4.4.6 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness)

Bahan baku daun sambiloto yang digunakan diperoleh dari UPT Materia Medika Batu. Pembuatan ekstrak daun sambiloto berdasarkan pada penelitian (Rais, 2012). Langkah awal yaitu dilakukan proses preparasi meliputi tahap penyiapan bahan baku dan ekstraksi. Pada tahap penyiapan, daun sambiloto yang digunakan dipilih dan dibersihkan dari kotoran atau





debu yang melekat menggunakan air lalu dibilas dengan akuades. Setelah itu dilakukan penirisan dan pengeringan untuk mengurangi kadar air dalam tanaman agar reaksi enzimatis dapat dihentikan sehingga tidak mudah rusak. Daun sambiloto yang telah kering dihaluskan dengan mesin blender hingga menjadi serbuk. Serbuk simplisia kemudian diayak dengan ayakan 20 mesh. Pada tahap ekstraksi dimulai dengan menimbang serbuk daun sambiloto sebanyak 100 gram. Kemudian dilakukan pembasahan serbuk dengan pelarut etanol 70% secukupnya. Serbuk daun sambiloto yang telah dibasahi dengan pelarut kemudian dimasukkan ke dalam toples, diratakan, dan diberi tambahan pelarut etanol 70% hingga serbuk terendam (pelarut yang digunakan minimal 2 kali berat serbuk atau lebih). Toples ditutup dengan rapat selama 24 jam dan dishaker di atas shaker digital 50 rpm dengan tujuan untuk homogenisasi. Disaring ekstrak cair yang didapatkan dengan penyaring kain dan ditampung ekstrak ke dalam erlenmeyer. Dilakukan remaserasi sebanyak dua kali pada ampas dengan cara memasukkan kembali ke dalam toples dan ditambah pelarut sampai terendam (minimal 5 cm diatas permukaan serbuk). Kemudian biarkan semalam (24 jam) dan dishaker kembali. Hasil ekstrak pertama sampai dengan terakhir dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator selama dua jam sehingga diperoleh ekstrak etanol daun sambiloto kemudian disuspensikan ke dalam aquades hingga 100 mL.

#### 4.4.7 Pemberian Preventif Ekstrak Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness)

Penentuan dosis ekstrak daun sambiloto berdasarkan penelitian Ulumiyah (2012), yaitu 250 mg/Kg BB, 500 mg/Kg BB, dan 1000 mg/Kg BB sebagai hepatoprotektor. Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan dosis tersebut sebagai dosis eksperimental untuk preventif terhadap sepsis.

Pemberian preventif ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) diberikan pada hewan coba kelompok P1, P2, dan P3. Dosis pemberian preventif pada kelompok P1 sebesar 250 mg/gram BB, kelompok P2 sebesar 500 mg/gram BB dan kelompok P3 sebesar 1000 mg/gram BB. Pemberian ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) diberikan secara per oral dengan menggunakan sonde lambung selama 8 hari berturut-turut pada hari ke-8 hingga hari ke-15. Pemberian ekstrak daun sambiloto dilakukan sebanyak satu kali dalam sehari.

#### 4.4.8 Analisa Aktivitas Enzim SOD (Superoxide Dismutase)

Dilakukan pengambilan sampel darah pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) 6 jam setelah injeksi LPS *E.coli*. Pengambilan darah dilakukan melalui vena *coccygeal* menggunakan *disposable syringe* 5 cc. Sampel darah kemudian dimasukkan kedalam tabung *venoject* EDTA dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm sehingga plasma dan korpuskula akan terpisah. Pengukuran aktivitas enzim SOD dapat dilihat pada **Lampiran 6** (Kotan et al, 2011).

#### 4.4.9 Isolasi Organ Duodenum

Seluruh tikus putih (*Rattus norvegicus*) di euthanasia pada hari ke-22 penelitian atau 7 hari setelah pemaparan LPS dengan cara dislokasi *os cervix*. Tikus putih di posisikan rebah ventral dan dilakukan pembedahan pada rongga abdomen dengan tujuan untuk mengambil sampel organ duodenum. Sampel duodenum yang diperoleh, dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9% bertujuan untuk menghilangkan darah. Setelah organ diambil kemudian diinsisi secara melintang searah organ lalu diletakkan pada pot organ yang telah diberi formalin 10% (Jusuf, 2009).

#### 4.4.10 Pembuatan Preparat Histopatologi Duodenum

Proses pembuatan preparat histologi menurut (Junquiera, 2007). Organ duodenum yang sudah difiksasi dalam formalin 10% kemudian melalui beberapa tahap seperti pada **Lampiran 7**.

#### 4.4.11 Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE)

Pewarnaan preparat dengan *Hematoxylin-Eosin* (HE) untuk mewarnai jaringan. Zat warna *Hematoxylin* untuk memberi warna biru pada inti sel dan *Eosin* untuk memberi warna merah muda pada sitoplasma sel dengan tahapan seperti pada **Lampiran 8**.

#### 4.4.12 Analisis Data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini berupa hasil aktivitas enzim SOD dengan uji *OneWay ANOVA* (*Analysis of Variant*) dan uji lanjutan *BNJ* (Beda Nyata Jujur) dengan tingkat kepercayaan  $\alpha = 5\%$  apabila hasil analisis ragam berpengaruh nyata. ANOVA digunakan untuk



mengetahui perbedaan tiap kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol positif, kontrol negatif, kelompok perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2), dan perlakuan 3 (P3). Uji BNJ digunakan untuk mengetahui hasil yang paling berbeda nyata. Perubahan gambaran mikroskopis duodenum diamati secara kualitatif dengan mengamati sel epitel pada vili duodenum, pengamatan aktivasi sel goblet, dan sel radang (neutrofil) serta dilakukan dokumentasi kemudian dijelaskan secara deskriptif.



## BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Hasil Penelitian Induksi Lipopolisakarida Terhadap Terjadinya Sepsis

Pada penelitian ini digunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan sebagai hewan coba yang digunakan untuk membuat tikus model sepsis. Hewan model sepsis dibuat dengan memberikan lipopolisakarida (LPS) dengan dosis 2 mg/kg BB tikus. Pada kelompok kontrol positif yang telah diinjeksi LPS setelah 2 jam terlihat gejala klinis seperti hipertermi ( $39^{\circ}$ ), leukositosis ( $18.000/mm^3$ ) seperti pada (**Lampiran 12**), takikardia, takipnea, anoreksia dan piloereksi yang menandakan terjadinya inflamasi secara akut. Menurut Hermawan (2006), menyatakan bahwa kondisi sepsis ditandai dengan takipnea (frekuensi respirasi lebih dari 20 kali/menit), takikardia (frekuensi jantung lebih dari 100 kali/menit), hipertermia (temperatur tubuh lebih dari  $101^{\circ}F/38.3^{\circ}C$ ), leukositosis ( $>12.000/mm^3$ ).

Peningkatan radikal bebas pada tikus model sepsis diakibatkan karena induksi LPS secara intraperitoneal. Infeksi oleh LPS akan mengaktivasi sel-sel fagosit tetapi juga dapat meningkatkan metabolisme sel tubuh dengan membentuk dan membebaskan radikal bebas, proses ini disebut *respiratory burst* yang akan menghasilkan ROS dan apabila ROS meningkat secara berlebihan, akan menyebabkan terjadi reaksi yang bersifat kompleks dengan asam lipid tak jenuh penyusun fosfolipid pada membran sel, yang nantinya akan menyebabkan proses peroksidasi lipid. Peroksidasi



lipid terjadi akibat stress oksidatif yang menyebabkan ketidakseimbangan antara oksidan radikal bebas dengan antioksidan di dalam tubuh dan membentuk senyawa reaktif bersifat toksik yaitu malondialdehida (MDA) yang dapat memicu kematian sel serta kerusakan jaringan. *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) berperan dalam pelepasan NO (*Nitric Oxide*). Peningkatan NO akan menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah arteri, penurunan resistensi vaskuler sistemik, dan peningkatan permeabilitas yang akan menyebabkan sel endotel lisis. Kerusakan endotel akan menyebabkan gangguan/defek vaskuler sehingga menjadi awal mula pada kondisi sepsis. Terjadinya sepsis akan menimbulkan gejala berupa syok septik hingga mengakibatkan kerusakan jaringan dan disfungsi pada organ (Abbas dkk., 2015).

Menurut Radin (2015), gangguan pada keseimbangan ROS dan antioksidan merupakan karakteristik pada kondisi stress oksidatif pada sel imun sebagai respon terhadap endotoksin LPS. Senyawa flavonoid yang terkandung pada ekstrak daun sambiloto berperan sebagai pemutus rantai elektron radikal bebas dan pendonor atom hidrogen akan menjadi senyawa yang stabil dan akan mengurangi radikal bebas sehingga dapat mempercepat proses perbaikan dan melindungi dari erosi epitel. Menurut Qun Fu (2014), respon inflamasi akan terjadi mulai dari 2 jam pasca induksi lipopolisakarida *E.coli* setelah itu akan terjadi inflamasi secara sistemik dan setelah 7 hari pasca induksi akan terjadi kerusakan organ secara akut.

## 5.2 Pengaruh Preventif Ekstrak Etanol Daun Sambiloto pada Tikus Model Sepsis Terhadap Aktivitas Enzim SOD

Hasil uji aktivitas enzim SOD dilakukan analisa statistika menggunakan *one way analysis of variant* (ANOVA) dan didapatkan perbedaan hasil pengukuran yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antar kelompok (Tabel 5.1)

**Tabel 5.1 Hasil pengukuran aktivitas enzim SOD terhadap kelompok perlakuan**

Perlakuan	Rata-rata Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase (SOD) U/ml
Kontrol Negatif (sehat)	$8,68 \pm 0,545^b$
Kontrol Positif (sepsis)	$6,60 \pm 0,439^a$
P1 (250 mg/kg BB)	$7,80 \pm 0,598^b$
P2 (500 mg/kg BB)	$8,33 \pm 0,147^b$
P3 (1000 mg/kg BB)	$8,50 \pm 0,875^b$

**Keterangan :** Perbedaan notasi a dan b menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara kelompok perlakuan.

Berdasarkan hasil uji di atas, menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif (sehat) memiliki rata-rata aktivitas SOD yang berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif (sepsis). Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata aktivitas enzim SOD yang memuat notasi berbeda dan secara biologis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antar kelompok sehat dengan kelompok sakit. Pada kontrol negatif (sehat) enzim SOD mampu menetralsir radikal bebas secara normal. Rata-rata aktivitas enzim SOD pada kelompok kontrol negatif (sehat) yaitu ( $8,68 \pm 0,545$ ) digunakan untuk menentukan adanya kenaikan atau penurunan yang terjadi karena pengaruh perlakuan.

Enzim superoksida dismutase (SOD) merupakan salah satu enzim antioksidan yang dihasilkan oleh tubuh dan bereaksi merubah radikal bebas superoksida





( $O_2^-$ ) menjadi oksigen ( $O_2$ ) dan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Superoksida dihasilkan oleh metabolisme oksidatif sel yang dapat juga disebut ROS. Jika tidak dirubah maka akan menyebabkan kerusakan sel. Aktivitas enzim SOD memiliki peran penting dalam sistem pertahanan tubuh, terutama terhadap aktivitas senyawa oksigen reaktif yang dapat menyebabkan stress oksidatif (Winarsi, 2007). Adanya aktivitas SOD merubah ROS menjadi stabil berdampak positif bagi sel. Keadaan stress oksidatif akibat radikal bebas dapat dihindarkan. Kerja organel sel akan tetap normal karena radikal bebas dapat dinetralisir oleh enzim SOD.

Pada kelompok kontrol positif (sepsis) rata-rata aktivitas enzim SOD mengalami penurunan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yaitu sebesar  $(6,60 \pm 0,439)$  setelah induksi lipopolisakarida (LPS). Lipopolisakarida akan menstimulasi aktivasi NF-KB melalui mediator-mediator inflamasi seperti sitokin pro-inflamasi dan ROS (terutama hidrogen peroksida). NF-KB memiliki peran sentral dalam modulasi ekspresi dari mediator *immunoregulatory* yang terlibat dalam stress oksidatif dan pada sepsis. Pada kondisi sepsis, terdapat beberapa sumber potensial dari ROS salah satunya adalah aktivasi sel imun yang menghasilkan ( $O_2^-$ ) sebagai agen sitotoksik dan merupakan hasil pembakaran respirasi melalui aksi dari NADPH oksidase pada molekul oksigen yang terikat pada membran. Pembentukan NADPH oksidase diatur oleh neutrofil yang terpapar LPS dari bakteri gram negatif (Deleo *et al*, 1998). Pemberian LPS akan menginisiasi peningkatan kadar Rac2. Rac2 merupakan bagian kecil dari GTP-binding

protein yang berhubungan dengan  $P47^{phox}$  dan  $P67^{phox}$  (dua sub unit yang dibutuhkan dalam fungsi NADPH) yang terletak pada membran. Gangguan pada keseimbangan ROS dan antioksidan merupakan karakteristik pada kondisi stress oksidatif pada sel imun sebagai respon terhadap endotoksin LPS (Victor *et al*, 2005).

Menurut Hairuddin *et al* (2009), peningkatan radikal bebas didalam tubuh terus menerus mengakibatkan menurunnya aktivitas SOD. Semakin tinggi radikal bebas yang dihasilkan, semakin banyak pula yang gagal dinetralisir oleh antioksidan endogen dalam hal ini adalah SOD. Maka dari itu, tubuh membutuhkan antioksidan eksogen seperti flavonoid yang dapat membantu menangkal radikal bebas sehingga mencegah penurunan aktivitas enzim SOD.

Pada keadaan patologik dimana terbentuknya radikal yang berlebihan maka aktivitas dari enzim-enzim yang berfungsi sebagai antioksidan endogen dapat menurun. Oleh karena itu jika terjadi peningkatan radikal bebas dalam tubuh, dibutuhkan antioksidan eksogen dalam jumlah yang lebih banyak untuk mengeliminasi dan menetralsir efek dari radikal bebas (Astuti, 2008).

Tubuh mempunyai sistem pertahanan terhadap radikal bebas yang berupa antioksidan enzimatik dan non enzimatik. Sistem antioksidan enzimatik terdiri dari superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion yang tergabung dalam mekanisme pertahanan terhadap ROS (El-Bahr, 2013). Sistem pertahanan berikutnya adalah antioksidan non enzimatik yang dikenal



sebagai antioksidan sintetis atau suplemen makanan dan dapat diperoleh secara alami, yaitu dari tanaman. Zat aktif utama didalam daun sambiloto yang berfungsi sebagai antioksidan non enzimatis adalah flavonoid. Berdasarkan studi ilmiah yang sudah banyak dilakukan, diketahui bahwa pemberian ekstrak daun sambiloto dengan kandungan flavonoid didalamnya menunjukkan efek protektif terhadap aktivitas enzim SOD.

Pada penelitian ini, kandungan bioaktif flavonoid didalam ekstrak etanol daun sambiloto sebagai antioksidan diharapkan mampu mencegah terjadinya penurunan aktivitas enzim SOD. Pada kelompok perlakuan 1 (P1) dengan dosis (250 mg/ kg BB) memiliki rata-rata aktivitas SOD  $7,80 \pm 0,598$ . Sehingga dapat diartikan kelompok P1 belum mampu mencegah penurunan dari aktivitas mendekati aktivitas SOD kelompok kontrol negatif (sehat) dan belum menjadi dosis preventif terbaik untuk mencegah sepsis.

Aktivitas enzim SOD pada kelompok perlakuan 2 (P2) dengan dosis (500 mg/ kg BB) memiliki rata-rata  $8,33 \pm 0,147$ . Diketahui bahwa nilai rata-rata tersebut belum mampu menyamai atau mendekati aktivitas SOD pada kelompok kontrol negatif. Sehingga dapat diartikan bahwa kelompok perlakuan 2 (P2) belum menjadi dosis preventif terbaik untuk mencegah sepsis ditinjau dari penurunan aktivitas SOD.

Penurunan aktivitas enzim SOD terendah terdapat pada kelompok perlakuan 3 (P3) dengan dosis (1000 mg/ kg BB) memiliki rata-rata yaitu  $8,50 \pm 0,875$ . Nilai rata-rata aktivitas SOD tersebut hampir mendekati kelompok kontrol negatif. Secara statistika tidak terdapat perbedaan nyata

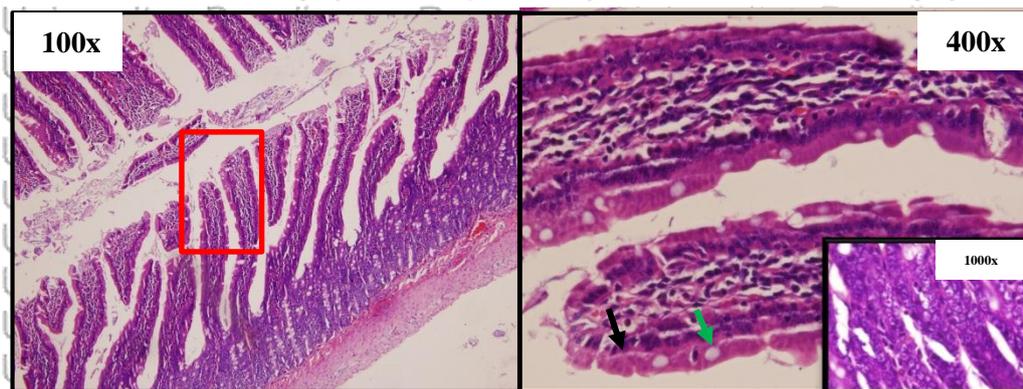


antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan, hal ini di buktikan dengan notasi sama yang dimiliki oleh kontrol negatif dan kelompok perlakuan. Namun secara rata-rata dapat menunjukkan adanya perbedaan antara ketiga kelompok perlakuan, dengan P3 yang memiliki nilai rata-rata mendekati kontrol negatif. Sehingga dapat diartikan bahwa P3 (dosis 1000 mg/kg BB) merupakan dosis terbaik pada penelitian ini untuk mencegah terjadinya sepsis.

Pemberian ekstrak etanol daun sambiloto dengan kandungan flavonoid sebagai antioksidan dan imunomodulator diketahui memiliki pengaruh terhadap aktivitas enzim SOD dalam menangkal radikal bebas. Menurut (Rahma, 2012) mekanisme kerja flavonoid (FI-OH) sebagai antioksidan yaitu dengan mentransfer atom hidrogen (H) dari gugus hidroksil (OH) kepada radikal bebas ( $R\cdot$ ) sehingga flavonoid berubah berubah menjadi fenoksis flavonoid ( $FIO\cdot$ ). Hal ini dikarenakan radikal fenoksis flavonoid mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi maka dapat menyeimbangkan dengan cara delokalisasi elektron sehingga menjadi senyawa yang lebih stabil. Menurut (Khumairoh, 2013) ketika terjadi kondisi penurunan sistem imun karena paparan dari LPS, kandungan flavonoid dalam ekstrak etanol daun sambiloto juga akan mengirimkan sinyal intra seluler pada reseptor untuk meningkatkan aktivitasnya.

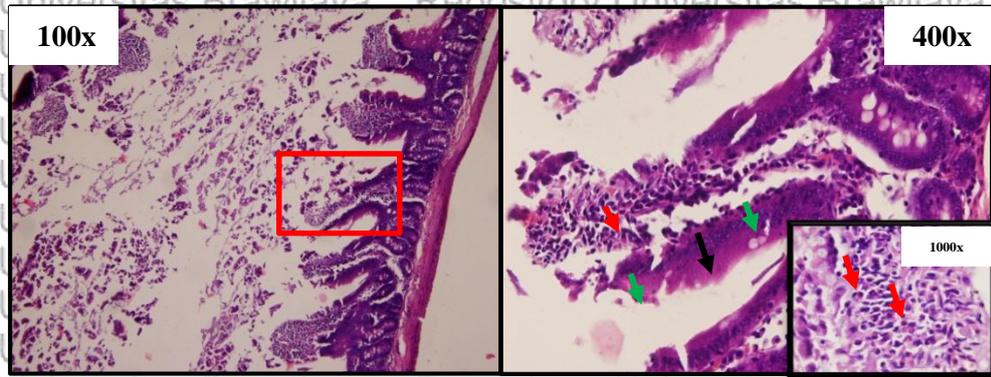
### 5.3 Pengaruh Preventif Ekstrak Etanol Daun Sambiloto pada Tikus Model Sepsis Terhadap Gambaran Histopatologi Duodenum

Penelitian ini juga menggunakan parameter histopatologi duodenum dengan menggunakan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE). Pengaruh preventif pemberian ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) terhadap struktur epitel duodenum pada hewan model sepsis dapat diamati dengan melihat perubahan gambar histopatologi duodenum secara mikroskopis. Kerusakan epitel sangat erat hubungannya dengan reaksi inflamasi yang terjadi pada jaringan, sehingga pengamatan ini dapat dijadikan acuan untuk mengetahui tingkat keberhasilan preventif yang dilakukan melalui gambaran perbaikan histopatologi yang didapat. Preparat histopatologi yang diamati menggunakan teknik pewarnaan Hematoksilin eosin untuk dapat memperlihatkan gambaran struktur epitel duodenum menjadi lebih jelas.

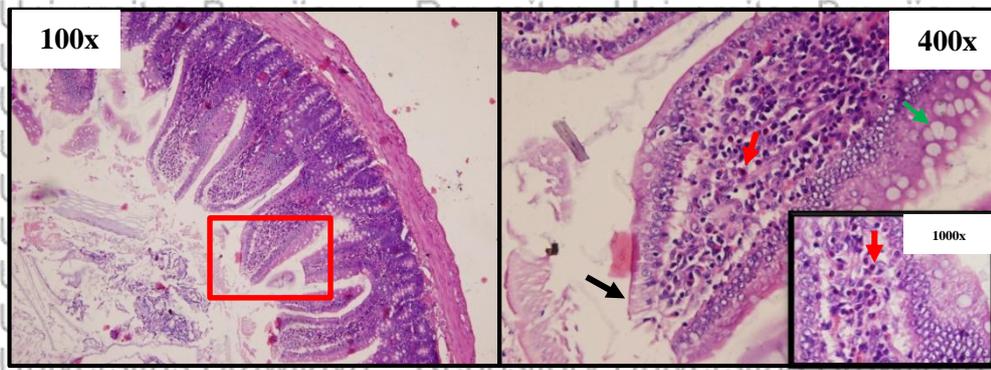


**Gambar 5.1.** Histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) kontrol negatif dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE).

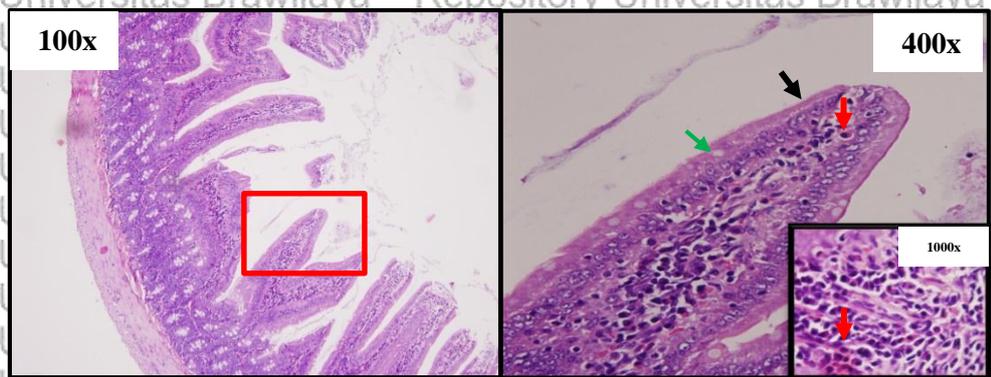
**Keterangan:** ( → ) sel epitel pada villi, ( → ) sel goblet



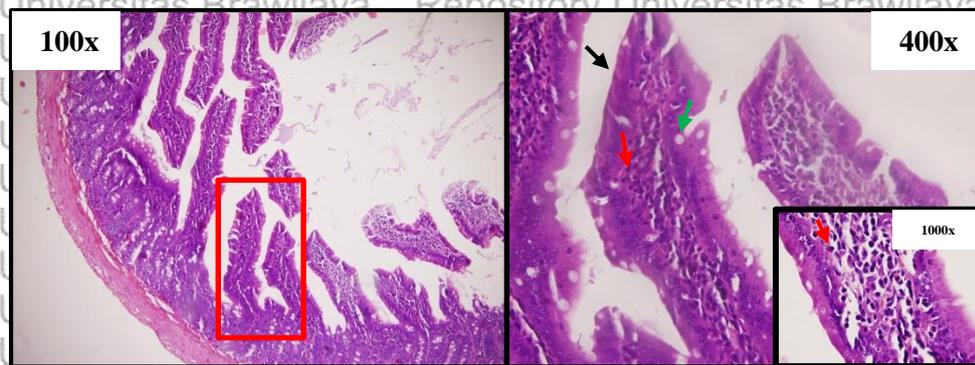
**Gambar 5.2.** Histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) kontrol positif dengan pewarnaan Hematoksinilin-Eosin (HE).  
**Keterangan:** ( → ) sel epitel pada vili, ( → ) sel goblet, ( → ) sel radang.



**Gambar 5.3.** Histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) perlakuan 1 (P1) dengan pewarnaan Hematoksinilin-Eosin (HE).  
**Keterangan:** ( → ) sel epitel pada vili, ( → ) sel goblet, ( → ) sel radang.



**Gambar 5.4.** Histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) perlakuan 2 (P2) dengan pewarnaan Hematoksinilin-Eosin (HE).  
**Keterangan:** ( → ) sel epitel pada vili, ( → ) sel goblet, ( → ) sel radang.



**Gambar 5.5.** Histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) perlakuan 3 (P3) dengan pewarnaan Hematoksinilin-Eosin (HE).

**Keterangan:** ( → ) sel epitel pada vili, ( → ) sel goblet, ( → ) sel radang.

Pada kelompok kontrol negatif (sehat) menunjukkan gambaran histopatologi duodenum dalam keadaan baik ditandai dengan sel epitel selapis silindris yang terdapat pada vili tersusun rapat, utuh dan tidak ada epitel yang mengalami deskuamasi. Inti sel berbentuk oval terletak dibagian basal dan hampir tidak ditemukan adanya sel radang (**Gambar 5.1**). Pada kelompok kontrol positif (sepsis) (**Gambar 5.2**) menunjukkan bahwa struktur sel epitel pada vili mengalami kerusakan bentuk dan tidak beraturan disertai kerusakan pada beberapa titik area yang lebih banyak dan memendek, hal ini dikarenakan sel epitel tidak mampu melakukan perluasan pada area vili duodenum akibat adanya inflamasi. Terlihat pula celah yang lebar dari tepi vili serta sel epitel yang tidak beraturan. Pada beberapa bagian tampak muncul adanya sel goblet. Pada kelompok perlakuan 1 (P1) dengan dosis preventif ekstrak etanol daun sambiloto 250 mg/kg BB menunjukkan bahwa masih terdapat kerusakan struktur sel epitel pada vili, namun tidak separah kontrol positif (sepsis). Tidak terlihat celah dari tepi vili, namun pada





beberapa bagian sel goblet dan sel radang sebagai tanda inflamasi masih banyak ditemukan (**Gambar 5.3**). Pada kelompok perlakuan 2 (P2) dengan dosis preventif ekstrak etanol daun sambiloto 500 mg/kg BB terlihat struktur sel epitel pada vili dalam keadaan baik, tersusun utuh, dan rapat. Tidak terlihat celah dari tepi vili. Sel goblet dan sel radang mulai tidak banyak ditemukan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan P1 (**Gambar 5.4**). Pada kelompok perlakuan 3 (P3) dengan dosis preventif ekstrak etanol daun sambiloto 1000 mg/ kg BB terlihat bahwa struktur sel epitel pada vili dalam keadaan baik, tersusun utuh dan rapat. Tidak ditemukan adanya batas atau celah dari tepi vili. Sel goblet terlihat jarang bahkan hampir tidak ada dan sel radang telah berkurang jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, P1, dan P2 (**Gambar 5.5**).

Pemunculan sel goblet ini merupakan respon inflamasi yang terjadi di dalam usus halus. Menurut Frappier (2006), sel goblet berfungsi untuk mensekresi mukus yang digunakan sebagai pelumas isi usus dan perlindungan epitel. Fungsi utama dari vili pada usus halus adalah untuk meningkatkan penyerapan nutrisi dari makanan yang lewat melalui usus halus sedangkan lamina propria merupakan jaringan penyambung yang kaya akan pembuluh darah kapiler, sel-sel otot polos, kelenjar-kelenjar dan jaringan limfoid.

Kerusakan struktur sel epitel terjadi karena paparan LPS yang diterima oleh tubuh sehingga menyebabkan peningkatan radikal bebas yang memicu kerusakan ikatan lipid bilayer membran sel. Ikatan membran lipid



bilayer yang rusak berakibat pada ketidakmampuan sel epitel duodenum dalam mempertahankan keutuhan membrannya sehingga terjadi destruksi sel-sel epitel silindris. Kerusakan pada vili duodenum memicu kemunculan sel-sel inflamasi seperti limfosit, monosit, dan neutrofil. (Okta, 2013).

Celah lebar yang berada di tepi vili disebabkan karena sel epitelium permukaan duodenum langsung bersentuhan dengan substansi toksin yang terabsorpsi. Celah tersebut terjadi karena rusaknya permeabilitas membran sel akibat pengaruh endotoksin LPS (Robbins, 1992). Pada kelompok kontrol positif juga ditemukan sel radang dalam jumlah banyak, terutama limfosit. Limfosit berfungsi sebagai agen fagositosis serta berhubungan dengan pembentukan antibodi humeral dan seluler.

Pencegahan kerusakan dipengaruhi oleh kandungan flavonoid pada ekstrak etanol daun sambiloto yang mampu mendonasikan atom hidrogen dari gugus hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ) kepada radikal bebas ( $\text{R}\cdot$ ) sehingga mengubah flavonoid menjadi radikal fenoksil flavonoid ( $\text{FIO}\cdot$ ) yang memiliki elektron lebih stabil (Rahmah, 2012). Hal ini dikarenakan kandungan flavonoid pada ekstrak daun sambiloto mampu menyeimbangkan radikal bebas yang terbentuk akibat induksi alergen. Menurut Rahma (2012), flavonoid akan meningkatkan aktivitas enzim SOD (*Superoxide Dismutase*), peningkatan aktivitas SOD dan radikal fenoksil flavonoid ( $\text{FIO}\cdot$ ) akan menyeimbangkan radikal bebas sehingga kerusakan sel akibat radikal bebas juga berkurang.

Menurut Wardworth dkk. (2002) yang menyatakan bahwa pada saat epitel terlepas dari basal vili, plasma dari endotel akan menuju ketempat



kerusakan epitel dan menutup daerah basal dari vilus. Plasma tersebut berfungsi sebagai mediator untuk reseptor yang menginduksi terjadinya perbaikan sel epitel. Membran basalis yang terbuka akibat epitel yang terlepas akan tertutup oleh sel epitel dari sekitar kerusakan. Setelah itu terjadi proses proliferasi dan diferensiasi untuk mengembalikan struktur dan fungsi epitel dengan *barrier* aktif. Tahap perbaikan dan remodeling epitel tersebut dalam kondisi normal distimulasi dengan *growth factor*, sitokin, reseptor permukaan sel, molekul adhesi, dan sekresi mukus yang memodulasi fungsi protein dan lipid yang mengatur proses perbaikan epitel.

Daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) mengandung flavonoid yang merupakan senyawa fenolik sebagai antiinflamasi, antioksidan, dan imunomodulator (Middleton dkk., 2000). Mekanisme flavonoid dari sambiloto sebagai penangkap radikal bebas akan menghambat aktivasi sel-sel inflamasi sehingga tidak terjadi respon inflamasi. Radikal yang ditangkap oleh flavonoid akan menjadi senyawa yang stabil dan akan mengurangi jumlah senyawa radikal sehingga dapat mempercepat proses perbaikan dan melindungi epitel dari kerusakan organ duodenum agar tidak semakin parah. (Kashiwabara dan Asano, 2013). Pada penelitian ini hasil terbaik ditunjukkan pada kelompok P3 yaitu kelompok sepsis yang diberi preventif ekstrak etanol daun sambiloto dengan dosis 1000 mg/kg BB (**Gambar 5.5**) ditinjau dari epitel silindris selapis pada struktur vilus yang mampu mempertahankan bentuk normalnya serta sel goblet dan sel radang yang mulai berkurang bahkan hampir tidak ditemukan.





## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian serta analisa yang telah dilakukan terkait dengan variabel yang diamati, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa pemberian ekstrak etanol daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) mampu mencegah sepsis pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) hasil induksi lipopolisakarida (LPS) *Escherichia coli* yang ditinjau dari pencegahan penurunan aktivitas enzim SOD plasma dan pencegahan kerusakan histopatologi duodenum yang terbaik dalam penelitian ini pada dosis preventif 1000 mg/ kg BB.

### 6.2 Saran

Diperlukan kajian lebih lanjut untuk penentuan dan pemberian dosis optimum ekstrak etanol daun sambiloto sebagai preventif pada hewan model sepsis hasil induksi lipopolisakarida (LPS) *Escherichia coli* sehingga dapat memperdalam penelitian tentang pencegahan terjadinya sepsis.



## DAFTAR PUSTAKA

AOAC, International. 2005. *Officials Methods of Analysis of AOAC International*. 2 Vols. 16 Edition. Arlington VA. Association of Analytical Community. USA.

Barnes, P.J. (1997) dalam Edila, R. 2015. *Pengaruh Pemberian Vitamin C Terhadap Diameter Arteriol Pada Tikus Wistar Model Sepsis*. Fakultas Kedokteran. Universitas Surakarta.

Besselsen, D. G. 2004. Biology of laboratory rodent. [terhubung berkala]. <http://www.ahsc.arizona.edu/> [10 Maret 2017].

Bratawidjaja, K.G dan I, Rengganis. 2010. *Imunologi Dasar*. Universitas Indonesia Press. Jakarta.

CA, Brady. 2000. *Severe sepsis in cats: 29 cases (1986-1998)*. Veterinary Medical Center. New York.

Caramori, G. dan A. Papi. 2004. *Oxidants and Asthma*. Thorax 59 (2): 170-173.

Castell, C.D. (2006) dalam Faridah, H. 2009. *Perbedaan Derajat Inflamasi Usus Pada Mencit Balb/C Model Sepsis Paparan Lipopolisakarida Dengan Cecal Inoculum*. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret.

Chen G.H., Reddy R.C., Newstead M.W., Tateda K., Kyasapura B.L., Standiford T.J. 2000. Intrapulmonary Tnf Gene Therapy Reverses Sepsis-Induced Suppression Of Lung Antibacterial Host Defense. *The Journal Of Immunology*, 165,P : 6496–6503

Chinnaiyan A.M., Lang M.H., Sinha C.K., Barrette T.R., Sinha S.S., Sarma V.J., Padgaonkar V.A., Ward P.A.. 2001. Molecular Signatures of Sepsis Multiorgan Gene Expression Profiles of Systemic Inflammation. *Am J Pathol. October*; 159(4): 1199–1209.

Chopra, S (2007) dalam Ulumiyah, Dwi. 2012. *Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Sambiloto (Andrographis Paniculata) Sebagai Hepatoprotektor Terhadap Kadar Sgot/Sgpt Tikus Yang Diinduksi Parasetamol*. Fakultas Farmasi. Universitas Jember.

Daniel G., Remick, M.D. 2007. *Pathophysiology Of Sepsis. The American Journal Of Pathology* Vol 120, No. 5, Pp :1435-8

Denbow, D.M. 2000. *Gastrointestinal anatomy and physiology*. In: Sturkies Avian Physiology. 5th ed. (G.C Whittow, ed). San Diego, California: Academic Press, pp.299-325.

Dorland W.A. 1998. *Kamus Kedokteran Dorland*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta, Pp : 199, 559, 979.

Dunlop, RH. And Malbert, C.H. 2004. *Phatophysiology of The Gastrointestinal Tract*. Veterinary Pathophysiology. Iowa: Blackwell Publishing. Pp: 111-142.

Eroschenko, V. 2003. *diFlore's Atlas of Histology with Functional Correlations* ed 9 terjemahan. Tambaong J ed. Jakarta: p. 196-197.

Fitriyani, Atik, Lina Winarti, Siti Muslichah dan Nuri. 2011. *Uji Inflamasi Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (Piper crocatum Ruiz & Pav) pada Tikus Putih*. Majalah Obat Tradisional. 16(1), 34 – 42.

Frappier, B.L. 2006. *Digestive System*. Di dalam J.A Eurell dan B.L. Frappier, editor. *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*. Edisi ke-6. Oxford: Blakwell Publishing. Halaman 170-211.

Gartner LP, Hiatt JL. 2001. *Color Textbook of Histology*. Ed ke-2. Philadelphia: W.B Saunders Company.

Garrido A.G, Poli De Figueiredo L.F, Rocha E Silva M. Experimental Models Of Sepsis And Septic Shock : An Overview. *Acta Cirurgica Brasileira – Vol 19 (2) 2004.*, Pp: 82-8

Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Mocchegiani F., Del Prete M.S., Viticchi C., Kamysz W., Lempicka E.B., Saba V., Scalise G. 2002. Potential Therapeutic Role Of Cationic Peptides In Three Experimental Models Of Septic Shock. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, July 2002, Vol. 46, No. 7, P : 2132.

Guntur A.H. 2008. *Sepsis. Sirs, Sepsis, Dan Syok Sepsis (Imunologi, Diagnosis, Penatalaksanaan)*. Surakarta : Sebelas Maret University Press, Pp : 1-8.

Guyton, A and Hall, J.E. 2007. *Textbook of medical physiology* ed 11 terjemahan. Setiawan I ed. Jakarta: p. 814-859.

Halliwell and Whiteman. 2004. Measuring Reactive Species and Oxidative Damage in Vivo and in Cell Culture: How Should You Do It and What Do The Result Mean?. *British Journal of Pharmacology* 142: 231-255.

Himawan, S. 1992. *Patologi Bagian Anatomi*. Universitas Indonesia Press. Jakarta.



Isola et al, 2013. *Severe sepsis and septic shock survival in a clinical canine model*. Universidade Estadual Paulista. Brazil.

Jayakumar, T. 2012. *Experimental and Clinical Pharmacology of Andrographis paniculata and its Major Bioactive Phytoconstituent Andrographolide*. Hindawi Publising Corporation. Taiwan.

James M.J., Naeem A.A., And Edward A. 2005. *Year In Review In Critical Care, 2004: Sepsis And Multi-Organ Failure*. *Critical Care*. 9(4): 409–413.

Jessen K.M., Lindboe S.B., Petersen A.L., Olsen J.E., Benfield T. 2007. Common TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PAI-1, uPA, CD14 and TLR4 Polymorphisms are Not Associated with Disease Severity or Outcome from Gram Negative Sepsis. *BMC Infectious Diseases* 2007, 7:108

Johnson, M. 2012. Laboratory Mice and Rats. Labome: The world of laboratories. *Synatom Research, United States. Mater Methods*, 2 : 113.

Jones Daniel O'connor. 2007. *Crash course pathology 2<sup>nd</sup>ed*. St. Louis: C.V. Mosby Co., p:17.

Junqueira, L.C., dan J, Carneiro. 2005. *Basic Histology: text and atlas. 11<sup>st</sup> Edition*. McGraw-Hill's Access Medicine.

Jurgen B., Edda K., Claudia DS., Björn L., Patrick S., Ortrud VH., Matthias G., Dragan P., TU., Michael W., Wolfgang JK., and Christian L. 2006. Effects of dexamethasone on the intestinal microvascular blood flow and leucocyte activation in a sepsis model in rats. *Critical Care*.10(4): R117.

Kashiwabara, M.S., dan K. Kasano. 2013. *Inhibitory Action of Quercetin on Eosinophil Activation in Vitro*. Evid Based Complement Alternative Med,doi :10.1155/2013/12705.

Kenney, E. 2010. *Association between outcome and organ system dysfunction in dogs with sepsis: 114 cases (2003–2007)*. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal. Canada.

Kotan VO, Sarandol E, Kirhan E, Ozkaya G, Kirli S. 2011. *Effects of long-term antidepressant treatment on oxidative status in major depressive disorder: a 24-week follow-up study*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. Vol. 35, 1284–1290.

Middleton, E., C, Kandaswami., dan T.C, Theoharides. 2000. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological Reviews*,52(4): 673-751



Mescher, Anthony. 2010. *Basic Histology Text And Atlas* Twelfth Edition. Boston: Mc Graw Hill Co. Indiana.

Okta, Wahyuni. 2013. *Gambaran Histopatologi Duodenum dan Ekspresi Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) pada Tikus Hiperkolestrolemia dengan Terapi Yoghurt Susu Kambing*. Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Malang

Price, S., and Wilson, L. 2005. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Ed 6. Jakarta: p. 437-443.

Qun Fu, Hui. 2014. *Prolonged Neuroinflammation After Lipopolysaccharide Exposure In Aged Rats*. Plos One. China. Vol 9 Issue 8.

Rais, Ichwan. 2012. *Ekstraksi Andrografolid Dari Androprgraphis Paniculatas (Burm.F.) Nees Menggunakan Ekstraktor Soxhlet*. Pharmaciaana. Jogjakarta. Vol.4, No. 1, 2014 : 85-92

Redha, A. 2010. *Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya dalam Sistem Biologis*. Jurusan Teknologi Pertanian Politeknik Negeri Pontianak. Jurnal Belian 9(2): 196-202.

Retnaningsih,C. 2013. *Peningkatan Aktivitas Antioksidan Superoksida Dismutase pada Tikus Hiperqlikemi dengan Asupan Tempe Koro Bengkuk (Mucuna Pruriens L.)*. Agritech. Semarang. Vol. 33, No. 2.

Rey E.G., Chorny A., Robledo G., Delgado M. 2006. *Cortistatin, A New Antiinflammatory Peptide With Therapeutic Effect On Lethal Endotoxemia*. Jem Vol. 203, No. 3, March 20, 2006.Pp. 563–571

Robbins dan Kumar. 1992. *Patologi I Edisi 4*, Alih Bahasa: Staff pengajar Laboratorium Patologi Anatomi UNAIR. Buku Kedokteran ECG. Jakarta.

Ross, M., G. Kaye and W. Pawlina. 2002. *Hystology A Text and Atlas Edisi Ke-4*. Blackwell. Halaman 256-265.

Routsis C., Giamarellos-Bourboulis E.J., Antonopoulou A., Kollias S., Siasiakou S., Koronaios A., Zakyntinos S., Armaganidis A., Giamarellou H. 2005. Does Soluble Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells-1 Play Any Role In The Pathogenesis Of Septic Shock?. *British Society For Immunology* 142 :62-3

Shahin G., Ole Graesboll K., Court P., and Syvend S.P. 2006. Procalcitonin, lipopolysaccharide-binding protein, interleukin-6 and C-reactive protein in community-acquired infections and sepsis; a prospective study. *Critical Care*, 10:R53.



Silverstein, Deborah. 2015. Controversies Regarding Choice Of Vasopressor Therapy For Management Of Septic Shock In Animals. *Journal Of Veterinary Emergency And Critical Care* 25(1) 2015, Pp 48–54

Sukandar, E. Y. 2004. Sembilan Tanaman Obat Unggulan Hasil Uji Klinis Badan Pom. [www.Beritabumi.or.id](http://www.Beritabumi.or.id). [Diakses pada 12-12-2016]

Sumarni S., Guntur A.H., *Sepsis In Eldery*. Surakarta : Sebelas Maret University Press, P:143.

Wadsworth, S.J., S. J, Yang., dan D.B, Dorscheid. 2012. IL-13, Asthma and Glycosylation in Airway Epithelial Repair. License InTech Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology. <http://dx.doi.org/10.5772/51970>

Widyawati, Tri. *Aspek Farmakologi Sambiloto (Andrographis Paniculata Nees)*. Majalah Kedokteran Nusantara. Sumatera Utara, Volume 40, No. 3

