PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK METANOL DAUN KOSAMBI *(Schleichera oleosa)* TERHADAP KADAR *TRANSFORMING GROWTH FACTORS* (TGF)-β1 PADA TIKUS WISTAR MODEL FIBROSIS HEPAR

SKRIPSI

Oleh:

AATHIFAH

NIM : 16910005

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU-ILMU KESEHATAN
UIN MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK METANOL DAUN KOSAMBI *(Schleichera oleosa)* TERHADAP KADAR *TRANSFORMING GROWTH FACTORS* (TGF)-β1 PADA TIKUS WISTAR MODEL FIBROSIS HEPAR

SKRIPSI

Diajukan Kepada:
Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran (S. Ked)

Oleh:
AATHIFAH
NIM. 16910005

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2020

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK METANOL DAUN KOSAMBI *(Schleichera oleosa)* TERHADAP KADAR *TRANSFORMING GROWTH FACTORS* (TGF)-β1 PADA TIKUS WISTAR MODEL FIBROSIS HEPAR

SKRIPSI

Oleh:

AATHIFAH
NIM. 16910005

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal : 22 Mei 2020

Pembimbing I,	Pembimbing II,
drg. Anik Listiyana, M.Biomed	dr. Amalia Tri Utami, M.Biomed
NIP. 198008052009122001	NIP. 199104112017012012

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

dr. Nurlaili Susanti, M. Biomed
NIP. 198310242011012007

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK METANOL DAUN KOSAMBI *(Schleichera oleosa)* TERHADAP KADAR *TRANSFORMING GROWTH FACTORS* (TGF)-β1 PADA TIKUS WISTAR MODEL FIBROSIS HEPAR

SKRIPSI

Oleh:

AATHIFAH
NIM. 16910005

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked).

Tanggal: 22 Mei 2020

Penguji Utama	dr. Iwal Reza Ahdi, Sp.PD NIP. 198607202018011002	
Ketua Penguji	dr. Amalia Tri Utami, M.Biomed NIP. 19910411201701012112	
Sekretaris Penguji	drg. Anik Listiyana, M.Biomed NIP. 198008052009122001	
Anggota Penguji	Nur Toifah, M.Pd NIP. 19810915201802012216	

Mengesahkan,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

dr. Nurhaili Susanti, M. Biomed
NIP. 198310242011012007

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orang tuaku, Bapak Edy Susanto dan Ibu Rini Anggrahini;
2. Saudara perempuanku, Sharfina;
3. Guru-guruku sejak taman kanan-kanak sampai dengan perguran tinggi;
4. Almamater Fakultas Kedokteran UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Aathifah

NIM : 16910005

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan saya.

Malang, 08 April 2020

Yang membuat pernyataan,

Aathifah

NIM. 16910005

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, serta sholawat dan salam kepada Nabi Muhammad SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi di Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sekaligus menyelesaikan skripsi ini dengan baik.

Penulis haturkan terimakasih seiring dengan do'a dan harapan *jazakumullah ahsanal jaza'* kepada seluruh pihak yang telah berpartisipasi dan membantu dalam menyelesaikan skripsi ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Prof. DR. H. Abd. Haris, M.Ag, selaku rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Prof. Dr. Dr. Bambang Pardjianto, Sp.B, Sp.BP-RE (K), selaku dekan FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. dr. Nurlaili Susanti, M. Biomed, selaku ketua Program Studi Pendidikan FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. drg. Anik Listiyana, M.Biomed, selaku dosen pembimbing I, yang telah memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini.
5. dr. Amalia Tri Utami, M.Biomed, selaku dosen pembimbing II, yang telah memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini.
6. dr. Tias Pramesti Griana, M. Biomed, selaku dosen pembina penelitian yang telah memberikan pengarahan dan pengalaman yang berharga.
7. dr.Iwal Reza Ahdi, Sp. PD., selaku dosen penguji skripsi, atas segala masukan dan arahan yang sangat bermanfaat dalam pengerjaan skripsi ini.
8. Segenap sivitas akademika Program Studi Pendidikan Dokter, terutama seluruh dosen, terima kasih atas segenap ilmu, motivasi, dan bimbingannya.
9. Bapak Edy Susanto dan Ibu Rini Anggrahini, orang tua tercinta yang telah memberikan doa, kasih sayang, nasehat, dukungan, dan restunya kepada penulis dalam menuntut ilmu.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

10. Rekan kerjaku, Achmad Tri K.I.F., Vicky Andrean, M. Reza Riandinata atas bantuan dan dukungannya selama penelitian.
11. Sahabat dan motivatorku, Nadiya Putri H., Hafshah Yasmina A., Nurlita Fianti M., Qonitatul Yumna, Alif Raudhah H.K., Maulidya M. atas bantuan dan kesabaran mendengarkan setiap keluh kesah selama belajar di UIN Malang.
12. Sejawat FKIK UIN Malang angkatan 2016 (NEONATUS), atas dukungan, bantuan dan kerjasamanya.
13. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materiil maupun moril.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan masukan yang membangun. Penulis berharap semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya bagi penulis pribadi. *Amin Ya Rabbal Alamin.*

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, 08 April 2020

Penulis

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL ..... **i**
HALAMAN PERSETUJUAN ..... **ii**
HALAMAN PENGESAHAN ..... **iii**
HALAMAN PERSEMBAHAN ..... **iv**
HALAMAN PERNYATAAN ..... **v**
KATA PENGANTAR ..... **vi**
DAFTAR ISI ..... **ix**
DAFTAR TABEL ..... **xi**
DAFTAR GAMBAR ..... **xii**
DAFTAR LAMPIRAN ..... **xiii**
DAFTAR SINGKATAN ..... **xiv**
ABSTRAK ..... **xvi**
BAB I PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 8
1.3 Tujuan Penelitian 8
1.4 Manfaat Penelitian 9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA 10
2.1. Hepar 10
2.1.1. Anatomi Hepar 10
2.1.2. Histologi Hepar 12
2.1.3. Fisiologi Hepar 15
2.2. Fibrosis Hepar 18
2.2.1. Definisi 18
2.2.2. Epidemiologi 19
2.2.3. Etiologi 19
2.2.4. Patogenesis 21
2.2.5. Manifestasi Klinis 31
2.2.6. Diagnosis 32
2.2.7. Penatalaksanaan 35
2.3. Karbon Tetraklorida (CCl_4) 38

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

2.3.1 Mekanisme Kerusakan Jaringan Hepar Akibat CCl_4 38
2.3.2 Histopatologi Kerusakan Jaringan Hepar Akibat CCl_4 41
2.4. Kosambi..... 44
2.4.1. Taksonomi dan Morfologi Kosambi..... 45
2.4.2. Kandungan Ekstrak Daun Kosambi..... 46
2.4.3. Manfaat Ekstrak Daun Kosambi dalam Pengobatan 46
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS 50
3.1. Kerangka Konsep Penelitian 50
3.2. Hipotesis Penelitian..... 54
BAB IV METODE PENELITIAN.....55
4.1. Desain Penelitian..... 55
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian 55
4.2.1. Tempat Penelitian..... 55
4.2.2. Waktu Penelitian..... 56
4.3. Populasi Penelitian 56
4.4. Sampel Penelitian..... 56
4.4.1 Besar Sampel 56
4.4.2. Teknik Pengambilan Sampel 58
4.4.3. Karakteristik Sampel 58
4.4.3.1. Kriteria Inklusi 58
4.4.3.2. Kriteria Eksklusi..... 58
4.4.3.3. Kriteria Drop Out 58
4.5 Variabel Penelitian 58
4.6. Alat dan Bahan Penelitian 59
4.6.1. Alat Penelitian 59
4.6.2. Bahan Penelitian..... 60
4.7. Definisi Operasional..... 61
4.8. Prosedur Penelitian..... 61
4.8.1. Determinasi Tanaman..... 61
4.8.2. Persiapan Hewan Coba..... 61
4.8.3. Pembuatan Model Hewan Coba Fibrosis Hepar..... 62
4.8.4. Pembuatan Ekstrak Daun Kosambi 63

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4.8.5. Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Kosambi untuk Sonde 63
4.8.6. Pemberian Terapi Ekstrak Daun Kosambi 64
4.8.7. Pengambilan Sampel Organ Hepar 65
4.8.8. Pengukuran Kadar TGF-β dengan *Flow Cytometry* 65
4.8.9. Analisis Hasil *Flow Cytometry* 66
4.9. Alur Penelitian 67
4.10. Analisis Data 67
BAB 6 HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN 70
5.1.Hasil Penelitian 70
5.1.1 Hasil Pengukuran Kadar TGF-β1 Hepar 70
5.1.2 Analisis Data 74
5.2.Pembahasan 76
5.2.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kosambi (*Schleichera oleosa*) terhadap Kadar TGF-β1 Hepar 76
5.2.2. Kajian Integrasi Islam 84
KESIMPULAN DAN SARAN 88
DAFTAR PUSTAKA 90

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Sistem Skoring METAVIR untuk Menilai Progresi Fibrosis 34
Tabel 2.2 Sistem Skoring METAVIR untuk Menilai Tingkat Fibrosis 34
Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan Hewan Coba 57
Tabel 5.1 Rata-rata Kadar TGF-β1 pada Organ Hepar Tikus 73

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Hati Tampak Depan (A), Atas (B), dan Belakang (C) 10
Gambar 2.2 Lobulus Hati Primata Potongan Transversal 13
Gambar 2.3 Lobulus Hati (a), Hepatosit dan Sinusoid (b), dan Trias Porta (c) 14
Gambar 2.4 Urutan Patogenik dari Perkembangan Penyakit Hati Kronis 22
Gambar 2.5 Aktivasi Sel Stelata Menjadi Miofibroblas 23
Gambar 2.6 *Pathway* Aktivasi HSC 25
Gambar 2.7 Algoritma Diagnosis Sirosis dan Penyakit Hati Kronis 33
Gambar 2.8 Steatosis Hepatosit 41
Gambar 2.9 Nekrosis Hepatosit 43
Gambar 2.10 Daun (A) dan Akar (B) Kosambi 45
Gambar 2.11 Pohon (a), Buah (b), Biji (c) dan Minyak Kosambi (d) 45
Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konsep Penelitian 50
Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian 67
Gambar 5.1 Kadar TGF-β1 Hepar dengan *Flow Cytometry* 72
Gambar 5.2 Grafik Rata-rata Hasil Pengukuran Kadar TGF-β1 pada Organ Hepar Tikus Menggunakan *Flow Cytometry* 74

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Dosis CCl_4 96
Lampiran 2. Perhitungan Dosis Ekstrak Daun Kosambi 97
Lampiran 3. Keterangan Determinasi Kosambi (*Schleichera oleosa*) 99
Lampiran 4. *Ethical Clearance* 100
Lampiran 5. Hasil Pengukuran *Flow Cytometry* TGF-β 101
Lampiran 6. Hasil Analisis SPSS 115
Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian 117

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR SINGKATAN

β2SP	: β2-spectrin
5-HT	: 5-Hydroxy tryptamine
aHSC	: Activated Hepatic Stelate Cells
ALD	: Alcoholic Liver Disease
ALT	: Alanin Aminotransferase
ARFI	: Acoustic Radiation Force Impulse
AST	: Aspartate Aminotransferase
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
CCl_3	: Triklorometil
CCl_3O_2	: Triklorometil Peroksil
CCL_4	: Carbon Tetrachloride
CTGF	: Connective Tissue Growth Factor
CYP450	: Cytochrome P450
DILI	: Drug-Induced Liver Injury
DNA	: Deoxyribose-Nucleic Acid
ECM	: Extracellular Matrix
EGF	: Endothelial Growth Factor
ET-1	: Endothelin-1
FFA	: Free Fatty Acid
FAK	: Focal Adhesion Kinase
GMC-SF	: Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
H_2O_2	: Hidrogen Peroxide
HCC	: Hepatocellular Carcinoma
HCV	: Hepatitis C Virus
HSCs	: Hepatic Stellate Cells
IL	: Interleukin
LO	: Lipid Alkoksil
LOOH	: Lipid Hidroperoksidase
LPS	: Lipopolisakarida

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1
MDA : Malondialdehyde
MFB : Miofibroblas
MMP : Matrix Metalloproteinases
MRE : Magnetic Resonance Elastography
NAFLD : Nonalcoholic Fatty Liver Disease
NASH : Nonalcoholic Steatohepatitis
NF-κB : Nuclear Factor-KappaB
NGF : Nerve Growth Factor
NK : Natural killer
PBC : Primary Biliary Cholangitis
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PGE2 : Prostaglandin E2
PPARγ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma
PUFA : Poly Unsaturated Fatty Acid
qHSC : Quiscent Hepatic Stelate Cells
RE : Retikulum Endoplasma
ROS : Reactive Oxygen Species
SWE : Imaging and Shear Wave Elastography
TβRI : TGFβ Serinethreonine Kinase Receptors Types I
TGF-β : Transforming Growth Factor-β
TIMP : Tissue Inhibitor of Metallo-Proteinases
TLR : Toll-Like Receptor
TNF-α : Tumor Necroting Factor-α
TRAIL : TNF-related Apoptosis Inducing Ligand
TRegs : Regulatory T cells
UAE : Ultrasonic-Assisted Extraction
UDCA : Ursodeoxycholic Acid
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

ABSTRAK

Aathifah. 2020. PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK METANOL DAUN KOSAMBI *(Schleichera Oleosa)* TERHADAP KADAR *TRANSFORMING GROWTH FACTORS* (TGF)-β1 PADA TIKUS WISTAR MODEL FIBROSIS HEPAR. Skripsi. Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing: (1) drg. Anik Listiyana, M.Biomed (II) dr. Amalia Tri Utami, M.Biomed

---

Kata Kunci: Fibrosis Hepar, Daun Kosambi, *Schleichera oleosa*, CCl_4, TGF-β1

Fibrosis hepar adalah proses pembentukan jaringan parut secara dinamis ditandai dengan akumulasi *extracellular matrix* (ECM) akibat peradangan hati kronis. Ketika hati cedera, sel Kupffer yang teraktivasi melepaskan berbagai macam sitokin inflamasi dan profibrogenik, salah satunya adalah *transforming growth factors* (TGF-β1), yang kemudian akan mengaktifkan sel stelata, sehingga berubah menjadi miofibroblas yang akan memicu penumpukan ECM. Salah satu pengobatan herbal yang berpotensi dalam pengobatan fibrosis hepar adalah daun kosambi (*Schleichera oleosa*) yang mengandung bioaktif bersifat antiinflamasi dan antioksidan yaitu flavonoid, tanin, fenolik, alkaloid, saponin, quercetin, dan sesquiterpene. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian ekstrak metanol daun kosambi *(Schleichera oleosa)* dalam menghambat progresifitas fibrosis hepar. Penelitian ini terdiri dari kelompok kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1 (200 mg/kgBB), perlakuan 2 (400 mg/kgBB) dan perlakuan 3 (600 mg/kgBB). Induksi fibrosis menggunakan CCl_4 secara intraperitoneal dengan dosis 0,085 ml perekor tikus setiap tiga hari. Induksi CCl_4 dan pemberian terapi ekstrak daun kosambi dilakukan selama 42 hari. Pengukuran kadar TGF-β1 dilakukan dengan *flow cytometry* pada hari ke-42. Dari penelitian ini dapat diketahui bahwa induksi CCl_4 pada kelompok kontrol positif tidak dapat meningkatkan kadar TGF-β1 hepar secara signifikan dibandingkan kontrol negatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun kosambi (*Schleichera oleosa*) memberikan pengaruh pada penurunan kadar TGF-β1 pada tikus model fibrosis hepar. Dosis ekstrak daun kosambi yang dapat menurunkan kadar TGF-β1 hepar adalah 600 mg/kgBB.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

ABSTRACT

Aathifah. 2020. EFFECT OF METHANOL EXTRACT OF KOSAMBI LEAVES (*Schleichera Oleosa*) ON THE CONCENTRATION OF TRANSFORMING GROWTH FACTORS (TGF)-β1 IN LIVER FIBROSIS WISTAR RAT MODEL. Thesis. Medical Department, Medical and Health Sciences Faculty, The Islamic State University Maulana Malik Ibrahim of Malang. Advisor: (1) drg. Anik Listiyana, M.Biomed (II) dr. Amalia Tri Utami, M.Biomed

---

Keywords: Liver fibrosis, Kosambi leaves, *Schleichera oleosa*, CCl_4, TGF-β1

Liver fibrosis is a dynamic process of scarring that is characterized by the accumulation of extracellular matrix (ECM) due to chronic liver inflammation. When the liver is injured, kupffer cells will be activated and released inflammatory cytokines, such as transforming growth factors (TGF-β1). These cytokines will activate hepatic stellate cells (HSCs) and transdifferentiate into myofibroblasts that will trigger ECM buildup. One of the potential herbal medicine in liver fibrosis treatment is kosambi leaves (*Schleichera oleosa*) which contains anti-inflammatory and antioxidant properties, such as flavonoids, tanins, phenolics, alkaloids, saponins, quercetin, and sesquiterpene. The purpose of this study is to determine the effect of methanol extract of kosambi leaves (*Schleichera oleosa*) in inhibiting the progression of liver fibrosis. This study consisted of negative control, positive control, treatment 1 (200 mg/kgBW), treatment 2 (400 mg/kgBW) and treatment 3 (600 mg/kgBW) group. Fibrosis induction using CCl_4 was done intraperitoneally at a dose of 0.085 ml per rat every three days. CCl_4 induction and administration of kosambi leaves extract carried out for 42 days. Measurement of TGF-β1 concentration was carried out with flow cytometry on day 42. The study showed that CCl_4 induction in the positive control group cannot increase the concentration of TGF-β1 in liver significantly compared to the negative control. The results showed that the methanol extract of kosambi leaves (*Schleichera oleosa*) had an effect on reducing TGF-β1 concentration in rats with liver fibrosis models. Dose of kosambi leaves extract that can reduce TGF-β1 concentration in the liver is 600 mg/kgBW.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas di dunia adalah fibrosis hepar yang diakibatkan oleh penyakit hepar kronis (Altamirano-Barrera et al., 2017). Fibrosis hepar menyebabkan lebih dari 1 juta kematian per tahun di seluruh dunia (Koyama and Brenner, 2017). Berdasarkan data rumah sakit umum pemerintah di Indonesia, rata-rata prevalensi penderita sirosis hepatis adalah 3,5% dari seluruh pasien yang dirawat di bangsal penyakit dalam (Lovena et al., 2017). Data terbaru Kemenkes RI (2016) melaporkan bahwa 50% penderita penyakit hepatitis B dan C kronis memiliki potensi menjadi fibrosis hepar. Sebanyak 10% kasus fibrosis hepar memiliki potensi berkembang menjadi kanker hati.

Fibrosis hepar adalah proses inflamasi dan fibrogenik kompleks yang diakibatkan oleh penyakit hepar kronis yang ditandai akumulasi berlebih protein matriks ekstraseluler (*extracellular matrix*, ECM) yang kaya akan kolagen I dan III secara terus-menerus, sehingga dapat menimbulkan remodelling arsitektur hepar yang progresif (Zhang et al., 2016; Weiskirchen et al., 2018). Apabila tidak ditangani, fibrosis hepar dapat berkembang menjadi sirosis, hipertensi portal, ensefalopati hepatik, gagal hati, karsinoma hepatoseluler, hingga kematian (Zhang et al., 2016).

Penyebab utama fibrosis hepar adalah infeksi hepatitis virus kronik, penyakit hati alkoholik (*alcoholic liver disease*, ALD), steohepatitis nonalkoholik (*nonalcoholic steatohepatitis*, NASH), perlemakan hati non alkoholik (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD), kelainan genetik, penyakit autoimun,

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

gangguan metabolik, kolestasis, dan infeksi parasit (Weiskirchen et al., 2018). Infeksi virus hepatitis B dan C merupakan penyebab paling umum (Altamirano-Barrera et al., 2017).

Inflamasi hepar berkepanjangan yang diakibatkan oleh penyakit hepar kronis seperti hepatitis B dan C menyebabkan terjadinya kerusakan hepatosit yang diikuti dengan lepasnya sitokin dari matriks ekstrasel dan kebocoran enzim lisosom. Debris sel mati, sitokin, serta endotoksin lipopolisakarida (LPS) dalam darah akan mengaktivasi sel kupffer di sinusoid hati dan memicu kemotaksis sel-sel inflamasi seperti monosit dan limfosit. Sel kupffer dan sel inflamasi akan melepaskan berbagai faktor pertumbuhan dan sitokin sehingga menyebabkan sel stelata berubah menjadi miofibroblas, perubahan monosit menjadi makrofag aktif, dan proliferasi fibroblas (Silbernagl & Lang, 2014).

Sel stelata (*Hepatic stellate cells*, HSC) atau sel *Ito* merupakan sumber utama dalam aktivasi miofibroblas dan fibroblas portal yang mendorong proses fibrogenesis hati. Sel ini terletak di ruang perisinusoid antara hepatosit dan sel endotel sinusoid, dan normalnya berfungsi menyimpan vitamin A (Zhang et al., 2016). Ketika hati mengalami cedera, hepatosit yang rusak maupun sel kupffer yang telah teraktivasi akan melepaskan ROS, *lipid peroxides*, dan menghasilkan *apoptosic bodies* yang semuanya merupakan sinyal aktivasi HSC yang poten. (Hasegawa et al., 2015). Sel kupffer yang merupakan makrofag residen di hati juga akan melepas berbagai macam sitokin inflamasi seperti *tumor necrosis factor* α (TNF-α), interleukin (IL)-1, serta *platelet-derived growth factor* (PDGF) dan *transforming growth factor* (TGF-β1) yang merupakan sitokin profibrogenik (Weiskirchen and Tacke, 2016). TGF-β, ROS, TNF, dan IL-1 akan mengaktifkan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

sel stelata, sehingga terjadi transdiferensiasi sel stelata menjadi miofibroblas (Kumar et. al., 2015).

Miofibroblas, hasil transdiferensiasi sel stelata, akan meningkatkan ekspresi *α-smooth-muscle actin* dan menghasilkan sejumlah besar komponen ECM seperti kolagen, juga mensintesis berbagai sitokin dan kemokin. Selain miofibroblas, proliferasi fibroblas portal dan sel epitel saluran empedu akan meningkatkan pembentukan matriks ekstrasel yang mengakibatkan penimbunan kolagen (tipe I, III, IV), proteoglikan, dan glikoprotein di *ruang Disse* yang berkontribusi dalam fibrogenesis hati (Silbernagl & Lang, 2014; Weiskirchen and Tacke, 2016). Pembentukan protein matriks ekstraseluler dalam jumlah berlebih oleh miofibrolas salah satunya dapat terjadi akibat induksi pensinyalan TGF-β1 (Xu et al., 2016).

Transforming growth factor (TGF)-β1 merupakan anggota dalam superfamili TGF-β yang ditemukan pada tahun 1983 karena kemampuannya untuk merangsang pertumbuhan jaringan fibroblast tikus yang dikultur pada agar lunak, sehingga dianggap sebagai sitokin utama dalam fibrogenesis (Drabsch & ten Dijke, 2012). TGF-β1 merupakan sitokin profibrogenik yang diaktifkan oleh makrofag yang menginduksi apoptosis hepatosit dan transdifferensiasi sel stelata (HSC) menjadi miofibroblas, yang mengarah pada proses fibrogenesis hati (Altamirano-Barrera et al., 2017). Pensinyalan TGF-β1 menghambat apoptosis HSC, dan menginduksi HSC untuk mensintesis protein matriks dalam jumlah berlebih, seperti fibronektin, dan kolagen tipe I, III, dan IV (Xu et al., 2016). TGF-β1 mengganggu degradasi ECM dengan menekan *matrix metalloproteinase* (MMP) dan meningkatkan *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMP). Dengan demikian, TGF-β1 meningkatkan produksi ECM dan menghambat degradasinya. Pada pasien dengan fibrosis hepar,

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

peningkatan konsentrasi TGF-β1 berkorelasi dengan tingkat keparahan fibrosis hati (Xu et al., 2016). Berdasarkan hal tersebut telah banyak dikembangkan terapi yang menargetkan jalur pensinyalan TGF-β untuk menghambat progresi penyakit hati maupun fibrogenesis (Fabregat et al., 2016).

Intervensi terapeutik pada fibrosis hepar dapat digolongkan dalam empat mekanisme yaitu: mengeliminasi stimulus ataupun penyebab yang membahayakan; supresi inflamasi hepar; menghalangi aktivasi sel stelata; dan meningkatkan degradasi matriks ekstraseluler (Altamirano-Barrera et al., 2017). Strategi yang dinilai paling efektif pada kebanyakan etiologi penyakit hepar kronis adalah dengan mengeliminasi agen penyebab, namun hal ini tidak selalu dapat dilakukan. Berdasarkan strategi penekanan pada inflamasi, pemberian antiinflamasi diusulkan sebagai pilihan terapi. Kortikosteroid diindikasikan pada pasien dengan hepatitis autoimun dan hepatitis alkoholik akut, namun penggunaan jangka panjang memiliki efek ketergantungan dan toksik (Civan, 2013). Strategi penekanan aktivitas sel stelata dan peningkatan degradasi matriks ekstraseluler dinilai belum terlalu efektif dalam pengobatan fibrosis hepar. Pada pasien sirosis beserta komplikasinya, satu-satunya terapi yang dapat dilakukan adalah transplantasi hati. Namun pasca transplantasi pada pasien dengan sirosis akibat hepatitis C, infeksi virus hepatitis C dapat rekuren kembali (Bataller & Brenner, 2005). Oleh karena itu, perlu adanya pengembangan terapi pencegahan fibrosis hepar yang efektif, salah satunya dengan pemanfaatan ekstrak herbal yang mengandung senyawa bioaktif yang mampu menghambat progresi fibrosis hepar.

Pengobatan herbal telah diterima luas di hampir seluruh negara di dunia, perhatian dunia terhadap pengobatan tradisional mengalami peningkatan dalam 20

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

tahun terakhir ini. *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa sekitar 65% dari penduduk negara maju menggunakan pengobatan tradisional dan obat-obat dari bahan alami (Kemenkes RI, 2007). Obat herbal tradisional relatif murah dan mudah dalam penggunaannya, yakni direbus, ditumbuk, diminum air perasannya, serta dimakan langsung (Dalimartha, 2001). Pengobatan tradisional yang berasal dari tumbuhan memiliki keunggulan, yaitu mengandung beragam senyawa penyusun yang memiliki aktivitas biologis yang luas dan memiliki risiko efek samping yang lebih rendah dibandingkan obat kimiawi (Mills, 1996). Sebagaimana telah dijelaskan dalam alquran bahwa tumbuhan diciptakan dengan beragam manfaat khususnya dalam pengobatan.

Berikut firman Allah SWT dalam alquran surat Asy Syuara ayat 7-8:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ (٧)
إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَةً ۖ وَمَا كَانَ أَكْثَرُهُمْ مُؤْمِنِينَ (ٱلشُّعَرَاء: ٨)

"Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik? Sungguh, pada yang demikian itu terdapat tanda (kebesaran Allah), tetapi kebanyakan mereka tidak beriman" (QS. Asy Syuara: 7-8).

Allah SWT telah menciptakan bermacam-macam tumbuhan di bumi yang memiliki beragam manfaat untuk manusia, salah satunya adalah digunakan sebagai obat. Penciptaan tumbuhan ini dimaksudkan agar manusia senantiasa ingat akan penciptanya melalui tanda-tanda keagungan dan kekuasaan Allah SWT. Manusia dituntut untuk berpikir agar dapat menemukan obat-obat yang dapat menyembuhkan penyakit-penyakit yang ada di bumi ini, sebab sesungguhnya Allah menciptakan suatu penyakit beserta dengan obatnya. Salah satu spesies tumbuhan di Indonesia yang memiliki potensi sebagai obat namun masih jarang diteliti adalah kosambi *(Schleichera oleosa).*

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Kosambi *(Schleichera oleosa)* merupakan tanaman dari famili *Sapindaceae* yang tersebar di Asia seperti India, Nepal, Malaysia, dan Indonesia. Di Indonesia, tanaman ini banyak ditemukan di Jawa, khususnya Cilegon dan Jember (Situmeang et al., 2016). Tumbuhan ini banyak dimanfaatkan untuk mengobati berbagai penyakit. Daun kosambi bermanfaat sebagai obat koreng, eksem, penyakit kudis, radang telinga dan gatal-gatal (Suita, 2012). Ekstrak minyak biji kosambi digunakan untuk penyakit kulit, gatal, jerawat, luka bakar, rematik, dan menumbuhkan rambut. Kulit kayunya digunakan sebagai astringent, antipiretik, serta pengobatan malaria, disentri, dan ulserasi. Selain itu, seluruh bagian tumbuhan digunakan sebagai antidiabetes (Tiwari & Pandey, 2016; Goswami & Singh, 2018). Daun kosambi *(Schleichera oleosa)* berpotensi sebagai obat karena memiliki beragam kandungan metabolit sekunder yaitu flavonoid, alkaloid, *quercetin*, tanin, fenolik, saponin, dan *sesquiterpene (*Situmeang et al., 2016). Metabolit inilah yang memiliki aktivitas farmakologis seperti antioksidan, analgesik, antiinflamasi, antivirus, antimikroba, antispasmodik, dan antikanker (Tiwari & Pandey, 2016).

Senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid, dan *quercetin* pada kosambi menunjukkan aktivitas antioksidan yang poten dengan bertindak sebagai donor hidrogen terhadap radikal bebas sehingga dapat menurunkan konsentrasi radikal bebas. Selain itu, senyawa tanin dapat mencegah kerusakan jaringan dengan kemampuan pembersihan radikal melalui interaksi dengan radikal bebas dan memutus rantai reaksi sebelum terjadi kerusakan molekul (Bhatia et al., 2013). Efek antioksidan yang menargetkan ROS ini menyebabkan aktivasi sel stelata dapat dihalangi sehingga deposit matriks ekstraseluler menurun dan pembentukan fibrosis hepar dapat dicegah (Weiskirchen, 2018). Selain itu, efek antioksidan bebas

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

dari *sesquiterpene* mampu mencegah sel dari apoptosis yang terinduksi oleh oksidan bebas melalui penghambatan aktivitas enzim degradasi DNA (Goswami & Singh, 2017). Saponin juga memiliki efek antioksidan dengan membentuk hidrogen peroksida yang dapat menurunkan oksidan bebas dan mencegah kerusakan sel, sehingga tidak terjadi aktivasi sel kupffer maupun pensinyalan sitokin profibrogenik, sehingga fibrogenesis hepar dapat dicegah (Faradisa, 2008).

Daun kosambi, selain memiliki aktivitas antioksidan, juga memiliki potensi efek antiinflamasi yang sebanding dengan obat standar. Mekanisme kerjanya terkait dengan penghambatan sintesis prostaglandin seperti pada sebagian besar *Non-Steroid Antiinflamatory Drugs* (NSAID) (Santha et al., 2017). Tanin pada daun kosambi diduga mampu menimbulkan aktivitas antiinflamasi dengan pembersihan radikal bebas seperti *nitric oxide* (NO), yang diproduksi oleh nitrit oksida sintase yang merupakan *second messenger* selama proses inflamasi (Goswami & Singh, 2017). Selain itu, senyawa quercetin dalam kosambi dapat meningkatkan ekspresi VEGF sehingga dapat menginduksi diferensiasi sel endotel pada jaringan yang mengalami injuri yang menyebabkan pengembalian HSC yang teraktivasi menjadi quiescence (inaktif) (Hasegawa et al., 2015).

Berdasarkan uraian di atas, peneliti melakukan penelitian untuk menguji pengaruh ekstrak daun kosambi *(Schleichera oleosa)* terhadap kadar *transforming growth factor* (TGF)-β1 pada tikus wistar jantan model fibrosis hepar yang diinduksi dengan injeksi CCL_4. *Carbon tetrachloride* (CCl_4) merupakan hepatotoksin yang menargetkan hati dan ginjal yang telah banyak digunakan untuk menginduksi jejas hepar pada tikus. Pemberian CCl_4 menyebabkan hepatotoksisitas karena adanya metabolit reaktif yaitu radikal bebas triklorometil (CCl_3) yang

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

dihasilkan oleh enzim sitokrom P-450, terutama CYP2E1, yang diekspresikan dalam hepatosit perivenular (Fortea et al., 2018).

Penelitian terhadap potensi kosambi dalam bidang kesehatan masih tergolong sedikit dan masih sedikit pula masyarakat yang mengetahui manfaat terapetiknya. Khususnya di Indonesia, belum ada yang melakukan penelitian terkait manfaat ekstrak daun kosambi *(Schleichera oleosa)* sebagai terapi pencegahan terhadap fibrosis hepar. Belum adanya terapi fibrosis hepar yang efektif hingga saat ini, menyebabkannya menjadi salah satu penyakit yang menarik dan layak untuk diteliti. Oleh karena itu, peneliti merasa perlu adanya penelitian manfaat kosambi sebagai pencegahan fibrosis hepar melalui mekanisme penurunan TGF-β1.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian ekstrak metanol daun kosambi *(Schleichera oleosa)* mampu menurunkan kadar *transforming growth factors* (TGF)-β1 pada tikus wistar model fibrosis hepar?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak metanol daun kosambi *(Schleichera oleosa)* dalam menghambat progresifitas fibrosis hepar.

1.3.2 Tujuan Khusus

Mengamati pengaruh pemberian ekstrak metanol daun kosambi *(Schleichera oleosa)* terhadap penurunan kadar *transforming growth factors* (TGF)-β1 pada tikus wistar model fibrosis hepar.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

1) Digunakan sebagai dasar pengembangan penelitian model fibrosis hepar
2) Dapat digunakan sebagai dasar penelitian lanjutan tentang efektifitas ekstrak metanol daun kosambi *(Schleichera oleosa)*

1.4.2 Manfaat Aplikatif

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai informasi kepada masyarakat dalam memilih alternatif baru untuk terapi pencegahan fibrosis hepar.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

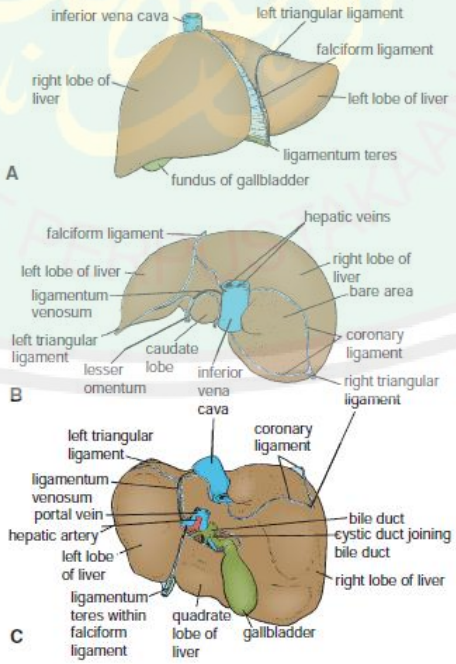
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Hepar

2.1.1. Anatomi Hepar

Hepar adalah kelenjar atau organ metabolik terbesar di tubuh yang memiliki berat sekitar 1,5 kg atau sekitar 2% dari berat badan manusia rata-rata. Organ ini secara anatomis berperan sebagai pabrik transformasi metabolisme dan biokimia. Hati menerima zat-zat dalam darah dari vena portal dan darah yang kaya oksigen dari arteri hepatik. Kemudian, hati memanfaatkan zat-zat dari kedua sumber darah untuk mensintesis bahan kimia baru, yang kemudian dikembalikan ke aliran darah melalui vena hepatik atau untuk empedu untuk diekskresikan oleh sistem empedu (Muriel, 2017). Hepar berwarna coklat kemerahan, menempati sebagian besar regio hipokondrium, dan terletak di bagian atas rongga abdomen tepat di bawah diafragma (Waugh & Grant, 2011).



Gambar 2.1 Hati tampak depan (A), atas (B), dan belakang (C)
Sumber: (Snell, 2013)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Batas hati pada bagian anterior adalah diaphragma, arcus costalis dextra dan sinistra, pleura dextra dan sinistra, serta margo inferior pulmo dextra dan sinistra, prosesus xiphoideus, dan dinding anterior abdomen pada angulus subcostalis. Sedangkan pada posterior hati berbatasan dengan diafragma, ren dextra, flexura coli dextra, duodenum, vesika biliaris, vena cavainferior, esofagus dan fundus gastrikus (Snell, 2012)

Hati memiliki dua lobus utama yaitu lobus dextra dan lobus sinistra yang berukuran lebih kecil. Lobus dextra terbagi dua menjadi lobus quadratus dan lobus caudatus oleh adanya vesica biliaris, vena cava inferior, fissura untuk ligamentum teres hepatis, dan fissura untuk ligamentum teres venosum. Hilus hepatis atau porta hepatis terdapat pada permukaan posteroinferior dan terletak di antara lobus caudatus dan lobus quadratus (Snell, 2012). Porta hepatis merupakan jalur masuk dan keluar arteri dan vena hepatik, saraf, serta ductus. Arteri dan vena hepatik melewati duktus hepatis, kemudian ke omentum bawah bagian lateral (Betts, 2013).

Hati terbungkus oleh kapsul jaringan ikat fibroelastik. Hepar tersusun oleh lobulus-lobulus hepatis, yang masing-masing dilewati vena sentralis yang bermuara ke vena hepaticae. Antara lobulus-lobulus terdapat ruangan yaitu kanalis hepatis, yang berisi cabang-cabang arteri hepatika, vena porta, dan satu cabang dari duktus koledokus (triad hepatis). Arteri dan vena mengalir di antara sel hepatosit melalui sinusoid menuju vena sentralis (Snell, 2012).

Vaskularisasi hepar berasal dari arteri hepatika propria, cabang arteri coeliac (trunkus coeliacus), vena hepatica, dan vena porta yang muncul dari permukaan posterior hepatis dan berakhir pada vena cava inferior. Aliran darah ke hepar sebanyak 30% berasal dari arteri hepatika propria yang membawa darah kaya

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

oksigen ke hepar, dan 70% dari vena porta yang membawa darah yang banyak mengandung hasil metabolisme pencernaan. Darah arteri dan vena mengalir melalui sinusoid hepar menuju vena sentralis masing-masing lobulus hepatis. Vena sentralis mengalirkan darah ke vena hepatika dextra dan sinistra, dan vena-vena ini meninggalkan permukaan posterior hepar dan bermuara langsung ke dalam vena cava inferior (Snell, 2012).

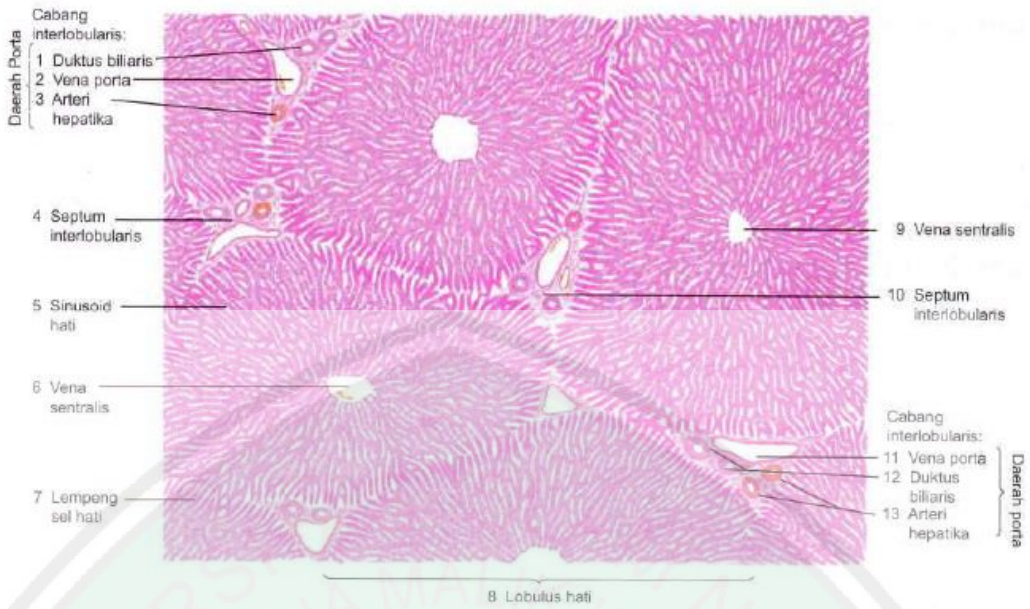
Hepar menghasilkan sekitar sepertiga sampai setengah dari jumlah seluruh cairan limfe tubuh. Pembuluh limfe keluar dari hepar lalu masuk ke beberapa kelenjar limfe yang terdapat di porta hepatis. Pembuluh eferen berjalan ke nodi cocliaci. Beberapa pembuluh limfe melewati area nodi hepatis melalui diafragma ke nodi limfoid mediastinalis posterior (Snell, 2012).

Sistem persarafan hepar terdiri atas saraf simpatik dan parasimpatik yang membentuk plexus coeliacus. Trunkus vagalis anterior bercabang menjadi banyak ramus hepatikus yang langsung menuju hepar (Snell, 2012).

2.1.2. Histologi Hepar

Hepar terdiri atas lobulus-lobulus hepatikus yang berupa unit-unit heksagonal. Di bagian tengah tiap lobulus terdapat sebuah vena sentralis, yang dikelilingi secara radial oleh lempeng sel hati (*lamina hepatocytica*), yaitu hepatosit, dan sinusoid ke arah perifer. Di bagian ini terdapat jaringan ikat yang membentuk kanalis atau area porta (*spatium portale*) yang merupakan tempat cabang arteri hepatika, vena porta hepatis, duktus biliaris, dan pembuluh limfe (Eroschenko, 2010).

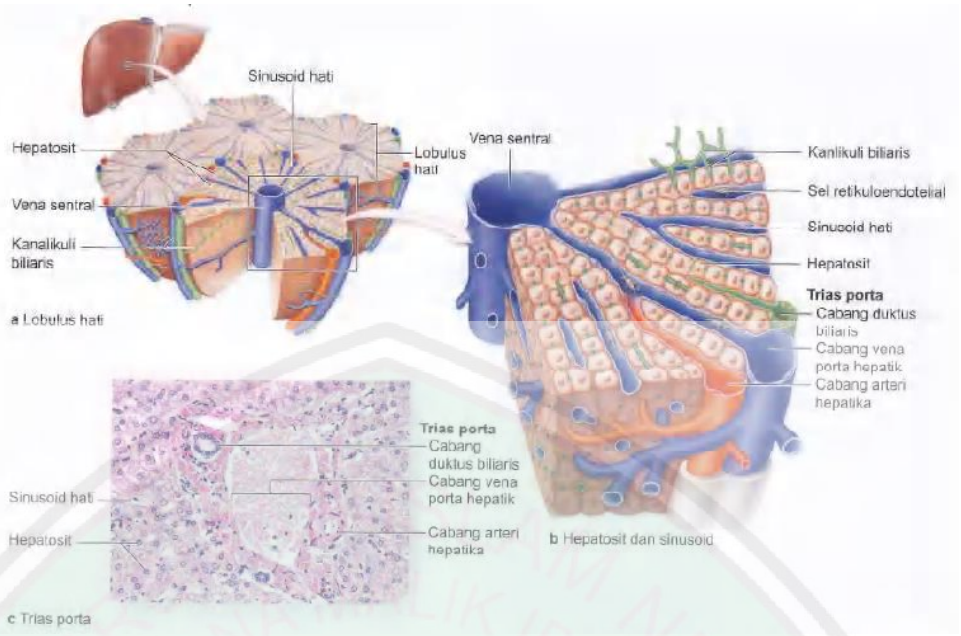
CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



Gambar 2.2 Lobulus hati primata potongan transversal
Sumber: (Eroschenko, 2010)

Hepatosit membentuk lempeng yang saling berhubungan menyerupai susunan batu bata yang mengelilingi vena sentral secara radial. Dari perifer lobulus ke pusatnya, hepatosit beranastomosis secara bebas membentuk struklur menyerupai spons. Terdapat komponen mikrovaskular penting pada celah antara lempeng ini, yaitu sinusoid hati yang merupakan saluran darah yang lebar, berliku-liku, dan dilapisi oleh lapisan tidak utuh sel endotel berfenestra (*endotheliocytus fenestratum*). Sel-sel endotel terpisah dari hepatosit di bawahnya oleh suatu lamina basal tipis yang tidak kontinu dan suatu celah perisinusoid atau celah *Disse* yang sangat sempit sehingga zat makanan yang mengalir dalam sinusoid memiliki akses langsung melalui dinding endotel yang tidak utuh dengan hepatosit. Ketika terjadi pertukaran antara sel tersebut dan plasma, mikrovili hepatosit akan menonjol ke dalam celah tersebut. Pertukaran ini penting secara fisiologis karena banyaknya makromolekul (misalnya lipoprotein, albumin, fibrinogen) yang disekresi ke dalam darah oleh hepatosit dan terjadinya katabolisme sejumlah besar molekul tersebut (Mescher, 2012, Eroschenko, 2010).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



Gambar 2.3 Lobulus hati (a), hepatosit dan sinusoid (b), dan trias porta (c)
Sumber: (Mescher, 2012)

Selain sel endotel, sinusoid hati juga mengandung 2 sel penting yaitu: 1) Sel kupffer (*macrophagocytus stellatus*) atau sel retikuloendotelial, ditemukan antara sel endotel sinusoid dan permukaan luminal di dalam sinusoid, terutama dekat area portalnya. Seli ini berfungsi menghancurkan eritrosit tua, menggunakan ulang heme, menghancurkan bakteri atau debris yang memasuki darah portal dari usus, dan bekerja mempresentasikan antigen pada imunitas adaptif. 2) Sel penimbun lemak stelata (atau sel ito) pada celah perisinusoid berupa droplet lipid kecil yang menyimpan banyak vitamin A. Sel ini menghasilkan komponen matriks ekstraseluler serta berperan dalam regulasi imunitas (Mescher, 2012).

Hepatosit berbentuk sel polihedral besar, dengan enam atau lebih permukaan, dan berdiameter 20−30 μm. Pada sediaan HE, sitoplasma hepatosit bersifat eosinofilik karena banyaknya mitokondria, sekitar 2000 per sel. Hepatosit berinti sferis besar dengan satu atau dua nukleolus. Sebagian intinya polipoid, yaitu mengandung dua, empat, delapan atau melebihi jumlah kromosom diploid normal. Permukaan setiap hepatosit berkontak dengan dinding sinusoid melalui celah Disse,

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

dan dengan permukaan hepatosit lain. Di tempat dua hepatosit berkontak, terbentuk suatu celah tubular yaitu kanalikulus biliaris. Kanalikuli merupakan bagian pertama sistem duktus biliaris yang berupa celah panjang berdiameter 1−2 μm. Kanalikuli dibatasi membran plasma dari dua hepatosit, yang menjulurkan sedikit mikrovili di bagian dalamnya. Membran sel di dekat kanalikuli ini diikat dengan kuat oleh taut erat. Taut celah juga terdapat di antara hepatosit, yang memungkinkan tempat komunikasi antar sel dan koordinasi aktivitas sel−sel (Mescher, 2012).

Hepatosit memiliki banyak retikulum endoplasma kasar untuk mensintesis protein plasma sehingga sifat basofilia sitoplasma tampak lebih jelas di hepatosit dekat area portal. Sedangkan RE halus berperan dalam proses oksidasi, metilasi, dan konjugasi untuk menginaktifkan atau mendetoksifikasi berbagai zat sebelum diekskresi. RE halus merupakan suatu sistem yang akan segera bereaksi terhadap molekul yang diterima hepatosit (Mescher, 2012).

2.1.3. Fisiologi Hepar

Hepar memiliki tiga fungsi dasar hepar yaitu: 1) metabolisme karbohidrat, lipid dan protein; 2) membentuk dan mensekresikan empedu ke dalam saluran intestinal; 3) menyaring darah, menyingkirkan bakteri dan benda asing yang masuk ke dalam darah (Snell, 2012).

Hepar befungsi dalam pembentukan zat empedu yang kemudian diekskresikan melalui feses, seperti bilirubin. Bilirubin dibentuk dari pemecahan eritrosit atau hemoglobin yang rapuh atau mati. Normalnya, hemoglobin berusia 120 hari yang kemudian akan menjadi rapuh dan akan difagositosis oleh makrofag. Bilirubin akan dipecah menjadi heme dan globin. Cincin heme kemudian akan dipecah untuk melepas besi kedalam darah lalu sisa pemecahan ini akan didegradasi

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

menjadi bilirubin bebas (bilirubin tidak terkonjugasi) yang akan berikatan dengan albumin plasma. Saat bilirubin bebas masuk melalui membran sel hepar, ikatan bilirubin dan albumin akan dilepas. Selanjutnya bilirubin akan dikonjugasikan dengan asam glukuronat yang akan disebut bilirubin terkonjugasi. Bilirubin terkonjugasi dikeluarkan melalui transport aktif menuju kanalikulus biliaris yang kemudian menuju usus halus. Dalam usus halus, bilirubin terkonjugasi akan terpapar dengan normal flora dan akan diubah menjadi urobilinogen yang mudah larut. Sekitar 5% akan diekskresikan melalui ginjal menjadi urin dan sisanya diekskresikan menjadi feses (Guyton & Hall, 2014).

Fungsi hati dalam metabolisme karbohidrat adalah menyimpan glikogen dalam jumlah besar, mengkonversi galaktosa dan fruktosa menjadi glukosa, glukoneogenesis, dan membentuk banyak senyawa kimia dari hasil antara metabolisme karbohidrat (Guyton & Hall, 2014). Monosakarida dari usus halus diubah menjadi glikogen dan disimpan dalam hati dalam bentuk glikogen, yang akan dimobilisasi jika kadar glukosa darah dibawah normal. Dari depot glikogen ini, glukosa dilepaskan ke dalam darah (glikogenolisis) secara konstan untuk memenuhi kebutuhan gula darah tubuh. Sebagian glukosa dimetabolisme dalam jaringan untuk menghasilkan panas dan energi, sisanya diubah menjadi glikogen dan disimpan dalam jaringan subkutan. Hati juga mensintesis glukosa dari protein dan lemak (glukoneogenesis) (Price & Wilson, 2012).

Fungsi hati dalam metabolisme lemak yaitu mengoksidasi asam lemak untuk menyuplai energi tubuh, membentuk sebagian besar kolesterol, fosfolipid dan lipoprotein, serta membentuk lemak dari protein dan karbohidrat (Guyton & Hall, 2014). Hampir semua lemak yang dicerna diserap ke dalam sirkulasi limfe sebagai

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

kilomikron yang merupakan gabungan dari trigliserida, fosfolipid, kolesterol, dan lipoprotein. Kilomikron yang dibawa dalam pembuluh limfe lalu menyatu dengan sirkulasi sitemik. Trigliserida kemudian diubah kembali menjadi asam lemak dan gliserol oleh enzim kapiler hati. Dari kapiler, asam lemak dapat berdifusi masuk ke sebagian besar sel (Corwin, 2010). Kira-kira 80% kolesterol yang disintesis di hati diubah menjadi garam empedu, yang kemudian disekresikan kembali ke dalam empedu (Guyton & Hall, 2014).

Fungsi hati dalam metabolisme protein adalah dalam degradasi asam amino melalui proses deaminasi (mengubah gugus amino, NH_2) sehingga dapat digunakan sebagai energi atau diubah menjadi karbohidrat dan lemak. Ammonia (NH_3), yang merupakan substansi beracun, yang dihasilkan saat deaminase dan oleh bakteri-bakteri dalam usus, diubah menjadi urea dan dikeluarkan melalui urin. Hati juga mensintesis protein plasma seperti albumin yang penting dalam mempertahankan tekanan osmotik koloid, protrombin, fibrinogen, dan faktor pembekuan lain. Selain itu juga, berfungsi dalam interkonversi beragam asam amino dan membentuk senyawa lain dari asam amino. Fungsi hati yang lain diantaranya hati merupakan tempat penyimpanan vitamin dan besi dalam bentuk feritin, membentuk zat-zat yang digunakan untuk koagulasi darah dalam jumlah banyak dan mengekskresikan obat-obatan, hormon dan zat lain (Guyton & Hall, 2014; Price & Wilson, 2012).

Hepar mempunyai fungsi detoksifikasi yang penting sehingga dapat melindungi tubuh dari berbagai racun dan benda asing, seperti makanan dan obat-obatan, yang masuk ke dalam tubuh. Detoksifikasi terjadi melalui dua mekanisme yaitu apoptosis oleh sel kupffer dan reaksi biokimia. Pada reaksi biokimia, enzim sitokrom P450 yang terekspresi di hepatosit menginaktivasi xenobiotik dan toksin

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

lain melalui oksidasi, hidroksilasi (fase I) dan esterifikasi (fase II). Lalu hasil metabolisme tersebut disekresikan ke kantung empedu untuk dieliminasi melalui traktus gastrointestinal atau dibawa oleh darah ke ginjal untuk diekskresi. Kemampuan detoksifikasi ini terbatas, tidak semua bahan dapat dieliminasi secara sempurna, tetapi diakumulasi dalam darah dan bisa menyebabkan kerusakan hepatosit (Price & Wilson, 2012; Mescher, 2012; Barret, 2013).

2.2. Fibrosis Hepar

2.2.1. Definisi

Fibrosis hepar adalah proses pembentukan jaringan parut secara dinamis yang ditandai dengan akumulasi matriks ekstraseluler (*extracellular matrix*, ECM) akibat peradangan hati kronis, misalnya infeksi virus kronis, penyakit hati alkoholik (ALD) dan *non-alcoholic steohepatitis* (NASH) (Cox-North & Shuhart, 2018). Ciri patologis fibrosis hepar adalah peningkatan ekspresi kolagen (terutama tipe fibrilforming I, III, dan IV), fibronektin, proteoglikan, glikoprotein struktural, dan hyaluronan. Fibrosis hepar terjadi karena ketidakseimbangan sintesis dan degradasi matriks ekstraseluler (ECM) oleh matriks metalloproteinase (MMP). MMP bersama dengan penghambatnya, *tissue inhibitor of metallo-proteinases* (TIMPs), memainkan peran penting dalam fibrogenesis dan fibrolisis (Roeb, 2018).

Fibrosis hepar dapat bersifat reversibel setelah menghilangkan penyebab cedera, namun jika tidak ditangani lebih lanjut dapat menyebabkan sirosis, yang ditandai dengan distorsi arsitektur hepatik yang berhubungan dengan abnormalitas aliran darah dan dapat berakhir pada hipertensi portal. Penyakit hati dekompensasi merupakan penyebab utama kematian di seluruh dunia dan dikaitkan dengan peningkatan risiko hepatoselularkarsinoma (HCC) (Tsuchida & Friedman, 2017).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Meskipun laju perkembangan bervariasi, fibrosis hati dapat berlanjut ke sirosis dalam kurun waktu <10 tahun pada beberapa pasien. Setelah sirosis terjadi, rata-rata angka harapan hidup 1 tahun pada penyakit dekompensasi adalah <50% (Hasegawa et al., 2015).

2.2.2. Epidemiologi

Survei Centers for Disease Control and Prevention pada tahun 2016 menemukan bahwa terdapat 4,9 juta orang di dunia dengan penyakit hati. Fibrosis hati merupakan masalah kesehatan global yang menyebabkan lebih dari 1 juta kematian per tahun di seluruh dunia dan penyebab kematian nomor 12 di AS, dengan tingkat mortalitas sekitar 32.000 kasus per tahun di AS (Koyama and Brenner, 2017; Poynard, *et al*., 2010). Kurniawati (2006) melaporkan bahwa di Indonesia 50% pasien yang menjalani perawatan di ruang penyakit dalam RSU Dr. Soetomo merupakan penderita sirosis hepar.

Penyebab paling umum dari perkembangan fibrosis hati adalah hepatitis B kronis (30% dari seluruh kasus fibrosis hati), hepatitis C kronis (28%), penyakit hati alkoholik (27%) dan lainnya (14%) (Muriel, 2017). Data terbaru Kemenkes RI (2016) melaporkan bahwa sekitar 18 juta orang di Indonesia memiliki Hepatitis B dan 3 juta orang memiliki Hepatitis C. Diperkirakan 50% dari penderita penyakit hati ini berpotensi menjadi kronis maupun fibrosis hati. Sebanyak 10% kasus fibrosis hepar memiliki potensi berkembang menjadi kanker hati (Kemenkes RI, 2016).

2.2.3. Etiologi

Penyebab utama fibrosis hepar adalah infeksi hepatitis virus kronik, penyakit hati alkoholik (*alcoholic liver disease*, ALD), steohepatitis nonalkoholik

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

(*nonalcoholic steatohepatitis*, NASH), perlemakan hati non alkoholik (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD), *drug-induced liver injury* (DILI), kelainan genetik, penyakit autoimun, gangguan metabolik, kolestasis, dan infeksi parasit (schistosomiasis dan echinococcosis) (Weiskirchen et al., 2018).

Infeksi virus seperti yang disebabkan oleh virus hepatitis B (HBV) dan virus hepatitis C (HCV) menginduksi inflamasi hati sehingga berkontribusi pada siklus inflamasi, nekrosis, dan regenerasi. Infiltrasi sel imun yang terus-menerus dan sitokin inflamasi yang disekresikan menyebabkan cedera hati, sehingga memicu rekonstruksi lobulus hepatik secara progresif yang menyebabkan fibrosis hati dan sirosis (Zhang et al., 2016).

Pada penyakit hati alkoholik, respon fibrogenik dipicu oleh asetaldehida, yang merupakan metabolit selama proses detoksifikasi etanol di hati. Asetaldehida dapat mengatur transkripsi kolagen I secara langsung dan tidak langsung dengan memicu sintesis *transforming growth factor*-β1 (TGF-β1). Selain itu, asupan alkohol secara berkepanjangan dapat memicu pembentukan *reactive oxygen species* (ROS), meningkatkan multiplikasi bakteri usus, dan mengubah permeabilitas usus terhadap makromolekul, sehingga meningkatkan endotoksin usus dalam sirkulasi portal dan mengaktifkan sel-sel kupffer melalui jalur *Toll-like receptor*, yang kemudian dapat menginduksi fibrogenesis di jaringan hepar (Weiskirchen et al., 2018).

Drug-induced liver injury (DILI) adalah salah satu penyebab utama gagal hati akut di dunia Barat. Kebanyakan obat melalui pemrosesan di hati sehingga dapat berpotensi membahayakan hati. Obat penyebab DILI tersering adalah parasetamol (acetaminophen) dan antimikroba (Weiskirchen et al., 2018).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) biasanya terjadi pada orang yang memiliki obesitas, diabetes atau pradiabetes, dan/atau kadar lemak (lipid) dan kolesterol dalam darah yang tinggi (Civan, 2018). Adanya resistensi insulin dan deposisi lemak hati disertai steatosis, lipotoksisitas, stress retikulum endoplasma, dan cedera parenkim dapat memicu inflamasi hati, aktivasi HSC, dan progresi fibrogenesis (Weiskirchen et al., 2018).

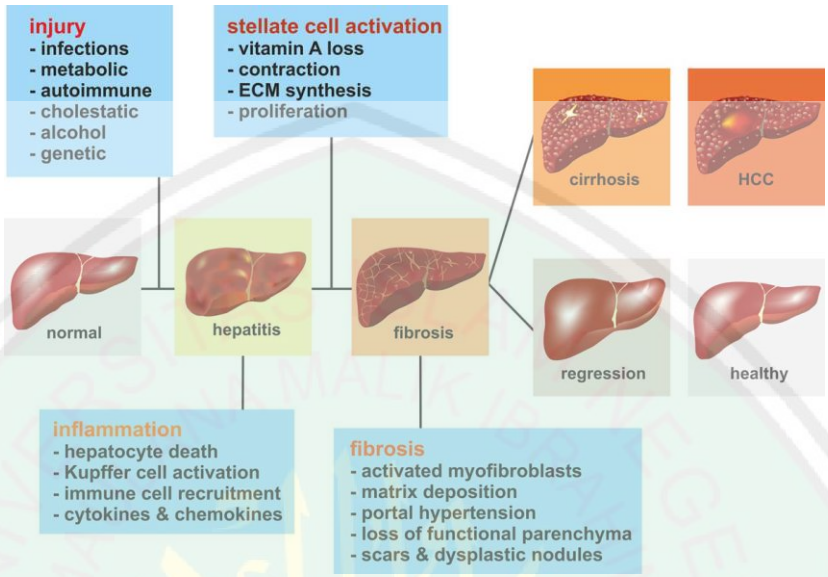
Steatohepatitis nonalkoholik (NASH) terjadi ketika stres oksidatif berkelanjutan menghambat proliferasi sel-sel hati matur, menghasilkan nekrosis berlebih dan pertumbuhan berlebih dari sel-sel progenitor hati (sel oval). Selain itu, respons inflamasi terhadap nekrosis seluler menginduksi pelepasan PDGF, TGF-β, TNF-α, dan-IL-1. Sinyal-sinyal inflamasi ini menghasilkan aktivasi dan proliferasi HSC dan menginduksi diferensiasi HSC menjadi miofibroblast, yang selanjutnya mendorong sintesis ECM dan akhirnya terjadi fibrosis hati (Weiskirchen et al., 2018).

2.2.4. Patogenesis

Peradangan hati kronis akibat berbagai macam etiologi, seperti hepatitis B dan C, penyalahgunaan alkohol, *nonalcoholic steatohepatitis* (NASH), dan lainnya, menyebabkan terjadinya cedera pada hepatosit yang diikuti dengan kebocoran enzim lisosom dan pelepasan sitokin dari matriks ekstrasel. Anatomi hati terhubung dengan usus oleh vena portal dan saluran empedu sehingga memungkinkan endotoksin dengan aktivitas imunomodulator seperti lipopolisakarida (LPS) dapat menembus ke dalam hati dan mengaktifkan sel-sel responsif saat terjadi cedera hati. Sel kupffer dianggap sebagai sel responden pertama dan paling efisien terhadap perubahan integritas jaringan atau sinyal bahaya peradangan. Sitokin, endotoksin

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

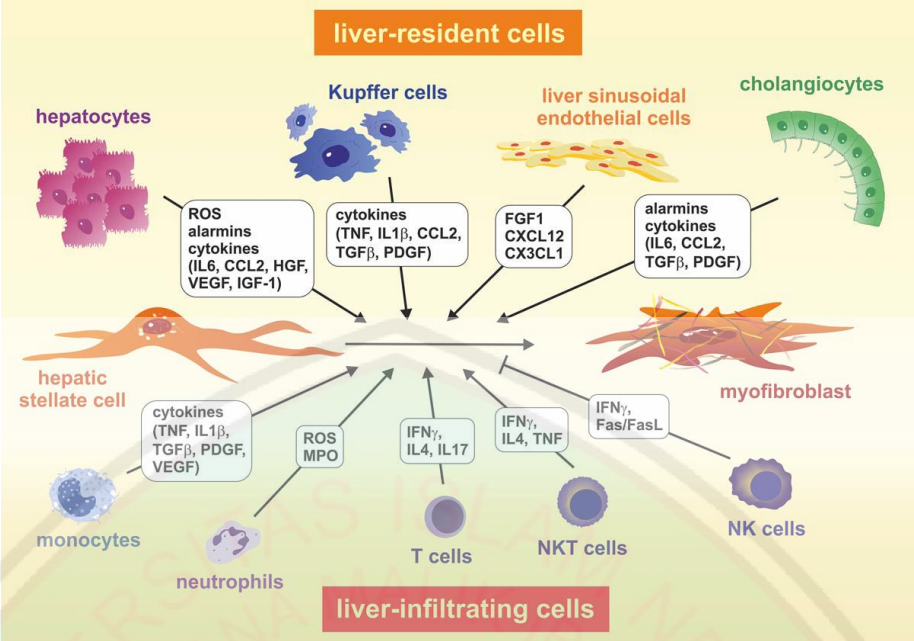
lipopolisakarida, dan debris sel mati akan mengaktivasi sel kupffer di sinusoid hati dan menyebabkan kemotaksis sel-sel inflamasi seperti limfosit dan monosit (Silbernagl & Lang, 2014; Weiskirchen and Tacke, 2016).



Gambar 2.4 Urutan Patogenik dari Perkembangan Penyakit Hati Kronis.
Sumber: (Weiskirchen and Tacke, 2016)

Pemicu eksogen memulai serangkaian proses dalam sel kupffer yang dikenali oleh *toll-like reseptor* (TLR). Setelah mengalami aktivasi, sel kupffer maupun sel inflamasi lain akan melepas berbagai macam sitokin inflamasi seperti TNF-α, interleukin (IL)-1α/β, IL-6, IL-12, IL-18, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GMC-SF) dan lainnya. Demikian pula, pemicu endogen yang dilepaskan dari sel yang mengalami nekrosis ataupun apoptosis juga memfasilitasi peradangan. Pada saat yang sama, sitokin profibrogenik seperti *transforming growth factor* (TGF-β1), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *endothelial growth factor* dan lainnya dilepaskan oleh sel parenkim dan non-parenkim hati (Weiskirchen and Tacke, 2016).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



Gambar 2.5 Aktivasi Sel Stelata Menjadi Miofibroblas.
Sumber: (Weiskirchen and Tacke, 2016)

Sitokin dan faktor-faktor tersebut menyebabkan perubahan sel stelata (*hepatic stellate cells*, HSC) menjadi miofibroblas, mengubah monosit menjadi makrofag aktif, dan memicu proliferasi fibroblas (Silbernagl & Lang, 2014). HSC mengalami perubahan fenotip secara bertahap dari jenis sel yang tidak berproliferasi (menyimpan retinoid), menjadi fenotip yang berproliferasi (kehilangan lemak dan retinoid). Fenotip seluler yang dihasilkan dari transdiferensiasi ini adalah miofibroblas (MFB) yang semakin mengekspresikan *α-smooth-muscle actin* dan menghasilkan sejumlah besar komponen ECM seperti kolagen, juga mensintesis berbagai sitokin dan kemokin (Weiskirchen and Tacke, 2016). Selain miofibroblas, proliferasi fibroblas portal dan sel epitel saluran empedu juga meningkatkan pembentukan matriks ekstrasel sehingga terjadi penimbunan kolagen (tipe I, III, IV), proteoglikan, dan glikopreotein di *ruang Disse* yang berkontribusi dalam fibrogenesis hati (Silbernagl & Lang, 2014).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Dalam jaringan hati yang sehat, ECM mengalami pergantian secara terkontrol karena adanya keseimbangan antara MMP (mendegradasi ECM) dan TIMP (menghambat MMP). Setelah kerusakan kronis pada jaringan hati, keseimbangan ini terganggu akibat HSC yang teraktivasi menyebabkan peningkatan ekspresi TIMP sehingga terjadi penghambatan aktivitas MMP. Dengan demikian, degradasi matriks terhambat dan terjadilah akumulasi protein matriks ekstraseluler (Roeb, 2018).

Aktivasi HSC pada fibrosis hati terbagi menjadi tiga fase, yaitu:

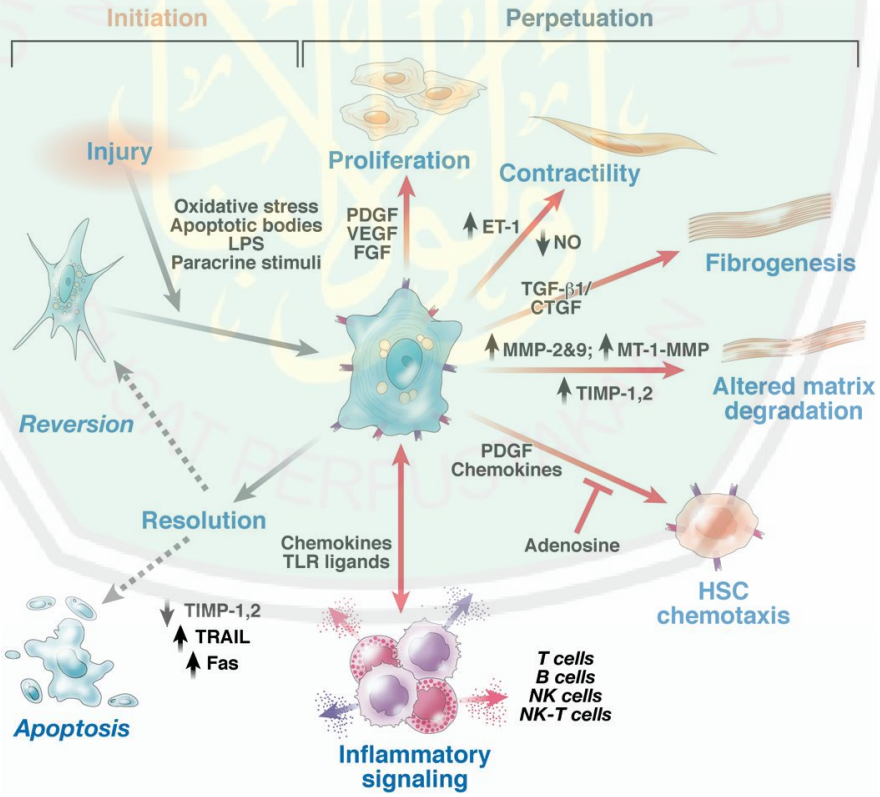
1) Fase Inisiasi

Inisiasi adalah serangkaian perubahan genetik dan fenotipik yang membuat HSC lebih responsif terhadap berbagai rangsangan seluler (Hasegawa et al., 2015). Pada fase ini, HSC yang teraktivasi berubah menjadi miofibroblas yang bersifat fibrogenik, proliferatif, dan kontraktil yang disebabkan stimulasi parakrin dari sel-hepatosit yang rusak, sel inflamasi, dan sel-sel duktus biliaris yang menginduksi perubahan gen HSC sehingga lebih responsif terhadap berbagai sitokin dan stimulasi lokal lainnya (Bemion, 2001).

Ketika hati mengalami cedera, sel-sel tetangga yang rusak seperti hepatosit serta sel kupffer, leukosit, trombosit, dan sel endotel sinusoid yang menginfiltrasi lokasi cedera hati akan mengirimkan sinyal parakrin ke HSC. Hepatosit yang rusak maupun sel kupffer melepaskan ROS, *lipid peroxides*, dan menghasilkan *apoptotic bodies* sebagai respons terhadap cedera hati, yang semuanya merupakan sinyal aktivasi HSC yang poten. Sebagai contoh, etanol dimetabolisme melalui sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) dan peroksida lipid dalam penyakit perlemakan hati nonalkoholik (NAFLD), yang mana keduanya dapat merangsang HSC (Hasegawa

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

et al., 2015). Selain itu, stimulasi parakrin mendorong pelepasan sitokin pro-inflamasi seperti IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, dan IL-13 yang terutama di hasilkan oleh limfosit TH_2, INF, dan TNF oleh sel kupffer (Bemion, 2001). Sitokin-sitokin tersebut beserta ROS dapat meningkatkan sintesis kolagen oleh HSC. Ini dapat dilemahkan oleh antioksidan, inhibitor CYP2E1, dan hidrogen peroksidase. Fas dan *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) yang dimediasi oleh apoptosis hepatosit dan *apoptosic bodies* menghasilkan rangsangan profibrogenik. Lebih jauh, ROS dapat menginduksi stress retikulum endoplasma pada HSC, yang kemudian menginduksi autofagi dan berkontribusi pada aktivasi HSC dengan menyediakan sumber bahan bakar dalam bentuk asam lemak bebas (FFA) (Hasegawa et al., 2015).



Gambar 2.6 *Pathway* Aktivasi HSC
Sumber: (Friedman, 2008)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Sel-sel endotel sinusoid, berdasarkan kedekatannya dengan HSC dan suplai darah hati, juga berperan penting dalam tahap awal inisiasi HSC. *Fenestrated endothelial cells* (sel-sel endotelial "terdiferensiasi") sangat penting untuk mempertahankan fenotip qHSC (quiscent HSC) sehingga dapat mencegah aktivasi HSC spontan. Efek ini kemungkinan dimediasi melalui *vascular endothelial growth factor* (VEGF) yang dimediasi oleh produksi NO. Hal ini dibuktikan dengan sebuah model genetik penghapusan VEGF yang menyebabkan sel endotel kehilangan fenestrasinya. Pada model hewan, modulasi farmakologis yang mengembalikan fenotip sel endotel yang terdiferensiasi mendorong pengembalian HSC teraktivasi menjadi quiscence. Sel-sel endotel adalah sumber fibronektin seluler yang dapat mendorong migrasi awal HSC ke lokasi cedera, dan mengubah bentuk laten TGFβ, yang mana keduanya medorong aktivasi seluler (Hasegawa et al., 2015).

2) Fase *perpetuation* (pengkekalan)

Perpetuation adalah proses berkelanjutan, yang terjadi apabila respon seluler pada fase inisiasi dipertahankan, pensinyalan parakrin yang sedang berlangsung dari sel tetangga dan ECM sekitarnya, ditambah sinyal autokrin yang dihasilkan dari dalam HSC, mengekalkan dan memperkuat fenotip sel yang diaktifkan. *Perpetuation* merupakan meliputi retinoid loss, fibrogenesis, pergantian matriks, kemotaksis, proliferasi, peningkatan kontraktilitas, dan imunoregulasi (Hasegawa et al., 2015).

a. Kehilangan retinoid

Antara 50% dan 80% retinoid (senyawa vitamin A) disimpan dalam droplet sitoplasma karakteristik dari HSC sebagai ester retinil, yang mana

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

tetesan ini juga mengandung FFA, kolesterol, dan trigliserida. Saat teraktivasi, HSC akan kehilangan droplet ini (Hasegawa et al., 2015).

b. Fibrogenesis

Sekresi dan deposisi komponen ECM yang terus-menerus, khususnya kolagen tipe I, adalah karakteristik yang menentukan aktivasi HSC dan pengembangan fibrosis hati. TGFβ merupakan sitokin fibrogenik paling poten yang berperan kunci dalam penyembuhan luka. TGF-β mewakili hubungan penting antara sel-sel imun dan sel-sel fibrogenik di seluruh organ. Mayoritas TGF-β diproduksi oleh sel-sel imun, termasuk makrofag hati dan secara langsung mendorong fibrogenesis dalam miofibroblas. HSC juga menghasilkan TGF-β, tetapi pada tingkat yang lebih rendah. TGF-β yang disekresi dalam bentuk laten membutuhkan aktivasi untuk menjadi fibrogenik, yang dapat dimediasi oleh MMP, pH, trombospondin-1, ROS atau integrin αv. Setelah diaktifkan, sinyal TGFβ melalui protein Smad intraseluler kemudian menginduksi transkripsi kolagen tipe I dan III. TGF-β juga menekan aktivitas sel NK, sehingga mencegah apoptosis HSC yang diinduksi sel NK. Ini menunjukkan bahwa kontribusi TGF-β dalam fibrosis terjadi juga dalam sel-sel inflamasi yang berasal dari sumsum tulang. Aktivitas TGFβ dapat dihambat oleh *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPARγ) yang berinteraksi dengan JunD dan menghambat Smad3 (Hasegawa et al., 2015; Seki & Schwabe, 2015).

c. Pergantian matriks

Fibrosis hati ditandai oleh perubahan keseimbangan antara deposisi dan degradasi ECM. Hasil patologis utama adalah penggantian membran

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

basement normal, yang terdiri terutama dari kolagen tipe IV dengan kolagen tipe I yang terjadi karena perubahan dalam jumlah dan aktivitas MMP dan inhibitornya, TIMP, yang mengikat dan menonaktifkan MMP (Hasegawa et al., 2015).

d. Kemotaksis

Kemotaksis HSC yang teraktivasi menyebabkan akumulasi ECM di lokasi cedera yang seringkali melampaui ruang *Disse*. PDGFβ adalah kemoatraktan HSC prototipikal. Tonjolan HSC memanjang, yang mengandung komponen sitoskeletal, merespons PDGFβ melalui serangkaian peristiwa morfologis termasuk penyebaran sel di ujung yang paling dekat dengan PDGFβ, pergerakan tubuh sel menuju PDGFβ, dan retraksi dari *trailing protrusion*. HSC bermigrasi ke beberapa kelas molekul dan kondisi lingkungan lokal termasuk kemoatraktan, ROS, hypoxia, komponen ECM, dan reseptor asam hyaluronic. Selain PDGFβ, kemoatraktan HSC utama termasuk VEGF, EGF, dan *monocyte chemoattractant protein*-1 (MCP-1). ROS yang dihasilkan oleh hepatosit yang rusak, sel-sel inflamasi, atau dihasilkan oleh NADPH-oksidase dalam HSC dapat menyebabkan kemotaksis yang dimediasi oleh JNK1/2, walau tanpa adanya kemoatraktan (Hasegawa et al., 2015).

e. Proliferasi

Ciri khas fibrosis hati adalah perubahan kualitatif dan kuantitatif pada HSC. HSC berproliferasi sebagai respon terhadap sejumlah molekul termasuk PDGFβ, yang dianggap mitogen HSC paling poten, TNFα, trombin, EGF, dan VEGF (Hasegawa et al., 2015).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

f. Kontraktilitas

Gangguan arsitektur normal hati, terutama melalui remodeling sinusoid hepatik dan perkembangan septa fibrosa penuh dengan HSC kontraktil, merupakan penentu utama hipertensi portal, yang dapat menyebabkan kaskade komplikasi klinis lebih lanjut. Induksi utama kontraksi dan relaksasi HSC adalah *endothelin*-1 (ET-1) dan NO, meskipun beberapa mediator lain terlibat, termasuk eikosanoid, karbon monoksida, adenosin, peptida natriuretik atrium, dan angiotensin II. ET-1 merupakan reseptor yang ditemukan terutama pada sel otot polos, HSC dan sel endotel, bertindak secara parakrin dan autokrin dalam hati. ET-1 dirilis dari HSC sebagai respons terhadap cedera hati dan mengarah ke konstriksi sinusoid dan pengurangan alirannya. NO menginduksi relaksasi HSC, yang mana pada cedera hati, sel endotel sinusoidal menghasilkan lebih sedikit NO, yang berkontribusi terhadap fenotip kontraktil. Modulasi kontraktilitas HSC adalah konsep pengobatan yang berkembang untuk hipertensi portal (Hasegawa et al., 2015).

g. Imunoregulasi

Pada cedera hati yang berkelanjutan, HSC menarik sel-sel imun ke lokasi cedera, mendorong maturasinya, dan selanjutnya merespon sinyal yang dihasilkan oleh sel infiltrasi (Hasegawa et al., 2015).

3) Fase regresi

Regresi hanya akan terjadi dengan penghentian stimulus yang merugikan dan melibatkan apoptosis maupun penuaan dari HSC, atau perubahan ke fenotip yang inaktif (fenotip restoratif) (Hasegawa et al., 2015).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

a. Apoptosis

Kontribusi apoptosis miofibroblas terhadap resolusi fibrosis telah dibuktikan pada hewan coba. Dalam model kolestasis dan cedera hati toksik (misalnya akibat CCl_4), di mana perlakuan dihentikan setelah perkembangan fibrosis, dalam 6 minggu terjadi resolusi cedera dan fibrosis yang ditandai dengan apoptosis miofibroblas. Namun, HSC manusia relatif resisten terhadap apoptosis dibandingkan dengan tikus karena peningkatan ekspresi *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2). Mekanisme pengaturan apoptosis tidak sepenuhnya jelas tetapi ada beberapa mediator dan populasi sel yang terlibat:

(i) NF-κB melindungi HSC dari apoptosis pada tikus yang diberi CCl_4;

(ii) *Nerve growth factor* (NGF), yang disekresikan oleh hepatosit dan dapat meningkatkan apoptosis melalui penghambatan *nuclear factor-kappaB* (NF-κB);

(iii) *Natural killer* (NK), yang menginduksi apoptosis HSC teraktivasi ketika mereka mengekspresikan NKG2D / RAE1;

(iv) Anggota famili *protein heat-shock* Hsp70, yang melindungi dari apoptosis yang diinduksi stres dan dengan penghapusan genetiknya menghasilkan pemulihan cepat dari fibrosis dan hilangnya aHSC; dan

(v) Stress retikulum endoplamik (Hasegawa et al., 2015).

b. *Senescence* (penuaan)

Penuaan sel ditandai dengan penahanan siklus sel yang stabil; selain berkurangnya proliferasi, HSC tua membatasi produksi protein profibrogenik, mendegradasi protein yang ada dan pembersihan aHSC.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Dengan cara ini, HSC tua bertindak sebagai rem pada perkembangan fibrosis dan merupakan pengatur homeostatis penting dari respons penyembuhan luka hepatik. Diketahui, IL-22 mendorong penuaan HSC, melindungi terhadap fibrosis hati, dan mencegah HSC mengalami apoptosis (Hasegawa et al., 2015).

c. Pengembalian ke fenotip yang tidak aktif

Beberapa studi telah menunjukkan bahwa setelah penghentian cedera hati, HSC teraktivasi dapat kembali ke fenotip "inaktif" yang berbeda dari *quiescent* HSC (qHSC). HSC ini mampu lepas dari apoptosis, menurunkan pengaturan program transkripsi fibrotik dan memperoleh fenotip yang mirip dengan qHSC, dengan perbedaan penting bahwa sel lebih mudah diaktifkan kembali ketika terkena cedera berulang. Satu bulan setelah penghentian cedera hati, sekitar 40-50% HSC hati mungkin memiliki fenotip teraktivasi ini, dengan sisanya terdiri dari sisa qHSC atau sel yang baru dikembangkan dari populasi prekursor. Seperti halnya penuaan, mediator yang memungkinkan lolos dari apoptosis dan pengembalian ke keadaan tidak aktif tidak diketahui (Hasegawa et al., 2015).

2.2.5. Manifestasi Klinis

Fibrosis hati sendiri biasanya tidak menimbulkan gejala. Gejala dapat terjadi akibat kelainan yang menyebabkan fibrosis, seperti infeksi hepatitis B dan C, konsumsi alkohol berlebih dan obesitas. Namun, fibrosis hati dapat menyebabkan penurunan fungsi hati keseluruhan, termasuk dalam mendetoksifikasi darah, menyimpan energi, maupun membersihkan infeksi. Fibrosis juga serta membatasi

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

aliran darah di dalam organ dan kemampuan organ untuk beregenerasi (Liver Foundation, 2017).

Gejala juga biasanya dirasakan ketika fibrosis berkembang menjadi sirosis dan kemudian dapat menyebabkan komplikasi (seperti hipertensi portal). Gejala-gejala paling umum terjadi pada sirosis dini meliputi nafsu makan menurun, merasa lemah, kelelahan dan penurunan berat badan yang tidak bisa dijelaskan, mual dan muntah, serta nyeri di perut kanan atas. Beberapa tanda umum sirosis yang lebih lanjut termasuk: mudah memar atau berdarah, edema, atau retensi cairan di kaki, *jaundice* (kuning pada kulit dan mata), asites, kulit gatal, peningkatan sensitivitas terhadap obat-obatan dan efek sampingnya, masalah dengan fungsi kognitif seperti memori, konsentrasi, atau tidur, serta urin menjadi gelap (NIDDK, 2018).

2.2.6. Diagnosis

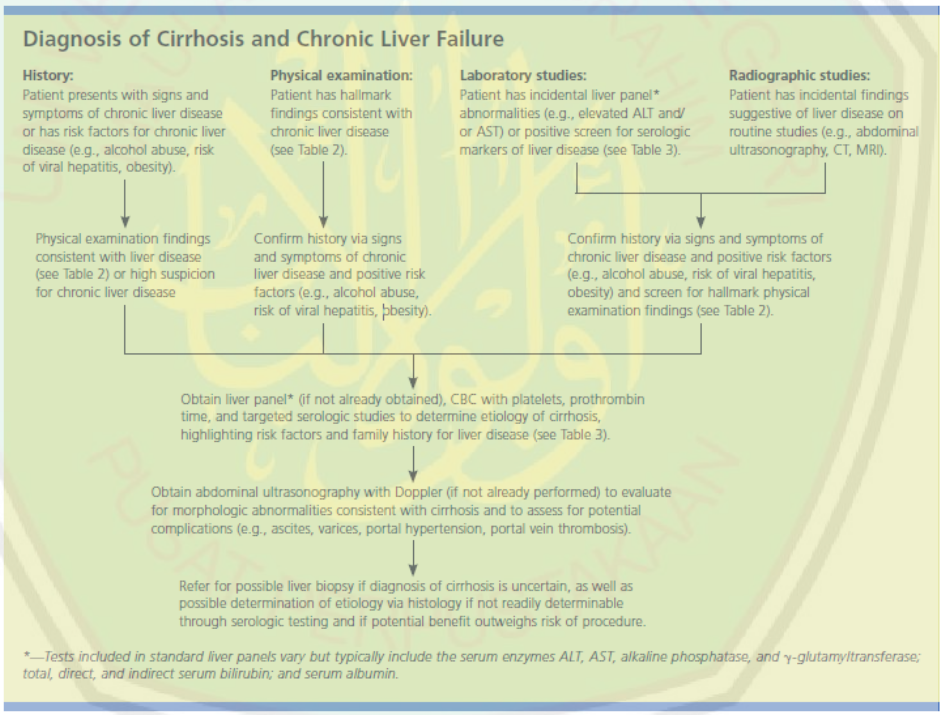
Penegakan diagnosis hepar dilakukan dengan anamnesis, pemeriksaan fisik, dan pemeriksaan penunjang seperti pemeriksaan laboratorium dan radiologis. Pada anamnesis, ditanyakan terkait adanya gejala penyakit hati kronis atau memiliki faktor risiko terhadap penyakit hati kronis seperti konsumsi alkohol berlebih, riwayat infeksi hepatitis B dan C, penggunaan obat hepatotoksik, obesitas serta sindrom metabolik (Heidelbaugh, 2006).

Banyak pasien yang tidak menunjukkan adanya abnormalitas pada pemeriksaan fisik. Fibrosis hati sering tidak dikenali kecuali pasien menunjukkan gejala dari komplikasi sirosis. Ketika pasien datang dengan penyakit hati, penting untuk mengkonfirmasi adanya sirosis, terutama ketika didapatkan peningkatan serum aminotransferases, trombositopenia, atau pencitraan hati yang abnormal. Temuan pemeriksaan fisik yang membantu diagnosis termasuk hepatomegali,

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

hepar teraba keras dan bernodul, nyeri tekan hepar, jaundice, asites, caput medusa, palmar eritema, spider angioma, dan ginekomastia (Shipley et al., 2019).

Pada pemeriksaan laboratorium, dapat dilakukan tes darah rutin untuk mengevaluasi fungsi hati seperti tes enzim hati ALT *(alanin aminotransferase)* dan AST *(aspartate aminotransferase)*. Kombinasi beberapa tes darah dapat membedakan dua stadium fibrosis yakni tidak ada atau ringan, dan sedang atau berat. Untuk mengonfirmasi diagnosis perlu dilakukan beberapa tes, mencakup tes pencitraan, tes darah, biopsi hati, dan kadang tes pencitraan khusus untuk menentukan seberapa kaku hati (Civan, 2018).



Gambar 2.7 Algoritma Diagnosis Sirosis dan Penyakit Hati Kronis.
Sumber: (AAFP, 2006)

Tes pencitraan seperti ultrasonografi, *computed tomography* (CT), dan *magnetic resonance imaging* (MRI) tidak mendeteksi fibrosis dini atau sedang. Namun, tes ini mungkin menunjukkan kelainan yang dapat menyertai sirosis dan hipertensi portal (seperti limpa yang membesar atau varises) (Civan, 2018).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Biopsi hati telah dianggap sebagai "standar emas" untuk mendiagnosis penyakit hati kronis, menilai aktivitas nekroinflamasi, menentukan stadium fibrosis hati, dan mengidentifikasi gangguan yang menyebabkan fibrosis. Biopsi sering dilakukan ketika diagnosis tidak jelas. Pemeriksaan biopsi hati dapat dilakukan secara perkutan, transvena (baik transjugular atau transfemoral), atau pembedahan (operasi terbuka atau laparoskopi). Biopsi hati merupakan tindakan invasif dan dapat menyebabkan komplikasi seperti nyeri, perdarahan intraperitoneal, hemobilia atau hemotoraks, sinkop vasovagal hingga infeksi (Cheng and Wong, 2017). Oleh karena itu biopsi hanya dilakukan jika tes darah menunjukkan fibrosis sedang atau berat (Civan, 2018). Ada beberapa sistem skoring yang digunakan untuk menilai tingkat fibrosis hepar, salah satunya adalah sistem METAVIR.

Tabel 2.1 Sistem Skoring METAVIR untuk Menilai Progresi Fibrosis.

Skor	Definisi
A0	Tidak ada aktivitas
A1	Aktivitas ringan
A2	Aktivitas sedang
A3	Aktivitas berat

Sumber: Cox-North & Shuhart, 2018.

Tabel 2.2 Sistem Skoring METAVIR untuk Menilai Tingkat Fibrosis.

Skor	Definisi
F0	Tidak ada fibrosis
F1	Fibrosis portal tanpa septa
F2	Fibrosis portal dengan sedikit septa fibrosa
F3	Banyak septa tanpa sirosis
F4	Sirosis

Sumber: Dhingra et al., 2016.

Tes pencitraan khusus meliputi ultrasonografi elastografi, *acoustic radiation force impulse* (ARFI), *imaging and shear wave elastography* (SWE), dan *magnetic resonance elastography* (MRE). Tes ini menggunakan gelombang suara, yang diaplikasikan pada abdomen untuk menentukan seberapa kaku jaringan hati. Tes ini

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

tidak invasif dan karenanya memiliki beberapa keuntungan. Ultrasonografi elastografi dan MRE dapat digunakan pada penderita hepatitis C dan penyakit hati berlemak untuk mendiagnosis fibrosis (Civan, 2018).

Penilaian non-invasif lain menggunakan serum yang umum dalam praktek klinis termasuk AST, *platelet ratio index (*APRI), indeks Forns, Fibrosis-4 (FIB-4), Fibroindex, indeks Hui, *NAFLD fibrosis score* (NFS) dan skor BAAT. Parameter ini mudah diperoleh, namun hanya divalidasi pada satu atau dua penyakit hati. Selain itu juga ada penilaian FibroTest dan FibroMeter. FibroTest sangat dapat diandalkan dan berguna pada penyakit hati kronis yang berbeda, bahkan akurat pada pasien dengan obesitas. Ini bekerja dengan baik untuk diagnosis sirosis hati untuk entitas penyakit lainnyadari CHC. Namun, hasilnya suboptimal untuk mendeteksi tahap awal fibrosis. FibroMeter memiliki akurasi tinggi terkait klasifikasi fibrosis, serta dapat mendeteksi fibrosis berat pada banyak penyakit hati yang berbeda, namun harganya mahal (Cheng and Wong, 2017).

2.2.7. Penatalaksanaan

Intervensi terapeutik pada fibrosis hepar dapat digolongkan dalam empat mekanisme yaitu: mengeliminasi stimulus ataupun penyebab yang membahayakan; supresi inflamasi hepar; menghalangi aktivasi sel stelata; dan meningkatkan degradasi matriks ekstraseluler (Altamirano-Barrera et al., 2017).

Pendekatan utama dalam pengobatan fibrosis hati adalah dengan menghilangkan penyebab penyakit hati, misalnya menggunaan obat antivirus untuk mengeradikasi virus hepatitis kronis, menghentikan konsumsi alkohol pada penderita penyakit hati alkoholik, menggunakan obat untuk menghilangkan logam berat pada orang yang mengalami kelebihan zat besi (*hemochromatosis*) atau

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

penyakit Wilson (yang menyebabkan tembaga menumpuk), menghentikan obat yang menyebabkan fibrosis, menghilangkan atau melarutkan penyumbatan di saluran empedu, diet yang tepat untuk menurunkan berat badan dan mengendalikan kadar gula darah dan lipid pada orang dengan perlemakan hati nonalkoholik (Civan, 2018).

Belum diketahui obat yang dapat menghentikan pembentukan jaringan fibrotik hepar secara efektif dan aman. Terdapat beberapa obat antifibrotik yang sedang diteliti efeknya. *Silymarin* merupakan ekstrak herbal *Silybum marianum*, atau *milk thistle*, dan senyawa aktif utamanya adalah *silybin*, dilaporakan mampu memperlambat perkembangan fibrosis pada berbagai penyakit hati kronis dengan aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, dan antifibrotiknya melalui sitoproteksi dan penghambatan sel Küpffer hati. Obat ini aman. namun tidak berefek signifikan pada pada perbaikan histologis (Civan, 2018; Caviglia et al., 2017).

Senyawa lain yang disarankan adalah pirfenidone (PFD) yang telah terbukti berefek antifibrotik dan antiinflamasi pada model hewan uji fibrosis. Efek PFD dimediasi melalui penghambatan aktivasi NF-κ-B, termasuk penghambatan PDGF, proliferasi sel stellate hepatic (HSC), pengurangan kadar TNF-α dan IFN-α dan penurunan induksi iNOS/NO. PFD juga mengatur regulasi TGF-β1, TIMP-1, MMP-2, dan deposisi kolagen (Altamirano-Barrera et al., 2017).

Vitamin E 800 IU/hari, dengan sifat antioksidannya, digunakan untuk mengatasi steatosis dan peradangan tetapi pengaruhnya terhadap fibrosis saat ini sedang diselidiki. Senyawa antioksidan lain yang biasa digunakan dalam pengobatan tradisional adalah *anthocyanin* (dari tanaman) (Caviglia et al., 2017).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Steroid adalah obat yang paling umum dalam mengobati penyakit hati. Terapi kortikosteroid mampu memberi efek perbaikan histopatologi pada pasien dengan hepatitis autoimun dengan cara membatasi cedera jaringan, mengurangi sinyal molekuler untuk fibrosis, dan memfasilitasi degradasi matriks ekstraseluler. Selain itu, kafein, yang merupakan alkaloid purin, juga berpengaruh pada fibrosis hati, yang bekerja melalui antagonisme reseptor adenosin A1 dan A2A. Efek kafein bekerja melalui blokade adenosin, regulator peradangan endogen yang kuat dan perbaikan jaringan yang membatasi tingkat fibrosis. Kafein memiliki efek positif pada pasien steatosis hati, dengan memperbaiki resistensi insulin dan mengurangi produksi sitokin inflamasi (Altamirano-Barrera et al., 2017).

Ursodeoxycholic acid (UDCA) adalah asam empedu *dihydroxy* hidrofilik fisiologis yang telah dikenal sejak lama akan efek antifibrotiknya dan digunakan untuk pengobatan *primary biliary cholangitis* (PBC). Efek aktivitas antifibrotik UDCA melibatkan penggantian asam empedu sitotoksik endogen [asam *chenodeoxycholic* (CDCA) dan asam DCA] oleh UDCA asam empedu non-sitotoksik melalui mekanisme kompetisi transportasi ileum aktif. Perubahan ini menginduksi penghambatan radikal bebas di hati dan pengurangan produksi sitokin, khususnya TNFα dan TGFβ, termasuk penurunan apoptosis, peradangan, dan fibrogenesis (Altamirano-Barrera et al., 2017).

Penghambatan reseptor TGF-β dapat menghambat produksi matriks ekstraseluler dan mempercepat degradasinya. Studi tentang curcumin dilaporkan dapat menekan ekspresi gen yang mengkode reseptor TGF-β dalam sel stellata teraktivasi melalui aktivasi *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR)-gamma, yang mengarah pada gangguan dalam pensinyalan TGF-γ. Namun,

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

dikhawatirkan penghambatan jalur *tumor supressor* ini dapat meningkatkan risiko pengembangan neoplasma (Altamirano-Barrera et al., 2017).

Pada terapi imunomodulator, sel-sel *natural killer* (NK) dapat mengurangi fibrosis hati melalui penghambatan atau apoptosis sel-sel stelata melalui jalur asam retinoat. Destruksi sel NK menyebabkan pelepasan sitokin antifibrotik seperti IFN-α dan IFN-γ, yang menekan transkripsi gen yang terlibat dalam produksi kolagen. IFN-α antagonis terhadap jalur TGF-β / Smad3, yang menekan aktivasi gen rantai alfa 2 kolagen tipe 1 (COL1A2). Namun, pendekatan ini belum menunjukkan manfaat pada manusia (Altamirano-Barrera et al., 2017).

Intervensi terapetik yang berfokus pada peningkatan degradasi matriks melalui pemblokiran aktivitas TIMP-1 menunjukkan adanya pengurangan akumulasi kolagen secara histologis. Namun banyak studi yang belum menunjukkan keefektifannya dalam penelitian klinis (Parsons et al., 2004). Terapi lain berfokus pada penurunan aktivitas HSC dan mengubahnya menjadi bentuk inaktif (qHSC). Penghambatan sel stellate ini mungkin dapat mengembalikan efek fibrosis, namun efeknya tergantung pada pemberian agen sebab HSC dapat aktif kembali ketika pengobatan dihentikan (Troeger et al, 2012)

2.3. Karbon Tetraklorida (CCl_4)

2.3.1 Mekanisme Kerusakan Jaringan Hepar Akibat CCl_4

Carbon tetrachloride (CCl_4) merupakan hepatotoksin yang menargetkan hati dan ginjal (Hafez et al., 2017). Kerusakan organ akibat pemberian CCl_4 pada hati dapat terdeteksi dalam 24 jam pertama (WHO, 2004). Hepatotoksisitas jaringan akibat induksi CCl_4 pada pemeriksaan histopatologi tampak berupa degenerasi sel, nekrosis sel, dan penimbunan lemak (steatosis). Nekrosis hepatosit yang terjadi

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

berhubungan dengan fungsi hepar dalam detoksifikasi zat-zat toksik. Mekanisme nekrosis sel akibat CCl_4 melibatkan peroksidasi lipid yang diinduksi radikal bebas, pembentukan aldehida reaktif yaitu *malondialdehyde* (MDA), dan penurunan aktivitas enzim-enzim antioksidan (Maulina, 2018).

Karbon tetraklorida (CCl_4) umumnya digunakan untuk membuat model cedera hepar pada hewan karena dapat menginduksi radikal bebas dan memicu reaksi berantai peroksida. CCl_4 pada hepar mengalami biotransformasi oleh enzim sitokrom P450 (CYP2E1) yang akan membentuk radikal bebas triklorometil (CCl_3). CCl_3 akan mengalami oksidasi membentuk radikal triklorometil peroksil (CCl_3O_2) yang lebih reaktif (Kumar et al., 2009).

Radikal triklorometil (CCl_3) secara kovalen mengikat protein dan lipid tidak jenuh yang menginisiasi peroksidasi lipid yang dimediasi radikal bebas pada membran fosfolipid (Hafez et al., 2017). Hal ini menyebabkan permeabilitas membran rusak, yang meliputi gangguan homeostasis sel Ca, sistem antioksidan yang tidak seimbang, dan pembentukan ikatan kovalen antara radikal bebas O dan asam nukleat atau protein. Efek domino ini menyebabkan kerusakan sel. Respon inflamasi mengaktifkan neutrofil untuk menghasilkan radikal bebas O secara berlebih, sehingga memperparah stres oksidatif dan kerusakan hati. Faktor-faktor pemicu ini selanjutnya dapat mengaktifkan *Toll-like receptor*, *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), dan jalur sinyal lainnya yang memicu peningkatan permeabilitas mitokondria (Lin et al., 2019).

Selain itu radikal triklorometil dapat menginisiasi terbentuknya radikal lipid hidroperoksidase (LOOH) pada membrane fosfolipid dan radikal lipid alkoksil (LO) melalui proses fragmentasi. Radikal lipid alkoksil tersebut akan diubah

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

menjadi malondialdehid. Senyawa aldehid ini yang akan mengakibatkan kerusakan membran plasma dan peningkatan permeabilitas membran. Akibatnya, apoptosis dan nekrosis hepatosit diaktifkan sehingga dapat merangsang hepatotoksisitas, fibrosis, sirosis, bahkan kanker hati (WHO, 2004; Lin et al., 2019).

Radikal triklorometil peroksil (CCl_3O_2) dapat menyerang lipid membran RE lebih cepat dibanding CCl_3 dan memisahkan atom hidrogen dari membran lipid yang kaya *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) yang menyebabkan terjadinya reaksi rantai peroksidasi. PUFA dari retikulum endoplasma (RE) dan mitokondria lebih rentan terhadap oksidasi oleh radikal bebas. Reaksi rantai ini bersifat autokatalitik, dimana dekomposisi lemak mampu menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel dengan cepat, gangguan homeostasis kalsium, bahkan kematian sel (Panjaitan et al., 2007; Kumar et al., 2009).

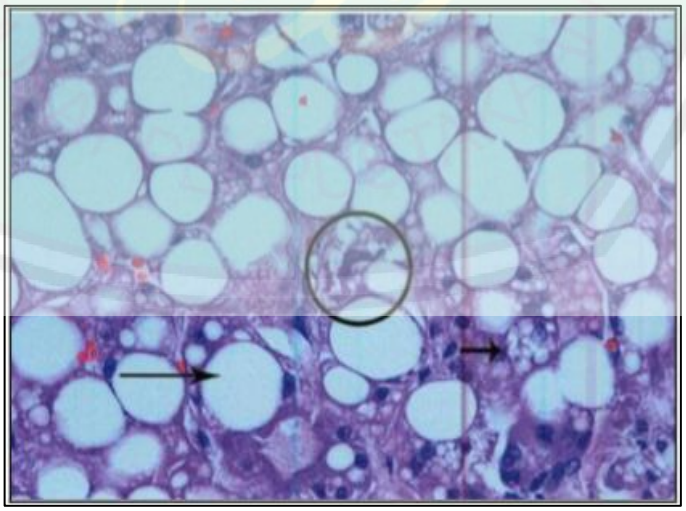
Spesies oksigen reaktif menghasilkan stres oksidatif yang memainkan peran penting dalam fibrogenesis hati. Radikal tri-kloromethil yang dihasilkan dari metabolisme CCl_4 memulai reaksi yang menyebabkan steatosis hati, fibrosis atau sirosis melalui aktivasi sitokin seperti IL-1, TNF-α, dan ekspresi TGF-β, dan penghambatan pembentukan oksida nitrat (NO). TGF-β teraktivasi merangsang ekspresi protein matriks ekstraseluler (ECM) berlebih dan menekan degradasinya dengan matriks metalloproteinases (MMP) melalui upregulasi penghambat jaringan metalloproteinases (TIMP). Pengikatan TGF-β ke reseptor TGF-β-II (TβR-II) memicu sinyal yang dimediasi oleh fosforilasi dari reseptor yang terkait dengan Smads (Smad2 dan Smad3; R-Smads), yang kemudian membentuk kompleks dengan Smad4 yang memasuki nukleus dan mengikat ke promotor TGF-β untuk mengatur ekspresinya (Hafez et al., 2017).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

2.3.2 Histopatologi Kerusakan Jaringan Hepar Akibat CCl_4

Toksisitas yang dialami jaringan akibat induksi dari CCl_4 pada pemeriksaan histopatologi tampak berupa degenerasi sel, nekrosis yang dapat merusak struktur sel, dan penimbunan lemak (steatosis). Induksi CCl_4 dengan konsentrasi yang tinggi kurang dari 30 menit akan menyebabkan sintesis protein hepar turun, sedangkan induksi rentang waktu kurang lebih 2 jam akan menyebabkan pembengkakkan RE halus dan ribosom lepas dari RE kasar (Kumar et al., 2009).

Mekanisme steatosis hepatosit dilihat dalam 3 pola, yaitu steatosis perifer, difus, dan sentral. Steatosis perifer diakibatkan karena adanya gangguan nutrisi, kemudian steatosis sentral biasanya disebabkan karena kondisi hipoksia dan terpapar zat toksik seperti CCl_4, sedangkan steatosis difus dapat terjadi karena paparan kronis dari alkohol. Induksi CCl_4 dapat menyebabkan steatosis sentral, steatosis ini dapat mencapai sepertiga hingga setengah pada setiap lobulus hepar (Fawcett, 2002). Toksisitas akut akibat CCl_4 akan menyebabkan akumulasi lipid pada hepatosit sebelum munculnya nekrosis (Moslen, 2001).



Gambar 2.8 Steatosis Hepatosit.
Panah merah = steatosis makrovesikuler, panah hitam = steatosis mikrovesikuler, lingkaran hitam= *Mallory hyaline.* Pewarnaan HE dengan pembesaran 200x
Sumber: (Kemp et al., 2008)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

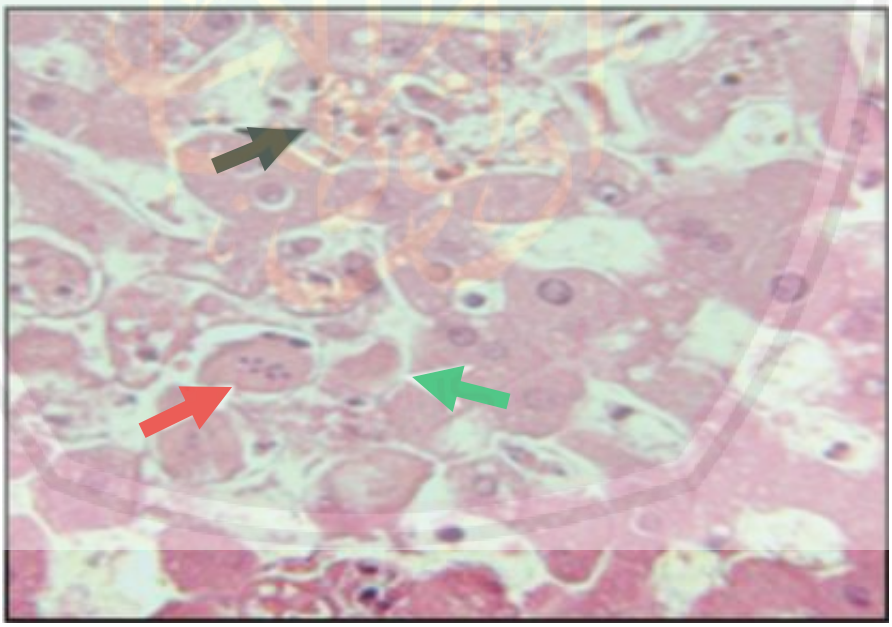
Nekrosis sel ditandai dengan adanya pembengkakan dan kebocoran sel, infiltrasi sel-sel inflamasi serta perubahan nukleus akibat penguraian DNA spesifik berupa kariolisis dan karioreksis (Kumar et al., 2009). Perubahan nukleus ini merupakan perubahan sel yang bersifat ireversibel karena adanya kerusakan pada membran plasma atau membran lisosom, hilangnya DNA atau mitokondria. Nekrosis sel akibat paparan CCl_4 ditandai dengan adanya gambaran myelin intrasitoplasma, pembengkakan dan peningkatan densitas mitokondria, hilangnya glikogen, rupturnya lisosom (Kemp et al., 2008; Kumar et al., 2009). RE halus dan sitoplasma mengalami vakuolisasi, disintegrasi serta terlepasnya ribosom dari RE kasar dan selanjutnya terjadi fragmentasi serta disintergrasi membran sel (Sandritter, 1989).

Khalaf et al., (2009) melaporkan bahwa pemberian CCl_4 dua kali per minggu selama 10 minggu dengan dosis 3 mg/KgBB menyebabkan terjadinya perubahan degeneratif dan kerusakan jaringan hepar, yaitu infiltrasi leukosit, nekrosis massif dan proliferasi jaringan fibrosa pada hepar. Pengamatan mikroskopik hepar oleh Sulistianto et al., (2004) pada tikus yang diinduksi CCl_4 juga menunjukkan kerusakan sel signifikan berupa kariolisis dan karioreksis sekitar 70%.

Disintegrasi membran sel terjadi akibat serangkaian proses yang melibatkan deplesi ATP yang dimodulasi oleh peningkatan kalsium di dalam sitosol (Kumar et al., 2009). Deplesi ATP tersebut akan mendorong sel untuk melakukan respirasi anaerob untuk menghasilkan ATP sehingga mengakibatkan akumulasi asam laktat. Akumulasi asam laktat akan mengakibatkan penurunan pH selluler sehingga dapat menyebabkan pelepasan ribosom dari RE kasar, menurunkan aktivitas dan meningkatkan degradasi sel (Kemp et al., 2008).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Peningkatan kalsium intraselluler yang mengakibatkan kerusakan membran sel dapat dimodulasi oleh keadaan stress oksidatif yang berat, seperti paparan CCl_4 pada hepar (Moslen, 2001). Peningkatan kalsium yang tinggi dan tidak terkontrol dalam hepatosit akan mengakibatkan aktivasi sejumlah enzim katabolik seperti protease, endonuklease, dan fosfolipase (Khalaf et al., 2009). Aktivasi enzim protease dapat menyebabkan kerusakan protein membran dan sitoskeleton yang menginduksi pelepasan membrane sel dari kerangka sel, sehingga sel rentan mengalami peregangan atau ruptur. Aktivasi fosfolipase akan menurunkan kandungan fosfolipid membran, sehingga dapat menginduksi kerusakan membran sel, sedangkan aktivasi enzim endonuklease akan menyebabkan fragmentasi DNA dan kromatin. Aktivasi ketiga enzim ini dapat menginduksi terjadinya nekrosis hepatosit (Kumar et al., 2009).



Gambar 2.9 Nekrosis Hepatosit. Panah hijau = kariolisis; panah hitam = piknosis, panah merah = karioreksis. Pewarnaan HE dengan pembesaran 400x.
Sumber: (Mclntosh et al., 2007)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

2.4. Kosambi

Kosambi *(Schleichera oleosa)* merupakan tanaman dari famili *Sapindaceae*, dikenal juga sebagai Ceylon Oak atau pohon Lac atau Kusum, yang digunakan untuk mengobati penyakit dalam sistem pengobatan tradisional Ayurveda India (Tiwari & Pandey, 2016). Tanaman ini tersebar di Asia seperti India, Nepal, Malaysia, dan Indonesia. Di Indonesia, tanaman ini banyak ditemukan di Jawa, khususnya Cilegon dan Jember (Situmeang et al., 2016).

Kosambi (*Schleichera oleosa*) memiliki beberapa nama daerah yang umum bagi adalah *kasambi* (Sunda); *kosambi, kusambi, sambi* (Jawa dan Bali); *kasambhi* (Madura); *kasembi, kahembi* (Sumba); *kehabe* (Sawu); *kabahi* (Solor); *kalabai* (Alor); *kule, ule* (Rote); *bado* (Makassar); *ading* (Bugis) (Suita, 2012).

Secara tradisional, masyarakat Bali dan Madura menggunakan kulit kosambi sebagai obat kulit seperti kudis, koreng, eksem, dan gatal, serta berkhasiat sebagai obat radang telinga (Suita, 2012). Daun menjadi organ tanaman yang paling potensial untuk melawan berbagai bakteri dan cacing (Tiwari & Pandey, 2016). Minyak yang diekstrak dari biji, yang disebut minyak Kusum atau minyak Makassar secara tradisional digunakan untuk menyembuhkan gatal-gatal, jerawat, luka bakar, penyakit kulit lain, rematik (pijatan luar), dan menumbuhkan rambut. Bubuk biji diaplikasikan pada luka dan bisul untuk menghilangkan belatung. Kulit kayunya digunakan sebagai astringen, dan mengobati peradangan kulit seperti jerawat, gatal, bisul, ulserasi dan infeksi kulit lainnya. Selain itu, tanaman ini juga dimanfaatkan sebagai analgesik, antibiotik, antipiretik, pengobatan malaria, dan disentri (Muthukrishnan, 2017).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

2.4.1. Taksonomi dan Morfologi Kosambi

Taksonomi kosambi adalah sebagai berikut (Goswami & Singh, 2018):

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Superdivision : Spermatophyta

Division : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Subclass : Rosidae

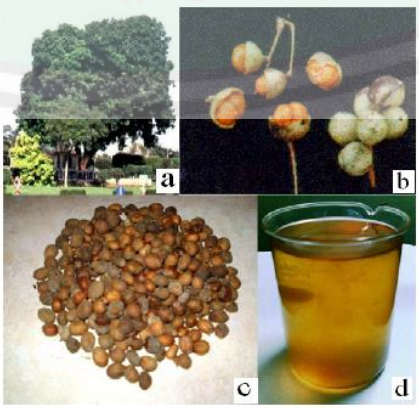
Order : Sapindales

Family : Sapindaceae

Genus : *Schelichera* Wilid.

Species : *Schelichera oleosa* (Lour.) Oken

Gambar 2.10 Daun (A) dan akar (B) kosambi
Sumber: (Tiwari & Pandey, 2016)



Gambar 2.11 Pohon (a), buah (b), biji (c) dan minyak kosambi (d)
Sumber: (Suita, 2012)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Pohon kosambi dapat tumbuh hingga setinggi 40 m dengan diameter mencapai 2 m. Batang kayu berbentuk silindris, berkerut, berbulu pendek dan tipis yang berwarna kuning kemerahan pada usia muda, hitam saat dewasa dan coklat kekuningan hingga abu-abu saat tua. Kulit kayu kosambi memiliki tekstur halus dengan warna abu-abu. Daun kosambi bersirip genap dengan bentuk lanset, berseling. Panjang daun berkisar antara 11-25 cm dengan lebar berkisar antara 2-6 cm. Tepi daun rata, berujung lancip dan memiliki tulang menyirip.Tangkai daun berbentuk bulat yang berwarna hijau. Bunga kosambi terletak pada bagian cabang yang tidak berdaun. Bunga berwarna kuning pucat hingga hijau pucat. Bunga berjumlah majemuk dengan bentuk tandan yang terletak pada ketiak daun atau pada ujung batang dengan jumlah kelopak 4-6 lembar (Suita, 2012).

2.4.2. Kandungan Ekstrak Daun Kosambi

Ekstrak daun kosambi *(Schleichera oleosa)* memiliki beragam kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu quercetin (32,2%), flavonoid (22,2%), tanin (7.33%), terpentin (6%), alkaloid (3.24%), triterpenoid (3,22%), sesquipertin (3.21%), antosianin (2.43%), resin (2,33%), glikosida (1,22%), sianidin (0,89%), terpenoid (0.86%), asam trikadenik (0,22%), polifenol (0,11%), dan asam galo-tannic (0.02%), coumarin, phytosterol, steroid, dan saponin (Situmeang et al., 2016).

2.4.3. Manfaat Ekstrak Daun Kosambi dalam Pengobatan

Beberapa penelitian telah membuktikan manfaat dan potensi ekstrak daun kosambi *(Schleichera oleosa)* dalam pengobatan. Senyawa bioaktif kosambi terbukti memiliki potensi aktivitas farmakologis seperti antioksidan, analgesik, antiinflamasi, antimikroba, antijamur, dan antikanker (Tiwari & Pandey, 2016).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

a) Efek Antioksidan

Konstituen ekstrak metanol daun kosambi seperti alkaloid, flavonoid, tanin, dan sesquiterpene dilaporkan memiliki efek antioksidan (Goswami, 2017). Berdasarkan studi oleh Thind et al. (2011), senyawa fenolik pada kosambi juga menunjukkan aktivitas antioksidan yang poten. Efek antioksidan yang dimiliki tanin pada daun kosambi mampu mencegah kerusakan jaringan dengan kemampuan *radical scavenging* dengan cara berinteraksi dengan radikal bebas dan memutus rantai reaksi sebelum terjadi kerusakan molekul (Bhatia et al., 2013). Tanin juga memproduksi ion OH- deoksiribosa dalam mengikat oksidan bebas larutan. Flavonoid pada daun kosambi memiliki efek antioksidan karena menyumbangkan hidrogen dari gugus hidroksilnya (OH-) untuk membentuk radikal flavonoid yang stabil. Selain itu, efek antioksidan bebas dari sesquiterpene yang terkandung dalam daun kosambi mampu melindungi sel dari apoptosis yang terinduksi oksidan bebas melalui penghambatan aktivitas enzim degradasi DNA pada asam nukleat golongan pirimidin sehingga terjadi regenerasi untuk memperbaiki DNA yang rusak. Efek antioksidan bebas dari kandungan alkaloid pada daun kosambi juga mampu menurunkan konsentrasi oksidan bebas dengan mentransfer elektron pada orbit terluar dari molekul yang mengandung oksidan bebas sehingga membuat elektron stabil dan menghilangkan sifat oksidan bebas (Goswami & Singh, 2017).

Selain itu, saponin pada daun kosambi juga memiliki efek antioksidan dengan membentuk hidrogen peroksida aktif sehingga dapat mengurangi oksigen bebas di lingkungan sekitarnya. Efek antioksidan ini dapat menjaga integritas sel dengan mencegah kerusakan struktur membran dari pengaruh oksidan bebas lingkungan sekitar. Hal ini dikarenakan, tingginya konsentrasi oksidan bebas berpengaruh pada

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

induksi apoptosis sel (Faradisa, 2008). Daun kosambi juga mengandung quercetin yang merupakan salah satu senyawa aktif kelompok flavonoid yang memiliki efek antioksidan melalui pengikatan oksidan bebas lingkungan sehingga mampu menurunkan konsentrasi oksidan bebas lingkungan (Amijaya et al., 2013).

b) Efek Antiinflamasi

Kandungan alkaloid, glikosida, terpenoid, fenolik, flavonoid, dan steroid pada ekstrak metanol daun kosambi berperan dalam aktivitas antiinflamasi. Tanin pada daun kosambi diduga mampu menimbulkan aktivitas antiinflamasi dengan pembersihan radikal bebas seperti *nitric oxide* (NO), yang diproduksi oleh nitrit oksida sintase yang merupakan *second messenger* selama proses inflamasi (Goswami & Singh, 2017).

Daun kosambi dilaporkan memiliki potensi efek antiinflamasi dan aktivitas antiarthritik yang sebanding dengan obat standar. Uji ekstrak daun kosambi dengan dosis 200 mg/kg dan 400 mg/kg menunjukkan aktivitas regulator faktor inflamasi dan analgesik lokal pada edema telinga terinduksi pada hewan uji. Mekanisme kerjanya mungkin terkait dengan penghambatan sintesis prostaglandin seperti pada NSAID. Efek ini terjadi akibat adanya penghambatan pada produksi nitrit oksida (NO), malondialdehida dan *12-O tetradecanoylphorbol-13-acetate* (TPA) jaringan yang berlebih. Regulasi produksi ini menyebabkan penurunan konsentrasi mediator inflamasi utama seperti *5-Hydroxy tryptamine* (5-HT) dan prostaglandin E2 (PGE2) (Bhatia, 2012; Santha, et al., 2017).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

c) Efek Penyembuhan Luka

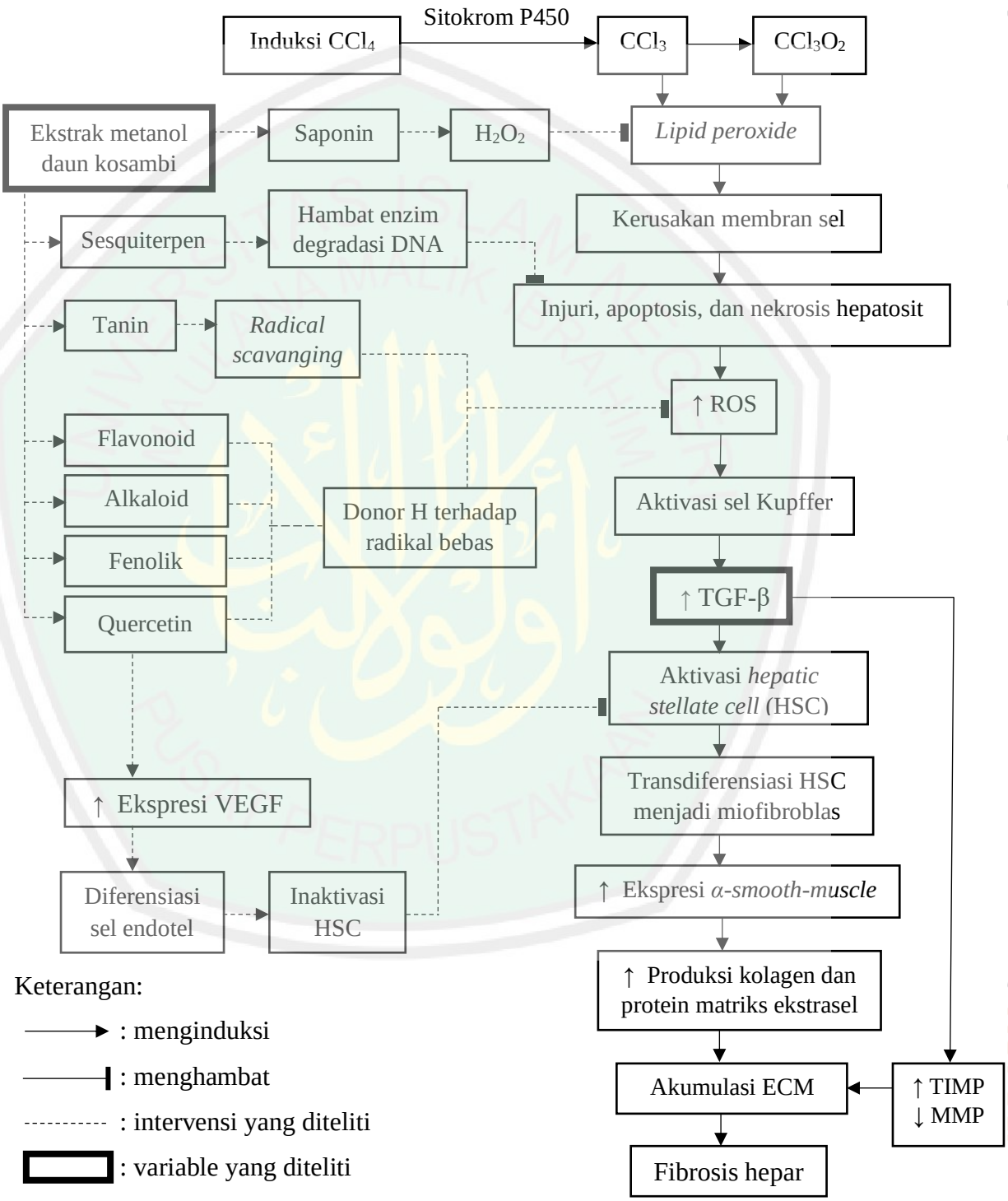
Quercetin yang terkandung dalam ekstrak metanol daun kosambi dapat mempercepat proses penyembuhan luka melalui induksi dan regulasi ekspresi VEGF dan TGF-β1. VEGF adalah agen angiogenik yang menstimulasi proses migrasi, proliferasi dan diferensiasi sel endotel pada jaringan yang mengalami trauma. TGF-β1 adalah sitokin yang berfungsi sebagai modulator pertumbuhan dan diferensiasi sel dengan meningkatkan proses angiogenik yang diinduksi VEGF (Lee et al., 2017).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konsep Penelitian.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Carbon tetrachloride (CCl_4) merupakan hepatotoksin yang umumnya digunakan untuk membuat model fibrosis hepar pada hewan coba. CCl_4 pada hepar mengalami biotransformasi oleh enzim sitokrom P450 (CYP2E1) yang akan membentuk radikal bebas triklorometil (CCl_3). CCl_3 akan mengalami oksidasi membentuk radikal triklorometil peroksil (CCl_3O_2) yang lebih reaktif. CCl_3 dan CCl_3O_2 menginduksi peroksidasi lipid pada membran fosfolipid yang menyebabkan permeabilitas membran rusak. Akibatnya, terjadi kerusakan sel, berupa apoptosis dan nekrosis hepatosit.

Ketika hepar mengalami injuri, akan terjadi serangkaian respon inflamasi berupa ekstravasasi berbagai sitokin yang kemudian mengaktifkan sel Kupffer di sinusoid hati dan kemotaksis sel inflamasi (limfosit, granulosit, dan monosit) pada jaringan hepar. Hepatosit yang rusak maupun sel kupffer yang telah teraktivasi akan melepaskan ROS yang merupakan sinyal aktivasi HSC yang poten. Sel kupffer dan sel inflamasi lain akan melepas berbagai macam sitokin seperti TNF-α, interleukin (IL)-1, GMC-SF, PDGF, serta TGF-β1 yang merupakan sitokin profibrogenik yang paling poten, yang kemudian dapat mengaktifkan sel stelata hati.

Setelah sel stelata (HSC) teraktivasi, sel ini berubah menjadi miofibroblas yang akan meningkatkan ekspresi *α-smooth-muscle actin*, dan menghasilkan sejumlah besar komponen ECM seperti kolagen (tipe I, III, IV), fibronektin, proteoglikan, dan glikoprotein. TGF-β1 selain diproduksi oleh makrofag hati, juga diproduksi oleh HSC namun dalam jumlah lebih kecil, dimana pensinyalan TGF-β1 juga turut menginduksi HSC untuk mensintesis protein matriks dalam jumlah berlebih. Hal ini mengakibatkan akumulasi matriks ekstraseluler (*extracellular matrix, ECM*) di *ruang Disse* yang berkontribusi dalam fibrosis hati. Degradasi

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

ECM diganggu oleh TGF-β1 dengan penekanan pada *matrix metalloproteinase* (MMP) dan meningkatkan *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMP). Dengan demikian, TGF-β1 meningkatkan deposit ECM dan menghambat degradasinya. Oleh karena itu, peningkatan konsentrasi TGF-β1 berkorelasi dengan tingkat keparahan fibrosis hepar.

Pembentukan jaringan fibrosis hepar pada tikus dapat dicegah melalui pemberian ekstrak daun kosambi melalui mekanisme supresi inflamasi hepar dan menghalangi aktivasi sel stelata dengan memanfaatkan efek antioksidan maupun efek antiinflamasi yang dimiliki oleh kandungan senyawa metabolit sekundernya. Ekstrak daun kosambi (*Schleichera oleosa*) memiliki kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, dan quercetin yang menunjukkan aktivitas antioksidan dengan menyumbangkan hidrogen pada radikal bebas seperti ROS sehingga radikal bebas berubah menjadi bentuk yang lebih stabil dan menurunkan radikal bebas di lingkungan. Senyawa tanin yang dikandung oleh kosambi terbukti memiliki aktivitas antioksidan dengan kemampuan pembersihan radikal bebas (*radical scavenging*) yang menargetkan ROS maupun lipid peroksida sehingga mampu memutus rantai reaksi radikal bebas yang kemudian menurunkan konsentrasi oksidan bebas dan mencegah kerusakan jaringan. Efek antioksidan pada senyawa-senyawa tersebut dapat mencegah pembentukan fibrosis hepar dengan mengikat oksidan bebas sehingga aktivasi sel stelata dapat dihalangi yang menyebabkan penurunan deposit matriks ekstraseluler.

Selain itu, efek antioksidan bebas dari *sesquiterpene* mampu mencegah sel dari apoptosis yang terinduksi oleh oksidan bebas melalui penghambatan aktivitas enzim degradasi DNA sel sehingga dapat terjadi regenerasi DNA yang rusak.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Saponin juga memiliki efek antioksidan dengan membentuk hidrogen peroksida aktif sehingga dapat mengurangi oksigen bebas di lingkungan dan menjaga integritas sel dengan mencegah kerusakan struktur membran. Hal ini dikarenakan, tingginya konsentrasi oksidan bebas berpengaruh pada induksi apoptosis sel. Efek antioksidan ini berkontribusi dalam mencegah fibrosis hepar dengan menghambat kerusakan sel yang diinduksi oksidan bebas sehingga tidak terjadi aktivasi sel kupffer maupun sel inflamasi lainnya, sehingga terjadi sitokin-sitokin inflamasi dan profibrogenik seperti TGF-β, TNF-α, dan interleukin.

Kandungan senyawa metabolit sekunder seperti tanin yang dimiliki kosambi memiliki aktifitas antiinflamasi yang dapat menurunkan konsentrasi senyawa *nitric oxide* (NO) yang diproduksi oleh nitrit oksida sintase yang merupakan *second messenger* selama proses inflamasi. Sehingga aktivasi sel stelata dapat dihalangi yang menyebabkan penurunan produksi TGF-β serta penurunan deposit matriks ekstraseluler, dan mencegah terbentuknya fibrosis hepar.

Quercetin yang terkandung dalam ekstrak kosambi juga dapat berpengaruh pencegahan fibrosis hepar, melalui induksi dan regulasi ekspresi VEGF. VEGF merupakan agen angiogenik yang menstimulasi proses migrasi, proliferasi dan diferensiasi sel endotel pada jaringan yang mengalami trauma. Adanya *fenestrated endothelial cells* (sel-sel endotelial "terdiferensiasi") yang dimediasi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) penting untuk mempertahankan fenotip qHSC (quiscent HSC) sehingga dapat mencegah aktivasi HSC spontan. Pada injuri hepar, dengan meningkatkan ekspresi VEGF dapat menginduksi diferensiasi sel endotel sehingga mendorong pengembalian HSC yang teraktivasi menjadi *quiescence* (inaktif).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Adanya penurunan kadar TGF-β pada jaringan hepar yang diinduksi fibrosis dapat mengindikasikan potensi ekstrak daun kosambi sebagai pencegahan fibrosis hepar.

3.2. Hipotesis Penelitian

a. Hipotesis alternatif

   Pemberian ekstrak daun kosambi (*Schleichera oleosa*) dapat menurunkan kadar TGF-β1 pada tikus wistar model fibrosis hepar.

b. Hipotesis nol

   Pemberian ekstrak daun kosambi (*Schleichera oleosa*) tidak dapat menurunkan kadar TGF-β1 pada tikus wistar model fibrosis hepar.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara in vivo. Penelitian ini menggunakan rancangan *post test only control group design* untuk mengetahui potensi ekstrak daun kosambi *(Schleichera oleosa)* dalam menurunkan kadar TGF-β1 pada tikus model fibrosis hepar yang diinduksi CCl_4 melalui pengujian kadar *Transforming Growth Factors* (TGF-β1).

4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

4.2.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di:

- Laboratorium hewan coba FKIK UIN Malang untuk persiapan dan pemeliharaan hewan coba tikus.
- Laboratorium ekstraksi tanaman Materia Medika Batu untuk penggilingan daun kosambi.
- Laboratorium fitokimia Farmasi FKIK UIN Malang untuk pembuatan ekstrak daun kosambi.
- Laboratorium mikrobiologi FKIK UIN Malang untuk pembuatan larutan ekstrak daun kosambi untuk sonde.
- Laboratorium hewan coba FKIK UIN Malang untuk pembuatan hewan coba model fibrosis hepar dengan metode injeksi CCl_4 intraperitoneal.
- Laboratorium hewan coba FKIK UIN Malang untuk pengambilan sampel organ hepar hewan coba.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

- Laboratorium Biomolekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya untuk pengujian kadar TGF-β1.

4.2.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 2 bulan, terhitung dari bulan Januari sampai Februari 2020.

4.3. Populasi Penelitian

Penelitian ini menggunakan populasi tikus putih *Rattus Norvegicus* galur Wistar, berjenis kelamin jantan, berusia 2-3 bulan, dengan berat badan ± 150-200 gram yang berasal dari peternakan hewan coba di Kota Malang (Rattus Breeding Centre).

4.4. Sampel Penelitian

4.4.1 Besar Sampel

Besar sampel dihitung berdasarkan rumus Federer (1955) dengan persamaan sebagai berikut :

$$(T-1)\ (N-1) \geq 15$$

Keterangan : T = Banyaknya kelompok

N = Besar sampel setiap kelompok

Dalam penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan yaitu:

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

$4\ (N-1) \geq 15$

$4N - 4 \geq 15$

$4N \geq 19$

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

N ≥ 19/4

N ≥ 4,75 dibulatkan menjadi 5

Jadi menurut perhitungan diatas, besar sampel yang diperlukan dalam tiap kelompok adalah 5 ekor dan total hewan coba yang digunakan adalah 25 ekor tikus.

Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan Hewan Coba.

No	Nama Kelompok	Keterangan
1	Kontrol positif (K-)	Tikus wistar tidak diinduksi CCl_4 dan tidak diberi ekstrak kosambi.
2	Kontrol positif (K+)	Tikus wistar diinduksi CCl_4 intraperitoneal dosis 3 ml/kgBB setiap 3 hari sekali selama 6 minggu
3	Perlakuan 1 (P1)	Tikus wistar diinduksi CCl_4 intraperitoneal dosis 3 ml/kgBB setiap 3 hari selama 6 minggu dan diberi ekstrak kosambi 200 mg/kgBB (0,2 mg/grBB) peroral setiap hari sekali selama 6 minggu
4	Perlakuan 2 (P2)	Tikus wistar diinduksi CCl_4 intraperitoneal dosis 3ml/kgBB setiap 3 hari selama 6 minggu dan diberi ekstrak kosambi 400 mg/kgBB (0,4 mg/grBB) peroral setiap hari sekali selama 6 minggu
5	Perlakuan 3 (P3)	Tikus wistar diinduksi CCl_4 intraperitoneal dosis 3ml/kgBB setiap 3 hari selama 6 minggu dan diberi ekstrak kosambi 600 mg/kgBB (0,6 mg/grBB) peroral setiap hari sekali selama 6 minggu

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4.4.2. Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini menggunakan teknik *Simple Random Sampling.* Teknik ini mengasumsikan bahwa pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana sehingga setiap anggota atau unit populasi memiliki kesempatan yang sebanding dalam seleksi sampel.

4.4.3. Karakteristik Sampel

4.4.3.1. Kriteria Inklusi

a) Tikus wistar
b) Usia 2-3 bulan
c) Berat badan 150-200 gram
d) Berjenis kelamin jantan
e) Sehat, ditandai dengan gerakan yang lincah dan aktif, bulu tebal dan rata, mata proporsional, jernih dan tidak memiliki eksudat kotoran.

4.4.3.2. Kriteria Eksklusi

a) Sakit (gerakan tidak aktif, rambut kusam, kaku, rontok atau botak, serta keluar eksudat dari mata, mulut, anus, atau genitalia)

4.4.3.3. Kriteria Drop Out

a) Tikus mati
b) Tikus hilang selama penelitian

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 3 variabel yaitu:

1. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini pemberian dosis ekstrak metanol daun kosambi.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar TGF-β1 dari sampel organ hepar tikus melalui *flow cytometry*
3. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah hewan coba tikus dengan usia 2-3 bulan dengan berat 150-200 gram dalam kondisi sehat.

4.6. Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah:

a) **Pemeliharaan hewan coba**

Kandang tikus, tutup kandang, tempat pakan dan minum.

b) **Pembuatan ekstrak daun kosambi**

Oven, mesin penggiling, *beaker glass*, batang pengaduk, tabung *erlenmeyer*, corong, kaca arloji, sendok tanduk, cawan porselen, *rotatory vacuum evaporator*, *ultrasonic* cleaner, oven, neraca analitik.

c) **Pemberian ekstrak daun kosambi**

Timbangan analitik, plastik berklip, sonde lambung, spuit 1 ml Terumo, sendok makan, timbangan analitik, plastik berklip, sonde lambung, spuit 1 ml Terumo, sendok makan.

d) **Pembuatan tikus model fibrosis hepar dengan metode injeksi CCl_4 intraperitoneal**

Blue tip, *yellow tip*, *micropippet*, tabung Eppendorf, *laminar airflow*, spuit 1 ml, kapas, sarung tangan.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

e) Pembedahan tikus dan preparasi sampel organ hepar

Gunting bedah, scalpel dan blade, papan pembedahan, jarum pentul, cawan petri *pyrex*, spuit 5 ml, *sentrifuge tube*, mikropipet 10 dan 1000 uL Corning, tabung dan rak Eppendorf, s*entrifuge*, masker, sarung tangan.

f) Pengujian kadar TGF-β dengan *flow cytometry*

Tabung propilen 15 ml, *microtube* 1,5 ml, kuvet FCM, BD FACS Calibur ™ *Flowcytometer*, *software* Cell Quest Pro ™, cawan petri, c*entrifuge*, *micropipette*, dan tip.

4.6.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah:

a) Pemeliharaan hewan coba

Tikus wistar jantan usia 2-3 bulan, sekam, pakan tikus (BR-1), air.

b) Pembuatan ekstrak daun kosambi

Daun kosambi, simplisia daun kosambi, metanol, air, aluminium foil, kertas saring.

c) Pembuatan larutan ekstrak daun kosambi untuk sonde

Na-CMC 0,5%, aquades, larutan ekstrak daun kosambi.

d) Pembuatan tikus model fibrosis hepar dengan metode injeksi CCl_4 secara intraperitoneal

CCl_4 merk Merck, minyak jagung merk Pietro Coricelli, CCl_4, NS 0,9%, alkohol 70%..

e) Pengujian kadar TGF-β dengan *flow cytometry*

Sampel organ hepar, PBS steril, antibodi *cell surface molecule* CD4 dan antibodi *cell surface molecule* CD25, larutan fiksatif (fixation buffer,

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

cat.#420801 [Biolegend]), larutan permeabilitas (1X) (Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer (10X), cat.#421002 [Biolegend]).

4.7. Definisi Operasional

1. Tikus model fibrosis hepar adalah tikus wistar jantan yang diinjeksi CCl_4 secara intraperitoneal dosis 3 ml/KgBB setiap 3 hari sekali selama 6 minggu (Dang et al., 2007)
2. CCl_4 yang digunakan adalah karbon tetraklorida yang bermerk Merck, dibuat di Jerman, dengan nomor katalog 1.02222.2500.
3. Daun kosambi adalah daun yang diperoleh dari halaman Universitas Brawijaya dan telah di determinasi di Materia Medika Batu.
4. Ekstrak daun kosambi adalah hasil penggilingan daun kosambi sehingga menjadi simplisia di Materia Medika Batu dan selanjutnya di ekstrak di Laboratorium fitokimia Farmasi FKIK UIN Malang menggunakan metode *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE).
5. Kadar TGF-β adalah hasil pengukuran kadar TGF-β yang diambil dari sampel organ hepar tikus model fibrosis hepar, dengan metode *flow cytometry* dan menggunakan kit TGF-β merk *BD PharMingen*™ (*BD Bioscience*).

4.8. Prosedur Penelitian

4.8.1. Determinasi Tanaman

Sebelum penelitian dilakukan, sampel tanaman kosambi terlebih dahulu dideterminasi di Laboratorium Materia Medika Batu.

4.8.2. Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah 25 tikus jantan berusia 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gr dalam keadaan kesehatan baik.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Sampel dibagi menjadi 5 kelompok yang terdiri dari kelompok A (kontrol negatif), kelompok B (kontrol positif) dan kelompok C, D, dan E sebagai kelompok perlakuan. Sebelum perlakuan, tikus diaklimatisasi selama 7 hari dengan ditempatkan pada kandang. Tikus diberi pakan pelet dan minum secara *ad libitum.* Induksi CCl_4 untuk menginduksi fibrosis hepar dilakukan dengan dosis 3 ml/kgBB secara intraperitoneal pada kelompok B, C, D, dan E setiap 3 hari selama 6 minggu. Setiap hari berat badan ditimbang.

4.8.3. Pembuatan Model Hewan Coba Fibrosis Hepar

a. Dosis CCl_4

Mengacu pada penelitian Dang, et al. (2007), untuk menginduksi fibrosis hepar pada hewan coba digunakan CCL_4 dengan dosis 3 ml/kgBB yang diinjeksikan secara intraperitoneal setiap 3 hari sekali selama enam minggu. CCl_4 yang digunakan pada penelitian ini dilarutkan dalam minyak jagung dengan perbandingan 1 : 4 (Lampiran 1). Dari hasil perhitungan dosis CCl_4 (Lampiran 2) diperoleh dosis CCl_4 sebesar 0,6 ml.

b. Injeksi CCl_4

Tikus diletakkan diatas tutup kandang berkawat hingga tikus diam dan gerakan pasif. Lalu bagian tengkuk tikus dijepit dengan ibu jari dan jari telunjuk peneliti sehingga kepala tikus dapat menengadah keatas dan memposisikan tubuh tikus supinasi. Jari yang lain menjepit kaki dan ekor tikus untuk memfiksasi gerakan tikus. Dibersihkan daerah abdomen yang akan diinjeksi menggunakan kapas beralkohol 70%. CCl_4 diambil menggunakan spuit 1 ml sebanyak 0,6 ml lalu diinjeksi secara intraperitoneal. Kemudian letakkan kembali tikus kedalam kandang.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4.8.4. Pembuatan Ekstrak Daun Kosambi

Daun kosambi yang telah dipetik dikeringkan dahulu. Setelah kering, daun digiling menggunakan mesin penggiling menjadi serbuk halus (simplisia) di Materia Medika Batu. Lalu simplisia daun kosambi diekstraksi dengan metode UAE *(Ultrasonic-Assisted Extraction)* di Laboratorium fitokimia Farmasi FKIK UIN Malang. *Ultrasonic-Assisted Extraction* (UAE) memanfaatkan gelombang ultrasonik untuk menghancurkan sel daun sehingga dapat mempercepat proses perpindahan massa senyawa bioaktif dari dalam sel ke pelarut (Dean, 1998).

Ekstraksi pada daun kosambi dilakukan dengan cara ekstraksi ultrasonik dengan pelarut metanol dengan waktu sekitar 3 jam. Simplisia daun kosambi sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer, lalu ditambahkan pelarut metanol sebanyak 10 ml dengan perbandingan simplisia : pelarut = 1 : 10. Selanjutnya larutan ini dimasukkan ke dalam alat ekstraksi ultrasonik (UAE) dengan memakai frekuensi 42 kHz selama 10-30 menit dengan suhu 40°C. Hasil ekstraksi disaring menggunakan kertas saring, kemudian pelarut diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C hingga didapatkan ekstrak kental (Sholihah et al., 2017)

4.8.5. Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Kosambi untuk Sonde

a. Pembuatan Stok Sediaan Larutan Na-CMC 0,5%

Stok larutan Na-CMC dibuat dengan memasukkan 50 mg Na CMC ke dalam 10 ml aquades, setelah itu diaduk sampai homogen, lalu dipanaskan kurang lebih 15 menit sampai warnanya menjadi bening dan bentuknya mirip seperti gel. Setelah itu diencerkan dalam gelas beker dengan aquades sampai volumenya mencapai 100 ml.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Dalam penelitian ini dibutuhkan total larutan sebanyak 1000 ml, sehingga dibutuhkan Na-CMC sebanyak 500 mg. Caranya dengan memasukkan 500 mg Na-CMC ke dalam 100 ml aquades, lalu diaduk dan dipanaskan hingga menyerupai gel. Kemudian ditambahkan aquades hingga volume nya 1000 ml.

b. Dosis Perlakuan Ekstrak Daun Kosambi *(Schleichera oleosa)*

Dosis ekstrak metanol daun kosambi mengacu pada penelitian Santha et al (2017), yang mana diketahui ekstrak daun kosambi memiliki efek antiinflamasi pada dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 600 mg/kgBB yang secara signifikan mampu menghambat progresi peradangan sendi pada hewan coba. Sehingga penelitian ini juga menggunakan tiga dosis berbeda untuk membandingkan efek dosis yang paling signifikan pada fibrosis hepar. Perhitungan dosis ekstrak daun kosambi tercantum pada Lampiran 3.

4.8.6. Pemberian Terapi Ekstrak Daun Kosambi

Pada penelitian ini hewan coba terbagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok A (kontrol negatif) yang tidak mendapat perlakuan induksi CCl_4 maupun ekstrak kosambi, kelompok B (kontrol positif) yang mendapat perlakuan induksi CCl_4 tanpa terapi ekstrak kosambi, kelompok C (perlakuan 1) yang mendapat perlakuan induksi CCl_4 dan terapi ekstrak kosambi dengan dosis 200 mg/kgBB, kelompok D (perlakuan 2) yang mendapat perlakuan induksi CCl_4 dan terapi ekstrak kosambi dengan dosis 400 mg/kgBB, kelompok E (perlakuan 3) yang mendapat perlakuan induksi CCl_4 dan terapi ekstrak kosambi dengan dosis 600 mg/kgBB. Terapi ekstrak kosambi dilakukan secara peroral menggunakan sonde lambung setiap hari selama 6 minggu.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4.8.7. Pengambilan Sampel Organ Hepar

Pengambilan organ hepar untuk pemeriksaan TGF-β dengan *flow cytometry* pada hewan coba tikus dilakukan setelah 6 minggu perlakuan. Perlakuan euthanasia pada tikus dilakukan dengan cara dislokasi servikalis kemudian diletakkan pada meja bedah dengan posisi pronasi dan ekstremitas terfiksasi dengan jarum. Penyayatan dilakukan pada cavum toraks. Setelah itu dicari organ hepar yang terletak pada abdomen kanan. Hati diangkat dan dibilas dengan *phosphat buffer saline* (PBS) sebanyak dua kali guna membersihkan debris darah dan jaringan lalu hati ditempatkan pada cawan petri yang berisi 10 mL PBS kemudian digerus. Cawan petri yang berisi gerusan hati tersebut kemudian dimiringkan untuk diambil cairannya dan dimasukkan ke dalam tabung propilen menggunakan spuit untuk kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4°C untuk proses isolasi pelet. Semua sampel diberi label sesuai dengan kelompok perlakuan tikus.

4.8.8. Pengukuran Kadar TGF-β dengan *Flow cytometry*

Cairan gerusan organ hati yang telah disentrifugasi dan diisolasi peletnya kemudian ditambahkan PBS sebanyak 1 ml lalu dihomogenkan dengan cara *pipetting*. Sebanyak 100uL hasil pipetting diambil dan dimasukkan kedalam microtube. Selanjutnya ditambahkan 500uL PBS dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 10°C. Pelet hasil sentrifugasi kemudian ditambahkan antibodi *cell surface molecule* CD4 dan antibodi *cell surface molecule* CD25 sebanyak masing-masing 50 µL yang digunakan untuk pewarnaan molekul permukaan sel (CD4CD25) yang dikonjugasi dengan label *phycoerythrin* (PE) untuk CD25 dan FITC untuk CD4. Lalu diinkubasi selama 20

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

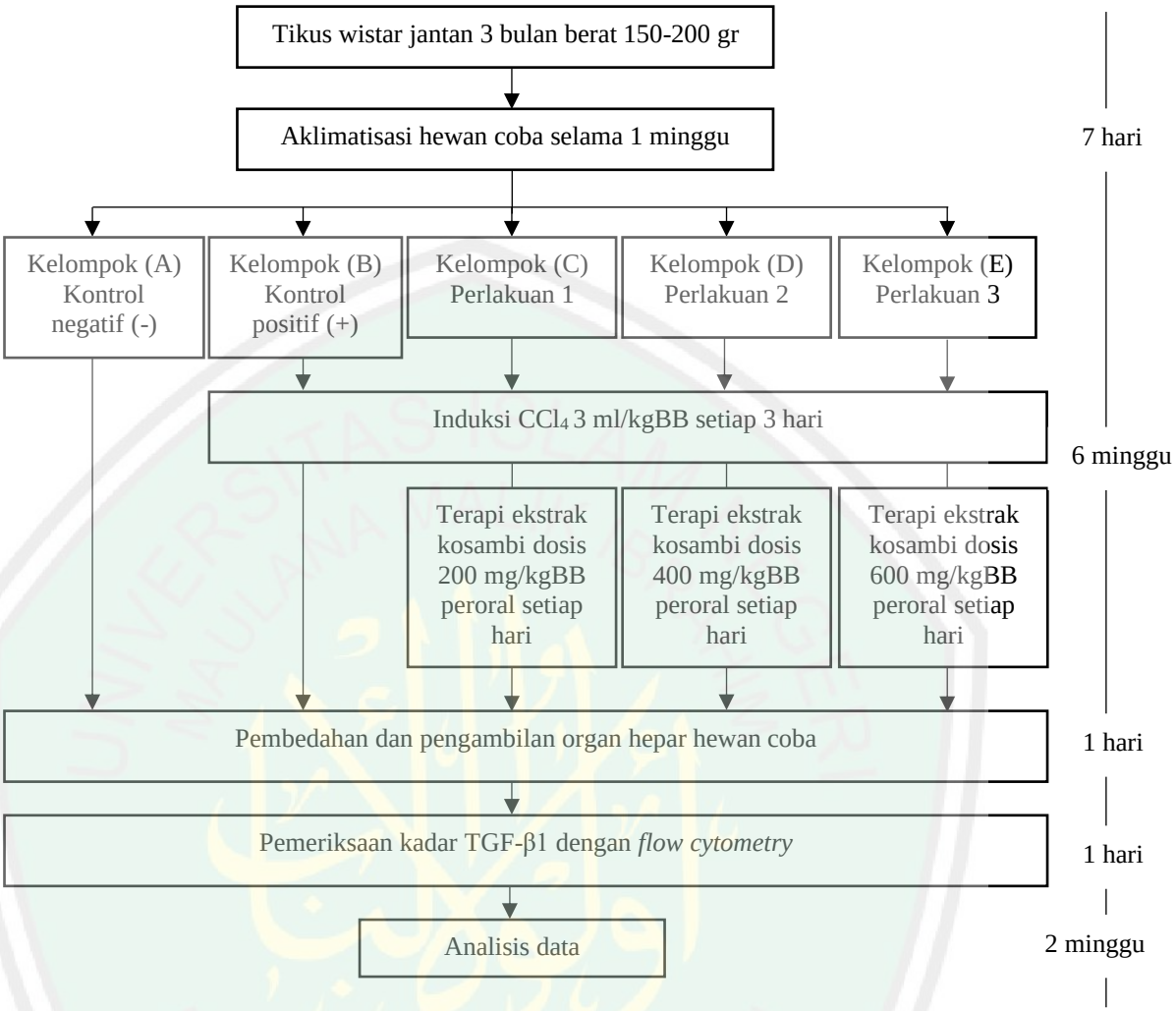
menit dengan suhu 4ºC di ruang gelap. Hasil inkubasi kemudian ditambahkan 300 µL PBS dan dipindahkan ke kuvet FCM untuk analisis *flow cytometry*. Selanjutnya ditambahkan larutan fiksatif sebanyak 50 µl. Pelet lalu diinkubasi selama 20 menit pada 4ºC dalam ruang gelap, lalu ditambahkan larutan permeabilitas sebanyak 500 µl, dihomogenisasi, dan disentrifugasi 2500 rpm selama 5 menit pada 10ºC. Pelet hasil sentrifugasi ditambahkan 50 µl larutan anti-TGFβ dan diinkubasi selama 20 menit pada 4ºC dalam ruang gelap. Hasil inkubasi ditambahkan ±400 µl PBS dan dipindahkan ke kuvet FCM untuk diproses.

4.8.9. Analisis Hasil *Flow cytometry*

Sel-sel hasil isolasi dari organ hepar, selanjutnya dianalisis *Flow Cytometry BD FCS Calibur* untuk mendeteksi subpopulasi sel. Analisis dilakukan dengan komputer dan diatur pada keadaan *acquiring* serta dilakukan setting sesuai parameter yang akan dianalisis. Kemudian sampel yang telah diberi anti-TGFβ ditambah 1 ml PBS dan ditempatkan pada kuvet *flowcytometer*. Selanjutnya dipilih *acquire* dan *flowcytometer* akan menghitung jumlah sel total serta jumlah sel yang terdeteksi oleh label anti-TGFβ kemudian hasil yang diperoleh diolah dengan program *BD cellquest Pro™*

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4.9. Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian.

4.10. Analisis Data

Analisa data yang digunakan pada penelitian ini adalah analisis kuantitatif *One-Way ANOVA* yaitu teknik analisis multivariate yang berfungsi untuk membedakan rerata lebih dari dua kelompok data dengan cara membandingkan variansinya, sehingga dapat diketahui signifikasi jumlah TGF-β pada kelompok perlakuan dan kontrol karena merupakan skala numerik. Jenis hipotesis yang digunakan adalah hipotesis komparatif dan jumlah kelompok perlakuan lebih dari 2 kelompok. Untuk dapat melakukan analisa kuantitatif tersebut terdapat

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

persyaratan dimana data harus berdistribusi normal sehingga penghitungan uji statistik menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan varians antar variabel harus homogen sehingga dilakukan penghitungan statistik menggunakan uji *Levene test* (Ghozali, 2005).

Uji normalitas adalah uji statistik untuk menilai kenormalan distribusi data. Uji normalitas data yang digunakan adalah Shapiro-Wilks. Hal ini didasarkan pada jumlah sampel yang kurang dari 30. Uji Shapiro-Wilks digunakan guna mengetahui normalitas distribusi data guna memenuhi syarat analisa One Way ANOVA. Apabila pada uji ini diperoleh hasil seluruh kelompok penelitian memiliki nilai signifikan dengan ambang minimal 0,05 ($p > 0,05$) maka data pada seluruh kelompok memiliki distribusi normal (Ghozali, 2005).

Uji homogenitas adalah uji statistik untuk mengetahui bahwa dua atau lebih kelompok data sampel berasal dari populasi yang memiliki varians sama (homogen). Uji Homogenitas Levene perlu dilakukan untuk memastikan bahwa setiap grup variabel independen memiliki varians sama sebelum diuji analisa kuantitatif *One-Way ANOVA.* Apabila pada uji ini didapatkan nilai signifikansi yang lebih besar dari 0,05 ($p>0,05$) maka dapat disimpulkan bahwa varians pada data penelitian tersebut homogen (Ghozali, 2005).

Setelah data telah diuji normalitas dan homogenitas maka data dapat diuji dengan analisa kuantitatif *One-Way ANOVA* yang bertujuan untuk mengetahui hubungan antar satu variabel dependen dengan satu atau lebih variabel independen yaitu hubungan jumlah TGF-β dan dosis ekstrak metanol kosambi antar kelompok. Jika data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen maka dapat dilakukan *re-adjustment* data yaitu berupa penambahan sampel, eliminasi data ekstrim, dan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

transformasi bentuk linear data. Apabila ketiga cara tersebut gagal, maka dilakukan uji *Kruskal-Wallis* yang digunakan untuk membandingkan tiga atau lebih kelompok data sampel ketika syarat analisis parametrik tidak terpenuhi dimana asumsi normalitas tidak terpenuhi atau nilai varians tidak sama (Ghozali, 2005).

Apabila didapatkan hasil yang signifikan ($p<0,05$) baik dari uji one way ANOVA ataupun Uji *Kruskal-Wallis* maka dilakukan uji *Post-Hoc LSD* guna mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok perlakuan. Analisis statistik menggunakan a = 0,05 (Ghozali, 2005).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni di laboratorium secara in vivo dengan rancangan post-test only control group design menggunakan tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*). Sampel tikus dikelompokkan menjadi lima kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (tikus yang tidak diinduksi dengan CCl_4 dan tidak diberikan terapi), kelompok kontrol positif (tikus diinduksi dengan CCl_4 dan tidak diberikan terapi), kelompok perlakuan 1 (tikus diinduksi CCl_4 dan diberi ekstrak daun kosambi dengan dosis 200 mg/kgBB), kelompok perlakuan 2 (tikus diinduksi CCl_4 dan diberi ekstrak daun kosambi dengan dosis 400 mg/kgBB), dan kelompok perlakuan 3 (tikus diinduksi CCl_4 dan diberi ekstrak daun kosambi dengan dosis 600 mg/kgBB). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun kosambi *(Schleichera oleosa)* secara oral dalam menurunkan kadar TGF-β1 pada tikus wistar model fibrosis hepar. Induksi fibrosis hepar menggunakan karbon tetraklorida (CCl_4) yang diinjeksikan secara intraperitoneal. Pada penelitian ini dilakukan pengukuran terhadap kadar TGF-β1 pada organ hepar tikus dengan menggunakan *flow cytometry*.

5.1.1 Hasil Pengukuran Kadar TGF-β1 Hepar dengan *Flow Cytometry*

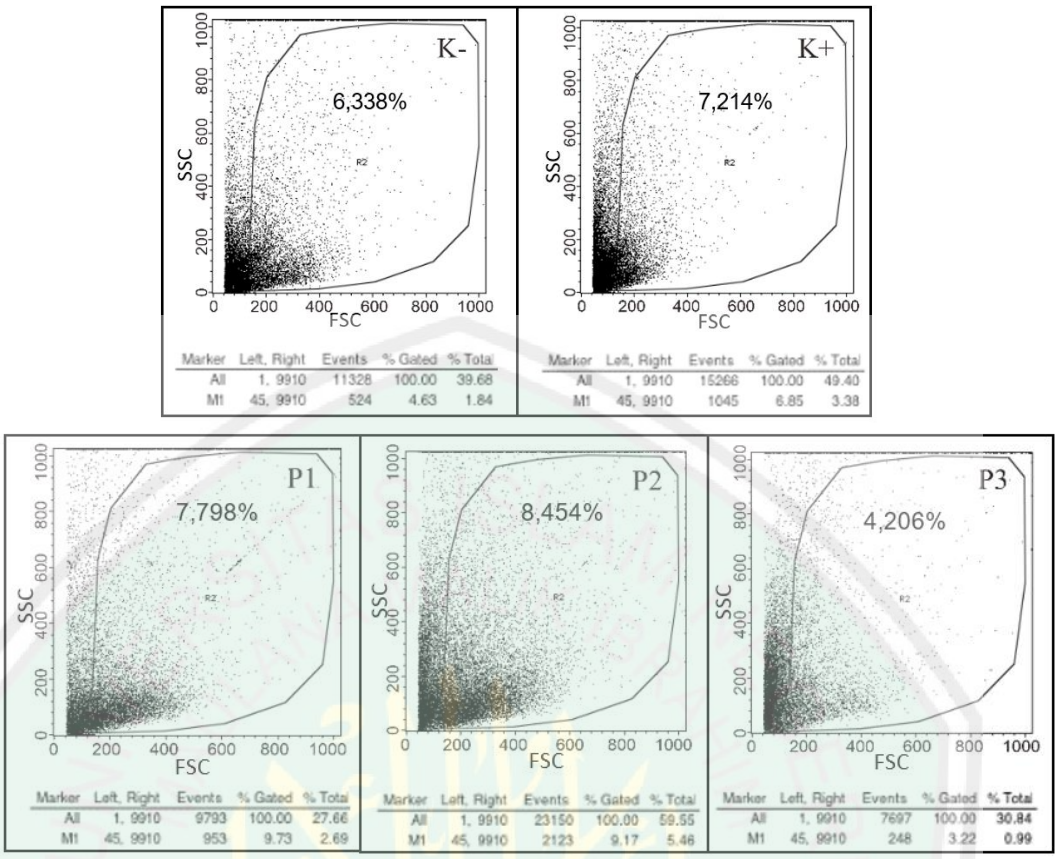
Flow cytometry dapat digunakan untuk analisis data berupa kualitatif dan kuantitatif dalam bentuk persentase atau relatif. Pada pemeriksaan ini, sinar laser akan melewati sel yang kemudian akan terpencar menuju dua sumbu yakni *side scatter* (SSC) yang arahnya tegak lurus dari arah sinar laser awal dan *forward scatter* (FSC) yang parallel terhadap arah sinar laser awal. Keduanya tergambarkan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

dalam grafik *scatter* yang menunjukkan daerah (*region*) pemeriksaan karakteristik sel seperti pada gambar 5.1. SSC yang terletak pada sumbu Y menunjukkan kompleksitas atau granularitas dari sel sehingga semakin ke atas maka semakin tinggi granularitas sel. FSC yang terletak pada sumbu X menunjukkan volume atau ukuran sel, sehingga semakin ke kanan maka semakin besar ukuran sel. Berdasarkan ukuran dan tingkat granularitasnya, sel makrofag memiliki sel yang paling besar dan memiliki banyak granul, kemudian sel monosit lalu limfosit. Untuk ukuran yang lebih kecil dan tidak bergranul atau kompleksitas rendah merupakan sel yang telah mati atau debris (Lewandowski, 2006).

Guna melihat karakteristik sel limfosit saja maka di lakukan *gating* pada region sel limfosit pada grafik *scatter* seperti contoh pada gambar 5.1. *Gating* pada grafik scatter dapat dimaknai sebagai penyortiran daerah grafik dengan kriteria tertentu sehingga hanya sel dengan karakteristik tertentu yang dianalisis. Kemudian jumlah sel akan disajikan dalam tabel persebaran relatif populasi sel limfosit T seperti pada gambar 5.1. Pada tabel tersebut, kolom *Events* menunjukkan jumlah sel. Kolom %Total menujukkan rasio jumlah sel yang positif (+) berikatan dengan antibodi terhadap total jumlah sel yang teridentifikasi. Kolom *%Gated* menunjukkan persentase jumlah sel yang berikatan positif (+) dengan antibodi (Ormerod, 2008).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



Gambar 5.1. Kadar TGF-β1 Hepar dengan *Flow Cytometry*

Analisis dot plot pada Gambar 5.1 merepresentasikan ekspresi TGF-β yang berasal dari sel-sel leukosit pada hepar tikus. Berdasarkan ukuran sel (*forward scatter*; FSC) dan kompleksitas (*side scatter*; SCC), grafik ini menunjukkan satu populasi yang diamati yaitu populasi limfosit dengan kriteria FSC dari rentang ukuran 200 hingga 400 dan SSC dari rentang kompleksitas 0 hingga 200 (Ormerod, 2008). Kadar relatif TGF-β1 menunjukkan jumlah sel yang mengekspresikan TGF-β1 dibandingkan jumlah total sel hidup yang dihitung dalam hepar. Dari hasil analisis dot plot pada kontrol negatif dapat diketahui bahwa sel limfosit memiliki persentase TGF-β sebanyak 4,63% dari 2,35% dari keseluruhan sel. Pada kontrol positif diketahui bahwa sel limfosit memiliki persentase TGF-β sebanyak 6,85% dari 3,38% dari keseluruhan sel. Pada kelompok perlakuan 1 menunjukkan bahwa sel limfosit memiliki persentase TGF-β sebanyak 9,73% dari 2,69% dari

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

keseluruhan sel. Pada kelompok perlakuan 2 menunjukkan bahwa sel limfosit memiliki persentase TGF-β sebanyak 9,17% dari 5,46% dari keseluruhan sel. Pada kelompok perlakuan 3 menunjukkan bahwa sel limfosit memiliki persentase TGF-β sebanyak 3,22% dari 0,99% dari keseluruhan sel.

Hasil pengukuran rata-rata kadar relatif TGF-β1 dari lima kelompok perlakuan dapat dilihat pada Tabel 5.1. berikut.

Tabel 5.1. Rata-rata Kadar TGF-β1 pada Organ Hepar Tikus

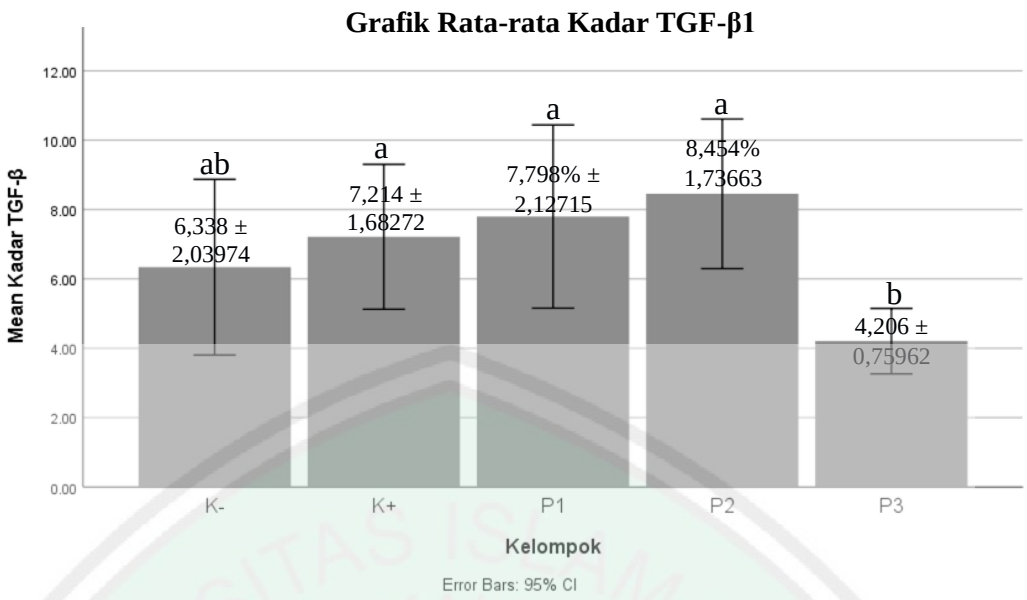
Kelompok	Kadar TGF-β1 pada Organ Hepar Tikus ± dalam % ($\bar{\chi} \pm$ SD)
Kontrol Negatif (-)	6,338 ± 2,03974^{ab}
Kontrol Positif (+)	7,214 ± 1,68272^{a}
Perlakuan 1	7,798 ± 2,12715^{a}
Perlakuan 2	8,454 ± 1,73663^{a}
Perlakuan 3	4,206 ± 0,75962^{b}

Keterangan: K(-) = Kontrol negatif (tidak diinduksi CCl_4 dan tidak diberi terapi ekstrak daun kosambi); K(+) = Kontrol positif (diinduksi CCl_4 dan tidak diberi terapi); P1 = Perlakuan 1 (diinduksi CCl_4 dan diberi terapi ekstrak daun kosambi dosis 200 mg/kgBB); P2 = Perlakuan 2 (diinduksi CCl_4 dan diberi terapi dosis 400 mg/kgBB); P3 = Perlakuan 3 (diinduksi CCl_4 dan diberi terapi dosis 600 mg/kgBB); a dan b (notasi yang menunjukkan ada tidaknya perbedaan, a berbeda secara signifikan dengan b, ab tidak berbeda secara signifikan dengan a dan b); $p<0,05$.

Pada Tabel 5.1 dapat dilihat jumlah persentase kadar TGF-β1 pada organ hepar kelima kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol positif didapatkan hasil sebesar 6,8667%, kelompok kontrol negatif sebesar 6,9367%, kelompok perlakuan 1 terapi dosis 200 mg/kgBB sebesar 7,798%, kelompok perlakuan 2 terapi dosis 400 mg/kgBB sebesar 8,454% dan kelompok perlakuan 3 terapi dosis 600 mg/kgBB sebesar 4,48%.

Rata-rata kadar TGF-β1 disajikan dalam grafik berikut.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



Gambar 5.2. Grafik Rata-rata Hasil Pengukuran Kadar TGF-β1 pada Organ Hepar Tikus Menggunakan *Flow Cytometry*

Keterangan: K(-) = Kontrol negatif (tidak diinduksi CCl_4 dan tidak diberi terapi ekstrak daun kosambi); K(+) = Kontrol positif (diinduksi CCl_4 dan tidak diberi terapi); P1 = Perlakuan 1 (diinduksi CCl_4 dan diberi terapi ekstrak daun kosambi dosis 200 mg/kgBB); P2 = Perlakuan 2 (diinduksi CCl_4 dan diberi terapi dosis 400 mg/kgBB); P3 = Perlakuan 3 (diinduksi CCl_4 dan diberi terapi dosis 600 mg/kgBB); a dan b (notasi yang menunjukkan ada tidaknya perbedaan, a berbeda secara signifikan dengan b); $p<0,05$.

Grafik 5.2 menunjukkan secara deskriptif bahwa kadar TGF-β1 pada kelompok kontrol positif lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif. Pada kelompok perlakuan 3 terjadi penurunan kadar TGF-β1 dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Namun, pada kelompok perlakuan 2 terjadi peningkatan kadar TGF-β1 dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, yang diikuti oleh kelompok perlakuan 1.

5.1.2 Analisis Data

Data hasil pengukuran kadar TGF-β1 dari kelima kelompok perlakuan kemudian diolah dan dianalisis menggunakan program *SPSS 22* dengan nilai signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk dan uji homogenitas Levene diperoleh hasil data terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$) (Lampiran 6). Karena data terdistribusi

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

normal dan homogen, maka pada dapat dilakukan uji One-Way ANOVA. Hasil uji One-Way ANOVA diperoleh nilai signifikansi sebesar p = 0,009 (p > 0,05) yang menunjukkan terdapat setidaknya dua kelompok yang berbeda secara signifikan. Selanjutnya dilakukan uji Post-Hoc dengan uji LSD untuk mengetahui signifikansi perbedaan nilai antar kelompok.

Tabel 5.2. Hasil Uji Post-Hoc

Variabel Dependen (Kadar TGF-β1 Hepar)		Sig.	Keterangan
(I) Kelompok	(J) Kelompok		
Kontrol Negatif	Kontrol Positif	.435	Tidak berbeda
	Perlakuan 1	.199	Tidak berbeda
	Perlakuan 2	.069	Tidak berbeda
	Perlakuan 3	.067	Tidak berbeda
Kontrol Positif	Kontrol Negatif	.435	Tidak berbeda
	Perlakuan 1	.601	Tidak berbeda
	Perlakuan 2	.273	Tidak berbeda
	Perlakuan 3	.013	Berbeda
Perlakuan 1	Kontrol Negatif	.199	Tidak berbeda
	Kontrol Positif	.601	Tidak berbeda
	Perlakuan 2	.557	Tidak berbeda
	Perlakuan 3	.004	Berbeda
Perlakuan 2	Kontrol Negatif	.069	Tidak berbeda
	Kontrol Positif	.273	Tidak berbeda
	Perlakuan 1	.557	Tidak berbeda
	Perlakuan 3	.001	Berbeda
Perlakuan 3	Kontrol Negatif	.067	Tidak berbeda
	Kontrol Positif	.013	Berbeda
	Perlakuan 1	.004	Berbeda
	Perlakuan 2	.001	Berbeda

Hasil uji Post-Hoc menunjukkan perbedaan nilai kadar TGF-β1 organ hepar yang signifikan (p<0,05) antara kelompok P3 dengan kelompok K+, P1, dan P2. Hal tersebut mengindikasikan bahwa pemberian ekstrak daun metanol kosambi dosis 600 mg/kgBB peroral (P3) pada tikus model fibrosis hepar dapat menurunkan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

kadar TGF-β1 dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yang diinduksi CCl_4, dengan nilai 4,206 ± 0,75962 (p = 0,013). Sedangkan, antara kelompok kontrol positif dengan kontrol negatif tidak terdapat perbedaan nilai kadar TGF-β1 yang signifikan. Hal ini mengindikasikan bahwa induksi CCl_4 tidak memberikan efek yang bermakna dalam meningkatkan kadar TGF-β1.

5.2 Pembahasan

5.2.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kosambi (*Schleichera oleosa*) terhadap Kadar TGF-β1 Hepar

Penelitian ini meneliti terkait efek ekstrak daun kosambi sebagai terapi preventif fibrosis hepar yang berarti ekstrak daun kosambi diberikan pada tikus model fibrosis hepar bersamaan dengan induksi CCl_4. Karbon tetraklorida (CCl_4) merupakan hepatotoksin yang umum digunakan dalam menginduksi fibrosis hepar. Mekanisme fibrosis hepar akibat CCl_4 diawali dengan biotransformasi CCl_4 oleh enzim sitokrom P450 (CYP2E1) sehingga terbentuk radikal bebas triklorometil (CCl_3). CCl_3 akan mengalami oksidasi membentuk radikal triklorometil peroksil (CCl_3O_2) yang lebih reaktif. CCl_3 dan CCl_3O_2 menginduksi peroksidasi lipid pada membran fosfolipid yang menyebabkan permeabilitas membran rusak. Akibatnya, terjadi kerusakan sel, berupa apoptosis dan nekrosis hepatosit. Kerusakan jaringan akan menginduksi peradangan melalui aktivasi berbagai sitokin, salah satunya adalah TGF-β1.

TGF-β1 merupakan salah satu sitokin profibrogenik utama dalam proses fibrogenesis hepar dengan menginduksi transdifferensiasi fenotipik dari qHSC menjadi HSC teraktivasi (sel mirip miofibroblas). Induksi TGF-β1 terhadap HSC yang diaktifkan mengakibatkan aktivasi Stat3 dalam memodulasi produksi faktor

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

pertumbuhan jaringan ikat (CTGF) (Xu, et al., 2014). Pensinyalan TGF-β1 ditransduksi oleh TβRI dan TβRII dan mediator intraseluler yang dikenal sebagai Smads. TGF-β1 berikatan pada reseptornya TβRII dan TβRI, kemudian Smad2 dan Smad3 difosforilasi oleh TβRI. Smad2/3 terfosforilasi kemudian mentranslokasi ke dalam nukleus, mengikat faktor transkripsi dan mengatur ekspresi kolagen dan gen TIMP (Ma, et al., 2018; Hafez, et al., 2017)

Kadar TGF-β1 digunakan sebagai marker hepatotoksisitas. Hal ini didukung oleh beberapa studi yang menunjukkan peningkatan kadar TGF-β1 secara signifikan dengan pemberian CCl_4. Berdasarkan penelitian Hafez, et. al. (2017), pada pemberian CCl_4 dosis 3 ml/kg secara intraperitoneal (30% dalam minyak zaitun) dua kali seminggu selama 8 minggu, didapatkan peningkatkan ekspresi TGF-β, TβF-I, dan TβF-II secara signifikan masing-masing sebesar 7,6; 9,2; dan 7,3 kali lipat, dibandingkan dengan kontrol negatif ($p < 0,001$).

Pada penelitian kami, setelah 6 minggu induksi CCl_4 melalui injeksi intraperitoneal dengan interval pemberian setiap 3 hari sekali, tidak didapatkan peningkatan kadar TGF-β1 hepar yang signifikan pada kelompok kontrol positif dibandingkan kontrol negatif. Hal ini kemungkinan disebabkan karena beberapa faktor antara antara lain lama waktu induksi CCl_4 yang terlalu singkat dan ras tikus yang digunakan kurang sesuai. Pada beberapa penelitian, induksi CCl_4 membutuhkan waktu 9 minggu (Supriono, et al., 2018) atau 8 minggu (Hafez, et. al., 2017) sehingga dapat meningkatkan kadar TGF-β1. Oleh karena itu, induksi CCl_4 hanya dalam 6 minggu mungkin belum dapat menyebabkan fibrosis hepar. Kemungkinan juga karena jenis ras tikus yang digunakan untuk induksi fibrosis hepar kurang sesuai. Hal ini didasarkan pada sebuah studi oleh Gitiara, et.al. (2017)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

yang menyatakan bahwa induksi fibrosis dengan CCl_4 pada model tikus Sprague Dawley jauh lebih efektif dibandingkan dengan tikus Wistar.

Pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3, ketiganya diinduksi dengan CCl_4 setiap 3 hari sekali selama 6 minggu dan diberi terapi ekstrak metanol daun kosambi secara oral dengan dosis masing-masing perlakuan 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 600 mg/kgBB. Berdasarkan hasil *flow cytometry*, pada pemberian terapi ekstrak metanol daun kosambi dosis 600 mg/kgBB (P3) menunjukkan penurunan kadar TGF-β1 pada hepar. Ekstrak daun kosambi dapat menurunkan peradangan dan fibrosis hepar akibat CCl_4 kemungkinan dikarenakan penghambatan jalur pensinyalan TGF-β1/Smad dan ekspresi *connective tissue growth factor* (CTGF) (Yao et al., 2012; Liu et al., 2013). Penghambatan jalur pensinyalan TGF-β1/Smad ini diduga disebabkan karena adanya respons antiinflamasi dan antioksidan dari beberapa senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak daun kosambi yaitu flavonoid, saponin, quercetin, tanin, dan sesquiterpene.

Flavonoid dalam ekstrak kosambi merupakan antioksidan dengan mengurangi radikal bebas malondialdehida (MDA). Flavonoid juga bertindak sebagai *hydroxyl free radical scavengers* (*pyrogallol*) dalam struktur flavonoid cincin B. *Reactive oxygen species* (ROS) yang diproduksi dalam proses fagositosis pada penyembuhan luka dapat merusak sel. Metabolit ROS yang dihasilkan oleh neutrofil dan makrofag dapat menyebabkan reaksi inflamasi yang berakhir dengan kerusakan sel. Flavonoid diketahui menghambat pelepasan ROS dalam sel neutrofil, menghambat reaksi enzimatik dan non-enzimatik dari peroksidasi lipid dan secara aktif menghambat radikal bebas pada tahap inisiasi dan terminasi. Flavonoid dapat menghambat reaksi auto-oksidasi peroksidasi lipid pada tahap

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

terminasi (Yuslianti et al., 2016). Sebuah studi oleh Ma et al. (2018) menunjukkan bahwa kandungan flavonoid pada *Scabiosa comosa* dapat mengurangi fibrosis hepar yang diinduksi CCl_4 dengan secara selektif memblokir interaksi Smad3 dengan TβRI. Flavonoid secara selektif menghambat fosforilasi Smad3 yang diinduksi TGF-β1 dengan cara menghalangi interaksi TβRI dengan Smad3, sehingga jalur pensinyalan TGF-β1/Smad3 dapat dihalangi. Hal ini menyebabkan penurunan ekspresi kolagen yang merupakan komponen ECM, serta penurunan TIMP sehingga degradasi ECM oleh MMP dapat berlangsung.

Flavonoid dalam ekstrak daun kosambi juga dapat bertindak sebagai antiinflamasi dengan beberapa mekanisme. Pertama, menghalangi aktivasi komplemen yang menyebabkan adhesi sel-sel inflamasi menuju endothelium berkurang, sehingga respon inflamasi menurun (Prasmono, 2016). Kedua, penghambatan pada produksi nitrit oksida (NO) dan malondialdehida (MDA) sehingga menyebabkan penurunan konsentrasi mediator inflamasi utama seperti 5-hidroksi triptamin (5-HT) dan prostaglandin E2 (PGE2) (Bhatia, 2012; Santha, et al., 2017). Dengan menurunnya inflamasi dapat mengurangi radikal bebas sehingga dapat mencegah aktivasi sel kupffer dan stimulasi TGF-β, sehingga pembentukan ECM dapat dicegah.

Saponin dalam ekstrak daun kosambi efek antioksidan dengan membentuk hidrogen peroksida yang dapat menurunkan oksidan bebas dan mencegah kerusakan sel. Efek ini dapat menjaga integritas sel dengan mencegah kerusakan struktur membran dari pengaruh oksidan bebas lingkungan sekitar (Faradisa, 2008). Saponin mengandung gugus antioksidan yang terdapat pada atom C23 yang dapat mengacaukan superoksida melalui pembentukan intermediate hidroperoksida

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

(Prasmono, 2016). Dalam studi Zhang et al. (2014) menemukan bahwa kandungan saponin pada *Rhizoma panacis majoris* (SRPM) secara signifikan meningkatkan fungsi hati, tingkat antioksidan serum, menurunkan ekspresi mRNA α-SMA dan TIMP1, serta meningkatkan ekspresi mRNA MMP1. Hal ini menunjukkan bahwa saponin memberi efek hepatoprotektif yang menguntungkan pada fibrosis hepar, terutama dalam meningkatkan kapasitas antioksidan jaringan hati, mengurangi peroksidasi lipid pada membran hepatosit, yang kemudian mengurangi fibrosis hepar dan kematian sel hati. Diduga mekanisme yang mendasari penghambatan fibrosis hepar ini adalah melalui modulasi proses inflamasi dan stres oksidatif, mengatur TGF-β/Smad, FAK-PI3K-Akt-p70S6K dan jalur pensinyalan MAPK untuk menahan aktivasi HSCs dan mengurangi produksi ECM, sehingga fibrosis hepar dapat dicegah (Dong et al., 2015).

Kandungan quercetin dalam ekstrak daun kosambi juga memberi efek hepatoprotektif terhadap fibrosis hepar. Mekanisme efek ini mungkin terkait dengan aktivitas antioksidan, penurunan ekspresi TGF-1 dan CTGF, serta penurunan deposisi ECM (Li et al., 2013). Efek antioksidan ini bekerja dengan menyumbangkan hidrogen pada radikal bebas seperti ROS sehingga radikal bebas berubah menjadi bentuk yang lebih stabil dan menurunkan radikal bebas di lingkungan (Amijaya et al., 2013). Quercetin juga dapat meningkatkan ekspresi VEGF sehingga dapat menginduksi diferensiasi sel endotel pada jaringan yang mengalami injuri yang menyebabkan pengembalian HSC yang teraktivasi menjadi quiescence (inaktif) (Hasegawa et al., 2015).

Senyawa tanin yang terkandung dalam kosambi memiliki aktivitas antioksidan dengan kemampuan pembersihan radikal bebas (*radical scavenging*)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

yang menargetkan ROS maupun lipid peroksida sehingga mampu memutus rantai reaksi radikal bebas yang kemudian menurunkan konsentrasi oksidan bebas dan mencegah kerusakan jaringan (Bhatia et al., 2013). Tanin juga bertindak sebagai antiinflamasi yang dapat menurunkan konsentrasi senyawa *nitric oxide* (NO) yang diproduksi oleh nitrit oksida sintase yang merupakan *second messenger* selama proses inflamasi (Goswami & Singh, 2017). Dengan menurunnya inflamasi dapat mengurangi radikal bebas sehingga dapat mencegah aktivasi sel kupffer dan stimulasi TGF-β, sehingga pembentukan ECM dapat dicegah.

Sesquiterpene pada daun kosambi mampu mencegah sel dari apoptosis yang terinduksi oleh oksidan bebas melalui penghambatan aktivitas enzim degradasi DNA sel sehingga dapat terjadi regenerasi DNA yang rusak. Hal ini dapat menurunkan radikal bebas sehingga aktivasi sel kupffer dan stimulasi TGF-β dapat dicegah (Goswami & Singh, 2017). Alkaloid pada daun kosambi juga bertindak sebagai antioksidan dengan menurunkan konsentrasi oksidan bebas dengan mentransfer elektron pada orbit terluar dari molekul yang mengandung oksidan bebas sehingga membuat elektron stabil dan menghilangkan sifat oksidan bebas (Goswami & Singh, 2017). Ekstrak daun kosambi berperan secara signifikan mengurangi radikal bebas yang dihasilkan selama proses penyembuhan luka, terutama pada fase inflamasi dan fase proliferatif, sehingga dapat mengatasi kondisi stres oksidatif dari sel-sel peradangan dan mencegah stimulasi TGF-β1 akibat radikal bebas, yang kemudian dapat mencegah terbentuknya fibrosis hepar.

Kadar TGF-β1 hepar pada pemberian ekstrak kosambi dosis 200 mg/kgBB (P1) dan 400 mg/kgBB (P2) ditemukan lebih tinggi dibanding pemberian ekstrak kosambi dosis 600 mg/kgBB (P3). Peningkatan TGF-β1 ini diduga diperlukan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

untuk proses regenerasi dalam resolusi fibrosis hati. Terdapat beberapa fase dalam perjalanan penyakit hati kronis, yaitu inisiasi, *perpetuation*, dan resolusi. Bergantung pada stadium penyakit tertentu, TGF-β mungkin memiliki hasil yang bermanfaat, terutama pada fase inisiasi dan regenerasi (Supriono et al., 2018).

Pada fase inisiasi, TGF-β meningkatkan kerusakan hepatosit dan memicu transdiferensiasi HSC ke miofibroblas untuk memediasi respon penyembuhan luka. Penyembuhan jaringan hati yang rusak pada fase inisiasi terjadi ketika proses inflamasi tidak berlanjut dan berkepanjangan. Selama fase regenerasi dan proliferasi, TGF-β memiliki efek sitostatik pembatas massa jaringan yang penting dan mengendalikan peradangan dengan menghasilkan *TRegs*. TGF-β mengendalikan proliferasi hepatosit terutama dimediasi melalui β2-*spectrin* (β2SP). Sedangkan hasil yang merugikan dari TGF-β terjadi selama fase perpetuation dan fibrogenesis pada penyakit kronis karena terjadi reaksi penyembuhan luka dengan pembentukan bekas luka berlebihan yang berefek merugikan hepar (Dooley, et al., 2012).

Berdasarkan studi Yuslianti et al. (2016), TGF-β1 memiliki dua peran yang berlawanan untuk proses penyembuhan luka tergantung pada konsentrasi molekul yang dihasilkan. Peran TGF-β1 ini terkait dengan proses pensinyalan dalam aktivitas NADPH oksidase yang menghasilkan radikal bebas. Radikal bebas pada konsentrasi rendah berguna dalam pensinyalan untuk menarik leukosit, kemokin, dan sitokin pada fase inflamasi yang berperan penting dalam proses penyembuhan luka. Sedangkan radikal bebas pada konsentrasi tinggi dapat menyebabkan kerusakan sel yang menghambat proses penyembuhan luka.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa ekstrak kosambi dosis 3 dibandingkan dengan dosis 2 dan 1 merupakan dosis terbaik. Obat yang masuk ke dalam tubuh akan berikatan dengan reseptor di *site of action* sehingga menimbulkan efek terapetik. Timbulnya respon dipengaruhi oleh dosis atau konsentrasi yang biasa digambarkan dalam bentuk kurva. Prinsip ini dikenal sebagai *dose-response relationship*, yaitu ketika dosis obat meningkat, kemungkinan reseptor untuk mengikat molekul obat meningkat, sehingga efek obat harus meningkat secara proporsional (Paul, 2007). Pada dosis 3, dosis ekstrak lebih tinggi dibandingkan dosis 1 dan 2, oleh karena itu, jumlah ikatan reseptor dengan molekul obat meningkat, sehingga diperoleh respons obat yang lebih tinggi.

Terlepas dari pengaruh induksi CCl_4 maupun terapi dengan ekstrak daun kosambi, terjadinya peningkatan maupun penurunan TGF-β1 dalam penelitian ini dapat dipengaruhi beberapa faktor. Pertama adalah stress pada hewan coba dapat mempengaruhi sistem imun. Stress dapat memicu pelepasan hormon kortisol serta adrenalin dan noradrenalin pada postganglion simpatik terminal saraf di pembuluh darah dan organ limfoid. Efek sistemik dari glukokortikoid dan katekolamin akan mempengaruhi sitokin sehingga terjadi penurunan produksi sitokin sebagai respon imun seluler (Prasmono, 2016). Prosedur laboratorium rutin, seperti induksi CCL_4 dengan injeksi intraperitoneal setiap 3 hari serta pemberian ekstrak daun kosambi setiap hari selama 6 minggu menggunakan sonde, menyebabkan peningkatan stres pada hewan coba, sehingga mempengaruhi hasil pengujian sitokin inflamasi (Akhtar, 2015). Kedua, pengaruh dari infeksi parasit pada hepar tikus. Pada penelitian ini, setelah dilakukan pembedahan diketahui bahwa beberapa sampel organ hati tikus telah mengalami infeksi cacing yang mungkin terjadi karena

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

kondisi kandang yang kurang higienis. Infeksi cacing ini diduga menyebabkan inflamasi yang persisten yang dapat meningkatkan pelepasan sitokin. Hal ini sesuai dengan studi Marcos et al. 2011) yang menunjukkan adanya peningkatan kadar TGF-β secara signifikan pada kelompok tikus yang terinfeksi *Fasciola hepatica*.

5.2.2 Kajian Integrasi Islam

Allah SWT menciptakan berbagai macam makhluk hidup yang memiliki beragam manfaat kehidupan bagi manusia, salah satu makhluk ciptaan-Nya adalah tumbuh-tumbuhan. Sebagaimana firman Allah SWT dalam alquran surat Asy Syuara ayat 7-8:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ (٧)
إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَةً ۖ وَمَا كَانَ أَكْثَرُهُمْ مُؤْمِنِينَ (ٱلشُّعَرَاء: ٨)

> "*Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik? Sungguh, pada yang demikian itu terdapat tanda (kebesaran Allah), tetapi kebanyakan mereka tidak beriman*" (QS. Asy Syuara: 7-8) (Kemenag, 2020).

Menurut tafsir Al Qurthubi (2009), terdapat tiga kata pada QS. Asy Syuara ayat 7 yang perlu dicermati yaitu يَرَوْا yang berarti memperhatikan, زَوْجٍ berarti tumbuh-tumbuhan dan كَرِيم berarti baik dan mulia. Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT telah menumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang baik dan mulia di bumi ini, oleh karena itu manusia diperintahkan untuk senantiasa memperhatikannya. Tumbuh-tumbuhan yang baik dapat diartikan tumbuhan yang memiliki beragam manfaat di dalamnya (Al Qurthubi, 2009).

Salah satu jenis tumbuhan yang memiliki beragam manfaat dan potensi sebagai obat namun masih jarang diteliti adalah kosambi *(Schleichera oleosa).*

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Setiap bagian dari tumbuhan ini memiliki manfaat dalam mengobati berbagai penyakit. Daun kosambi bermanfaat sebagai obat koreng, eksem, penyakit kudis, radang telinga dan gatal-gatal (Suita, 2012). Ekstrak minyak biji kosambi digunakan untuk penyakit kulit, gatal, jerawat, luka bakar, rematik, dan menumbuhkan rambut. Kulit kayunya digunakan sebagai astringent, antipiretik, serta pengobatan malaria, disentri, dan ulserasi. Tanaman ini mampu mengobati bermacam-macam penyakit karena mengandung baragam metabolit sekunder yaitu flavonoid, alkaloid, *quercetin*, tanin, fenolik, saponin, dan *sesquiterpene* yang memiliki efek antioksidan, analgesik, antiinflamasi, antivirus, antimikroba, antispasmodik, dan antikanker (Tiwari & Pandey, 2016). Hal ini berkaitan dengan dalil hadis yang diriwayatkan Imam Muslim dari Jabir bin ‘Abdullah *radhiyallahu ‘anhu*, dari Rasulullah SAW yang menerangkan bahwa setiap penyakit ada obatnya.

حَدَّثَنَا هَارُونُ بْنُ مَعْرُوفٍ وَأَبُو الطَّاهِرِ وَأَحْمَدُ بْنُ عِيسَى قَالُوا حَدَّثَنَا ابْنُ وَهْبٍ أَخْبَرَنِي عَمْرٌو وَهُوَ ابْنُ الْحَارِثِ عَنْ عَبْدِ رَبِّهِ بْنِ سَعِيدٍ عَنْ أَبِي الزُّبَيْرِ عَنْ جَابِرٍ عَنْ رَسُولِ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ أَنَّهُ قَالَ لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ (رواه مسلم)

Telah menceritakan kepada kami Harun bin Ma'ruf dan Abu Ath Thahir serta Ahmad bin 'Isa mereka berkata; Telah menceritakan kepada kami Ibnu Wahb; Telah mengabarkan kepadaku 'Amru, yaitu Ibnu al-Harits dari 'Abdu Rabbih bin Sa'id dari Abu Az Zubair dari Jabir dari Rasulullah shallallahu 'alaihi wasallam, beliau bersabda: "Setiap penyakit ada obatnya. Apabila ditemukan obat yang tepat untuk suatu penyakit, akan sembuhlah penyakit itu dengan izin Allah 'azza wajalla." (HR Muslim) (Hafil, 2020).

Hadis tersebut menjelaskan bahwa ketika Allah memberikan suatu penyakit kepada hamba-Nya maka diturunkan pula obat yang bisa menyembuhkannya. Ini menunjukkan bahwa orang yang sakit dituntut untuk berusaha mencari pengobatan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

tersebut agar mendapat kesembuhan (Muttaqin, 2018). Dalam hal ini, Rasulullah menegaskan perlunya ilmu kedokteran mempelajari maupun mencari obat seperti dengan melakukan penelitian (al-Kaheel, 2012). Salah satu penyakit yang hingga saat ini masih belum ditemukan terapi yang efektif adalah fibrosis hepar. Oleh karena itu, kami melakukan penelitian terkait terapi preventif fibrosis hepar. Fibrosis hepar merupakan suatu proses inflamasi dan fibrogenik yang disebabkan penyakit hepar kronis yang ditandai akumulasi protein matriks ekstraseluler yang dapat berujung pada sirosis hepar.

Kesembuhan mutlak kehendak dan anugerah Allah semata, oleh karenanya perlu dipahami bahwa obat hanyalah sarana memperoleh kesembuhan dan bisa berbentuk apa saja. Obat medis, obat herbal, ramuan tradisional, dan lain sebagainya adalah sarana-sarana yang bisa dijadikan obat (Muttaqin, 2018). Terkait dalam pemanfaatan tumbuhan sebagai obat herbal, telah diterangkan dalam QS. Asy-Syuara ayat 7-8 bahwa penciptaan tumbuh-tumbuhan di muka bumi ini dimaksudkan agar manusia senantiasa ingat akan penciptannya melalui tanda-tanda keagungan dan kekuasaan Allah SWT (Kemenag, 2020). Manusia dituntut untuk berpikir agar dapat menemukan obat-obat yang dapat menyembuhkan penyakit-penyakit yang ada di bumi ini dengan mengamati tumbuhan dan mencari tahu akan manfaat yang dikandungnya. Oleh karena itu, pada penelitian ini, kami menguji khasiat ekstrak daun kosambi untuk pengobatan fibrosis hepar dikarenakan daun kosambi yang kaya akan kandungan bioaktif flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, quercetin, dan sesquiterpene yang memiliki efek antiinflamasi dan antioksidan yang diduga berperan dalam menghambat progresifitas fibrosis hepar.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa ekstrak daun kosambi memiliki potensi dalam mengobati fibrosis hepar yang dibuktikan secara kuantitatif dengan adanya penurunan kadar TGF-β1 pada pemberian terapi dosis 600 mg/kgBB (perlakuan 3) dibandingkan dengan kontrol positif. Selain itu, secara kualitatif dari gambaran makros organ hepar juga tidak dapatkan gambaran nekrosis pada organ hepar kelompok perlakuan 3 dibandingkan kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun kosambi mampu menghambat terjadinya fibrosis hepar. Namun, masih diperlukan penelitian-penelitian lebih lanjut untuk memperjelas hasil penelitian ini sebelum ekstrak daun kosambi dapat digunakan sebagai pengobatan alternatif oleh masyarakat.

Dengan adanya penelitian ini, diharapkan dapat memberikan sumbangsih terhadap kemajuan islam khususnya dalam perkembangan ilmu pengetahuan dan peningkatan taraf kesehatan umat muslim dengan menurunkan angka morbiditas dan mortalitas yang diakibatkan penyakit fibrosis hepar sehingga angka harapan hidup dapat meningkat. Dengan tubuh yang sehat dan angka harapan hidup meningkat, maka dapat menambah waktu, produktifitas, maupun kekhusukan dalam beribadah bagi umat muslim. Selain itu, penelitian ini diharap mampu membantu perekonomian umat muslim dengan peningkatan pendapatan pada industri agrikultur melalui pemanfaatan daun kosambi sebagai obat fibrosis hepar maupun dengan memudahkan masyarakat dalam memperoleh obat fibrosis hepar dengan harga terjangkau.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB VI
KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian pengaruh pemberian ekstrak daun kosambi terhadap kadar TGF-β1 pada tikus model fibrosis hepar, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Induksi CCl_4 pada kelompok kontrol positif tidak dapat meningkatkan kadar TGF-β1 hepar secara signifikan dibandingkan kontrol negatif
2. Pemberian ekstrak daun kosambi secara oral mampu menurunkan kadar TGF-β1 pada tikus model fibrosis hepar
3. Dosis yang dapat menurunkan kadar TGF-β1 di hepar adalah 600 mg/kgBB.

6.2 Saran

Saran yang dapat diberikan terkait penelitian ini untuk di masa mendatang adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis optimal ekstrak daun kosambi pada tikus model fibrosis hepar
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui toksisitas ekstrak daun kosambi
3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan terkait efek ekstrak daun kosambi sebagai terapi kuratif fibrosis hepar yang berarti ekstrak daun kosambi diberikan pada tikus model fibrosis hepar setelah diinduksi CCl_4
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan waktu perlakuan yang lebih lama

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

5. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui profil farmakokinetik dan farmakodinamik ekstrak daun kosambi
6. Untuk penelitian selanjutnya terkait induksi fibrosis hepar tidak dianjurkan untuk menggunakan CCl_4 selama 6 minggu
7. Untuk penelitian selanjutnya yang menggunakan hewan coba tikus dianjurkan untuk lebih menjaga higienitas kendang dengan lebih rutin membersihkan kandangan minimal seminggu 3 kali

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR PUSTAKA

Al-Qur'an dan Terjemahnya. 2008. Surabaya: Agung Media Surabaya.

Al-Qurthubi, Syaikh Imam. 2009. *Tafsir Al Qurthubi*. Jakarta Selatan: Pustaka Azzam.

Al-Kaheel, Abdel Daem. 2012. *Rahasia Medis dalam Al-Qur'an dan Hadis Operasi tanpa Luka*. Jakarta: Amzah.

Altamirano-Barrera A., Barranco-Fragoso B., Mendez-Sánchez, N. 2017. Liver Fibrosis Treatment. *Annals of Hepatology*, 6: 48-56.

Amijaya A.P.P., Murwani S., Wardhana A.W. 2012. *Efek Ekstrak Air Daun Kelor (Moringa Oleifera) Terhadap Kadar* Tumor Necrosis Factor Alpha *(TNF-α) dan Gambaran Histopatologi Sel Endotel Arteri Coronaria pada Tikus Putih (Rattus Norvegicus) yang Diberi Diet Aterogenik.* Tesis. Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Universitas Brawijaya.

Anuragi, J.L., Mishra, R. 2017. Ethnomedicinal study of Schleichera oleosa among the tribals of Satna (M.P.). *International Journal of Applied Research,* 3(3): 672-674.

Barrett, Kim E. 2012. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Ganong*. Edisi 24. Jakarta: EGC Medical.

Bemion, D. dan Arthur, M.J.P. 2001. Extracelluler Matrix Degradation and The Role of Stellate Cells. *Semin Liv Dis,* 21: 373-84.

Betts J. G., DeSaix P., Johnson E., Johnson J. E., Korol O., Kruse D. H., et al. 2013. *Anatomy & Physiology.* Texas: Openstax College.

Bhatia, H., Kaur, J., Nandi, S., Gurnani, V., Chowdhury, A., Reddy, P.H., et al. 2013. A review on Schleichera oleosa: Pharmacological and Environmental Aspects. *Journal of Pharmacy Research,* 6: 224–229.

Centers for Disease Control and Prevention. 2017. *Summary Health Statistics Tables for U.S. Adults: National Health Interview Survey*. (https://ftp.cdc.gov/pub/Health_Statistics/NCHS/NHIS/SHS/2017_SHS_Table_A-4.pdf. May 2019)

Cheng, J.Y.K., Wong, G.L.H. 2017. Advances in the diagnosis and treatment of liver fibrosis. *Hepatology Research,* 3: 156-169.

Civan, J.M. 2018. *Fibrosis of The Liver*. (www.msdmanuals.com/home/liver-and-gallbladder-disorders/fibrosis-and-cirrhosis-of-the-liver/fibrosis-of-the-liver#v11555897 November 2019).

Cox-North, P.P., Shuhart, M.C. 2018. *Evaluation and Staging of Liver Fibrosis.* (https://www.hepatitisc.uw.edu/go/evaluation-staging-monitoring/evaluation-staging/core-concept/all#citations Oktober 2019).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Dalimarta, S. 2002. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Edisi 2. Jakarta: Trubus Agriwidya.

Dang, S.S. 2007. Inhibitory effects of saikosaponin-d on CCl $_4$-induced hepatic fibrogenesis in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 13: 557-563.

Dean, J.R. 1998. *Extraction Methods for Environmental Analysis*. UK: John Wiley dan Sons LTD.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2011. *Pedoman Pengendalian Tikus.* Jakarta: Depkes RI.

Dhingra, S., Ward, S. C., Thung, S. N. 2016. Liver Pathology of Hepatitis C, Beyond Grading and Staging of the Disease. *WJG*, 22(4): 1357–1366.

Dooley, S dan ten Dijke, P. 2012. TGF-β in the Progression of Liver Disease. *Cell Tissue Res*., 347: 245-56.

Drabsch, Y dan ten Dijke, P. 2012. TGF-β Signalling and its Role in Cancer Progression and Metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 31: 553-568.

Eroschenko, V.P. *2010. Atlas Histology diFiore dengan Korelasi Fungsional.* Jakarta: EGC.

Euis, R.Y., Bachtiar B.M., Suniarti D.F., Sutjiatmo, A.B, Mozef, T. 2016. Effect of Rambutan-honey and its Flavonoid on TGF-β1 Induce Fibroplasia Oral Wound Healing. *Research Journal of Medicinal Plants*, 10: 435-442.

Fabregat, I., Moreno-Càceres, J., Sánchez, A., Dooley, S., Dewidar, B., Giannelli, G., et al. 2016. TGF-β Signalling and Liver Disease. *FEBS J*, 283: 2219–2232.

Fawcett, D.W. 2002. *Buku Ajar Histologi*. Edisi 12. Jakarta: EGC.

Fortea J. *2018.* Comparison of Two Protocols of Carbon Tetrachloride-Induced Cirrhosis in Rats Improving Yield and Reproducibility. *Scientific Reports*, 8: 9163-9176.

Ghozali, I. 2005. *Aplikasi Analisis Multivariate dengan Program SPSS*. Edisi 3. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro.

Gitiara A., Tokhanbigli S., Mazhari S., Baghaei K., Hatami B., Hashemi S.M., et al. 2017. Development of experimental fibrotic liver diseases animal model by Carbon Tetracholoride. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 10(1): 122-128.

Goswami S., Singh R.P. 2017. Ayurvedic, Phytochemical and Pharmacological Review of *Schleichera Oleosa* (Lour.) Oken: A Traditional Plant with Enormous Biological Activity. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 6(10): 295-309.

Goswami S, Singh RP. 2018. In Vitro Assessment of Anthelmintic and Alpha-Amylase Inhibition of Schleichera Oleosa (Lour.) Oken Leaf Extracts. *Asian J Pharm Clin Res*, 11(9): 487-491.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Guyton, A. C., Hall, J. E. 2014. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 12. Jakarta: EGC.

Hafez, M.M., Hamed S.S., El-Khadragy, M.F., Hassan, Z.K., Al Rejaie, S.S., Sayed-Ahmed, M.M., et al. 2017. Effect of Ginseng Extract on the TGF-β1 Signaling Pathway in CCl4-Induced Liver Fibrosis in Rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17: 45-56.

Hafil, M. 2020. *Ulama Jelaskan Hadist Nabi Soal Setiap Penyakit Ada Obatnya.* (republika.co.id/berita/q7ixaj430/ulama-jelaskan-hadist-nabi-soal-setiap-penyakit-ada-obatnya Mei 2020).

Hasegawa, D., Wallace, M.C., Friedman, S.L. 2015. Stellate Cells and Hepatic Fibrosis. *Stellate Cells in Health and Disease*, 4: 41–62.

Kementerian Agama RI. 2020. Tafsir Quran Surat Asy Syuara Ayat 7-8. (https://quran.kemenag.go.id/index.php/sura/26 Mei 2020).

Kementerian Kesehatan RI. 2007. *Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia*, Nomor 381/MENKES/SK/III/2007, Tentang Kebijakan Obat Tradisional (http://www.litbang.depkes.go.id/download/regulasi/KMK_381_2007_OBAT_TRADISIONAL.pdf Mei 2019).

Kementerian Kesehatan RI. 2016. *Sebagian Besar Kematian Akibat Hepatitis Virus Berhubungan Dengan Hepatitis B dan C Kronis*. (http://www.depkes.go.id/article/print/16042700001/sebagian-besar-kematian-akibat-hepatitis-virus-berhubungan-dengan-hepatitis-b-dan-c-kronis.html Maret 2019).

Kemp, W.L., Burns, D.K., Brown, T.G. 2008. *Pathology: The Big Picture.* New York: McGraw Hill.

Khalaf, A.A., Mekawy, M.E., Moawad, M.S. and Ahmed, A.M. 2009. Comparative Study on the Protective Effects of Some Antioxidants Againts CCl_4 Hepatotoxicity in Rats. *Egyptian Journal of Natural Toxins*, 6(1): 59-82.

Koyama, Y., Brenner, D.A. 2017. Liver Inflammation and Fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 127: 55–64.

Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. 2009. *Robbins and Cotran: Dasar Patologi Penyakit*. Edisi 7. Jakarta: EGC.

Kumar, V., Abbas, A.K., Aster JC. 2015. *Buku Ajar Patologi Robbins*. Edisi 9. Singapura: Elsevier Saunders.

Lee, M., Yun, S., Lee, H., Yang, J. 2017. Quercetin Mitigates Inflammatory Responses Induced by Vascular Endothelial Growth Factor in Mouse Retinal Photoreceptor Cells through Suppression of Nuclear Factor Kappa B. *IJMS*, 18: 2497.

Lewandowski, K. dan Hellmann, A. 2006. *Atlas of Limfopoiesis*. Poland: Gdansk.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Li, S., X. Li, H. Zheng, B. Xie, K.R. Bidasee and G.J. Rozanski. 2008. Pro-oxidant effect of transforming growth factor-β1 mediates contractile dysfunction in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc*. *Res*., 77: 107-117.

Liu, Y., Liu, H., Meyer, C., Li, J., Nadalin, S., Koenigsrainer, A., et al. 2013. TGF-β Mediated Connective Tissue Growth Factor (CTGF) Expression in Hepatic Stellate Cells Requires Stat3 Activation. *J Biol Chem*., 288: 30708-19.

Liver Foundation. 2017. *The progression of liver disease*. (liverfoundation.org/for-patients/about-the-liver/the-progression-of-liver-disease/ November 2019).

Lovena, A., Miro, S., Efrida. 2017. Karakteristik Pasien Sirosis Hepatis di RSUP Dr. M. Djamil Padang. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 6(1): 5-12.

Ma, Y., Yuan, H., Jin, R., Bao, X., Wang, H., Su, X., et al. 2018. Flavonoid-rich Scabiosa Comosa Inflorescence Extract Attenuates CCl_4-Induced Hepatic Fibrosis by Modulating TGF-β-Induced Smad3 Phosphorylation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106: 426–433.

Maulina, Meutia. 2018. *Zat-Zat yang Mempengaruhi Histopatologi Hepar*. Lhokseumawe: Unimalpress.

Mescher, A.L. 2012. *Histologi Dasar Junqueira Teks dan Atlas*. Edisi 11. Jakarta: EGC.

Mills, Simon. 1996. *Pengobatan Alternatif (Alternative in Healing)*. Jakarta: Dian Rakyat.

Moslen, MT. 2001. *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. Edisi ke-6. New York: McGraw Hill.

Muriel, P. 2017. The Liver. *Liver Pathophysiology*. Elsevier, p. 3–22.

Muthukrishnan, S., 2017. Pharmacognostical investigation, phytochemical studies of Schleichera oleosa (lour) oken leaves. *Int. J. Res. Pharm. Sci.*, 8(2): 109-119.

Muttaqin, Y. 2018. *Berobat dalam Pandangan Islam*. (https://islam.nu.or.id/post/read/85544/berobat-dalam-pandangan-islam April 2020).

National Intitute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases 2018. *Symptoms & causes of cirrhosis*. (niddk.nih.gov/health-information/liver-disease/cirrhosis/symptoms-causes November 2019).

Nawawi. 2010. *Al-Majmû' Syrahul Muhadzdzab*. Kairo: Darul Hadis.

Ormerod, M.G. 2008. *Flow cytometry: A Basic Introduction*. (https://flowbook.denovosoftware.com/chapter-4-data-analysis Mei 2020).

Panjaitan, R.G.P., Handharyani, E., Chairul, M., Zakiah, Z., dan Manalu, W. 2007. Pengaruh Pemberian Karbon Tetraklorida Terhadap Fungsi Hati dan Ginjal Tikus. *Makara Kesehatan*, 11(1), 11-16.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Parsons C.J., Bradford B.U., Pan C.Q., Cheung E., Schauer M., Knorr A., Krebs B. 2004. Antifibrotic Effects of a Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Antibody on Established Liver Fibrosis in Rats. *Hepatology*, 40: 1106-1113.

Poynard T, Lebray P, Ingiliz P. 2010. Prevalence of Liver Fibrosis and Risk Factors in a General Population Using Non-Invasive Biomarkers (FibroTest). *BMC Gastroenterol*, 10: 40-52.

Prasmono, D.N.I.M. 2016. *Studi Efikasi Ekstrak Buah Mahkota Dewa (Phaleria Macrocarpa) Terhadap Produksi TNF-α & TGF-β pada Mencit (Mus Musculus) Glomerulonefritis Akut Hipersensitif Tipe III Induksi Streptokinase*. Skripsi. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya, Malang.

Price, S.A., Wilson, L.M. 2012. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses Penyakit*. Edisi 6. Jakarta: EGC.

Roeb, E. 2018. Matrix Metalloproteinases and Liver Fibrosis (Translational Aspects). *Matrix Biology*, 68: 463–473.

Santha, M.L., Kanchana, P., Shakeela, S. 2017. Anti-inflammatory and Anti-arthritic Activity of Scheilchera oleosa (Lour.) Oken Bark. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*., 46(1): 79-84.

Seki, E., Schwabe, R.F. 2015. Hepatic Inflammation and Fibrosis: Functional Links and Key Pathways. *Hepatology*, 61: 1066–1079.

Shihab, Quraish. 2002. *Tafsir Al-Mishbah.* Jakarta: Lentera Hati.

Shipley, C.L., Axley, P.D., Singal, A.K. 2019. Liver Fibrosis: A Clinical Update. *EMJ Hepatol*, 7(1): 105-117.

Sibernagl, S. dan Lang, F. 2014. *Teks dan Atlas Berwana Patofisiologi*. Jakarta: EGC.

Situmeang, B, Nuraeni, W., Ibrahim A.M., Silaban, S. 2016. Analysis of Secondary Metabolite Compounds from Leaves Extract Kesambi (*Schleichera Oleosa*) And Antioxidant Activity Test. *Jurnal Pendidikan Kimia*, 8(3): 164-168.

Snell, R.S. 2012. *Anatomi Klinis Berdasarkan Sistem*. Jakarta: EGC.

Suita, E. 2012. *Seri Teknologi Pembenihan Tanaman Hutan Kesambi* (*Schleicera oleosa*). Bogor: Balai Penelitian Teknologi Perbenihan Tanaman Hutan.

Supriono, S., Nugraheni, A., Kalim, H., Eko, M.H. 2019. The Effect of Curcumin on Regression of Liver Fibrosis through Decreased Expression of Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1). *Indones Biomed* J, 11: 52–8.

Thenappan, A, Li, Y., Kitisin, K., Rashid, A., Shetty, K., Johnson, L., et al. 2010. Role of Transforming Growth Factor β Signaling and Expansion of Progenitor Cells in Regenerating Liver. *Hepatology*, 51: 1373-82.

Thind, T.S., Geetanjali, R., Satyam, K., Saxena, A.K., Saroj, A. 2011. In vitro Antiradical Properties and Total Phenolic Contents in Methanol

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Extract/Fractions from Bark of Schleichera Oleosa (Lour.) Oken. *Med Chem Research*, 20: 254-260.

Tiwari, N., Pandey, V.N. 2016. Ethnobotanical and Phytochemical Analysis of Schleichera Oleosa (Lour.) Oken. *Trends in Life Sciences*, 5(2): 2319–5037.

Troeger JS, Mederacke I, Gwak GY, Salazar A, Bueno M, Garcia J, Vera J, et al. 2012. Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology*, 143: 1073.

Tsuchida, T., Friedman, S.L., 2017. Mechanisms of Hepatic Stellate Cell Activation. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14: 397.

Waugh, A., Grant, A. 2011. *Dasar-Dasar Anatomi dan Fisiologi*. Jakarta: Salemba Medika.

Weiskirchen, R., Tacke, F., 2016. Liver fibrosis: Which mechanisms matter?. *Clinical Liver Disease*, 8: 94–99.

Weiskirchen, R., Weiskirchen, S., Tacke, F. 2018. Recent Advances in Understanding Liver Fibrosis: Bridging Basic Science and Individualized Treatment Concepts. *F1000Res*, 7: 921.

WHO. 2004. *Carbon Monoxide Environmental Health Criteria*. Edisi 2. Geneva: World Health Organization.

WHO. 2008. *The Global Burden of Disease 2004*. (http://www.who.int Mei 2019).

Xu, M.Y., Hu, J.J., Shen, J., Wang, M.L., Zhang, Q.Q., Qu, Y., et al. 2014. Stat3 Signaling Activation Crosslinking of TGF-β1 in Hepatic Stellate Cell Exacerbates Liver Injury and Fibrosis. *Biochim Biophys Acta*, 1842: 2237-45.

Xu, F., Liu, C., Zhou, D., Zhang, L. 2016. TGF-β/SMAD Pathway and Its Regulation in Hepatic Fibrosis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 64: 157–167.

Yao, Q.Y., Xu, B.L., Wang, J.Y., Liu, H.C., Zhang, S.C., Tu, C.T. 2012. Inhibition by Curcumin of Multiple Sites of the TGF-β1 Signaling Pathway Ameliorates the Progression of Liver Fibrosis Induced by Carbon Tetrachloride in Rats. *BMC Complement Altern Med*. 12: 156.

Zhang, C.Y., Yuan, W.G., He, P., Lei, J.H., Wang, C.X. 2016. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *World Journal of Gastroenterology*, 22(48): 10512-10522.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 1. Perhitungan Dosis CCl_4

Satu ekor tikus membutuhkan 0,5 µl/grBB CCl_4. Apabila rata-rata berat badan tikus 170 gram, maka kebutuhan CCl_4 dapat dihitung sebagai berikut:

Kebutuhan CCl_4 = 0,5 µl/grBB

= 0,5 µl x 170 gr

= 85 µl = 0,085 ml

Kemudian, CCl_4 diambil menggunakan *micropipete* untuk kemudian dilarutkan dalam minyak zaitun dengan perbandingan 1 : 4.

CCl_4 : minyak zaitun = 1 : 4

= 85 µl : 340 µl = 0,085 ml : 0,34 ml

Sehingga didapatkan total larutan yang akan digunakan per ekor tikus adalah 0,425 ml.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 2. Perhitungan Dosis Ekstrak Daun Kosambi

a. Dosis Stok Volume Sonde

- Dosis Stok Volume Sonde Semua Kelompok = volume sonde (ml) x jumlah tikus semua kelompok perlakuan (ekor) x lama pemberian (hari) = 1 ml x 18 ekor x 42 hari = 756 ml

  Jadi, total stok untuk menyonde semua kelompok perlakuan selama 42 hari adalah 756 ml.

- Dosis Stok Volume Sonde Setiap Kelompok = volume sonde (ml) x jumlah tikus per kelompok (ekor) x lama pemberian (hari) = 1 ml x 6 ekor x 42 hari = 252 ml

b. Dosis Perlakuan Ekstrak Daun Kosambi *(Schleichera oleosa)*

- Dosis I : 200 mg/kgBB = 0,2 mg/grBB per hari = 0,0002 gr/grBB
- Dosis 2 : 400 mg/kgBB = 0,4 mg/grBB per hari = 0,0004 gr/grBB
- Dosis 3 : 600 mg/kgBB = 0,6 mg/grBB per hari = 0,0006 gr/grBB

c. Perhitungan Ekstrak Daun Kosambi *(Schleichera oleosa)* Tiap Dosis Perlakuan (Selama 42 hari)

- Dosis 1 : 0,0002 gr / 1 ml = x gr / 252 ml

  x = 0,0504 gr

- Dosis 2 : 0,0004 gr / 1 ml = x gr / 252 ml

  x = 0,1008 gr

- Dosis 3 : 0,0006 gr / 1 ml = x gr / 252 ml

  x = 0,1512 gr

Total kebutuhan ekstrak = 0,0504gr + 0,1008gr + 0,1512gr

= 0,3024 gr

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Jadi stok dosis yang diperlukan selama 42 hari yaitu 0,3024 gr.

d. Perhitungan Stok Larutan Ekstrak Daun Kosambi *(Schleichera oleosa)*

1. Dosis 3 = 0,3024 gr x 1 ml = 0,0006 gr x k ml

   k = 504 ml

   Sebanyak 0,3024 gram ekstrak daun kosambi dilarutkan menggunakan Na-CMC sampai volumenya menjadi 504 ml. Lalu diambil sebanyak 252 ml sebagai stok dosis 3 untuk sonde selama 6 minggu (42 hari). Sisa stok, yaitu 252 ml, akan diencerkan dan dipakai untuk perhitungan dosis berikutnya.

2. Dosis 2 = 0,0006 gr x 252 ml = 0,0004 gr x k ml

   k = 378 ml

   Sisa larutan dari dosis 3, sebanyak 252 ml, diencerkan menggunakan Na-CMC sampai volumenya menjadi 378 ml. Kemudian diambil 252 ml sebagai stok ekstrak dosis 2 untuk 6 minggu (42 hari). Sisa stok sebanyak 126 ml.

3. Dosis 1 = 0,0004 gr x 126 ml = 0,0002 gr x k ml

   k = 252 ml

   Sisa larutan dari dosis 2, yaitu sebanyak 126 ml, diencerkan dengan Na-CMC sampai volumenya menjadi 252 ml. Kemudian diambil 252 ml sebagai stok dosis 1. Sehingga larutan stok tersisa 0 ml.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 3. Keterangan Determinasi Kosambi (*Schleichera oleosa*)

PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL MATERIA MEDICA BATU
Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/ 753A / 102.7 /2018
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Kesambi**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : dr. TIAS PRAMESTI G.
NIM : 1981 051 820 11 01 2011
Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG

1. Perihal determinasi tanaman kesambi
   - Kerajaan : Plantae
   - Divisi : Magnoliophyta
   - Kelas : Magnoliopsida
   - Ordo : Sapindales
   - Famili : Sapindaceae
   - Genus : Schleichera
   - Spesies : *Schleichera oleosa* (Lour.) Oken
   - Sinonim : *Schleichera oleosa* Merr. = *Schleichera trijuga* Willd.
   - Nama Daerah : Kusambi (Melayu); Kasambi (Sunda); Kesambi (Jawa); Khosambi (Madura); Kesambi (Bali); Sambi (Bima); Komi (Sumba).
   - Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15b-197b-208b-219b-220a-221b-222a-1b-5b-6.
2. Morfologi : Habitus: Pohon, tinggi ± 25 m. Batang: Tegak, bulat, berkayu, permukaan kasar, percabangan simpodial, coklat kotor. Daun: Tunggal, lanset, berseling, panjang 11-25 cm, lebar 2-6 cm, tepi rata, ujung lancip, pertulangan menyirip, tangkai bulat, panjang ± 1 cm, hijau. Bunga: Majemuk, bentuk tandan, di ketiak daun atau ujung batang, kelopak 4-6 lembar, bersatu di pangkal, berduri, hijau, mahkota putih. Buah: Bulat, coklat kehitaman. Biji: Bulat, coklat. Akar: Tunggang, coklat muda.
3. Kandungan Kimia : Daun mengandung saponin, tanin, dan alkaloid.
4. Nama Simplisia : Schleicherae oleosae folium / daun kesambi.
5. Penggunaan : Penelitian.
6. Daftar Pustaka
   - Syamsuhidayat, S.S. dan Hutapea, J.R. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.
   - Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

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

Batu, 30 Desember 2019
An. Kepala UPT Lab. Herbal Materia Medica Batu
Kepala Seksi Pelayanan Laboratorium Herbal,

Fitria Rahmawati, S.Farm., Apt.
NIP. 19900430 201403 2 002

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 4. Ethical Clearance

FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
Gedung Klinik UMMI lt 2
Jalan Gajayana No. 50, Dinoyo, Kec Lowokwaru, Kota Malang
E-mail: kepk.fkik@uin-malang.ac.id - Website : http://www.kepk.fkik.uin-malang.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
(ETHICAL CLEARANCE)
No. 015/EC/KEPK-FKIK/2020

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG TELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN :

Judul	Efek Ekstrak Metanol Daun Kesambi *(Schleihera Oleosa)* Terhadap Histopatologi Hepar, Kadar Transforming Growth Factor-β (TGF β) Hepar, dan Apoptosis Sel Epitel Mukosa Usus HalusPada Tikus Model Fibrosis Hepar
Sub Judul	Efek Ekstrak Metanol Daun Kesambi *(Schleihera Oleosa)* Terhadap Histopatologi Hepar, Kadar Transforming Growth Factor-β (TGF β) Hepar, dan Apoptosis Sel Epitel Mukosa Usus HalusPada Tikus Model Fibrosis Hepar
Peneliti	- dr. Tias Pramesti Griana, M.Biomed - Kholifah Holil, M.,Si - Vicky Andrean - Aathifah - Mohammad Reza Riandinata
Unit / Lembaga	Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Tempat Penelitian	Laboratorium Hewan Coba FKIK UIN Malang, Laboratorium Fitokima Farmasi FKIK UIN Malang, Laboratorium Histologi FKIK UIN Malang, Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya

DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN TERSEBUT TELAH MEMENUHI SYARAT ATAU LAIK ETIK.

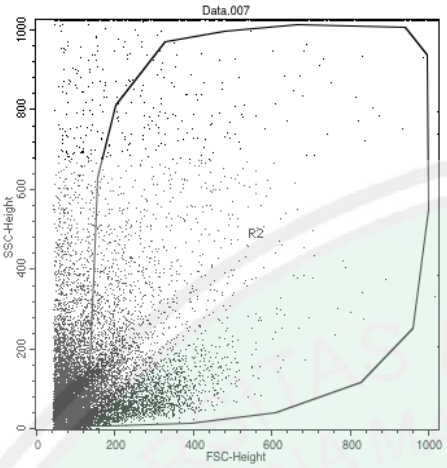
Mengetahui Dekan FKIK-UIN Maulana Malik Ibrahim Malang	Malang, 21 JAN 2020 Ketua
Prof. Dr.dr. Bambang Pardjianto,SpB. SpBP-RE(K) NIP. 20161201 [illegible]	dr. Avin Ainur F, MBiomed NIP. 19800203200912 2 002

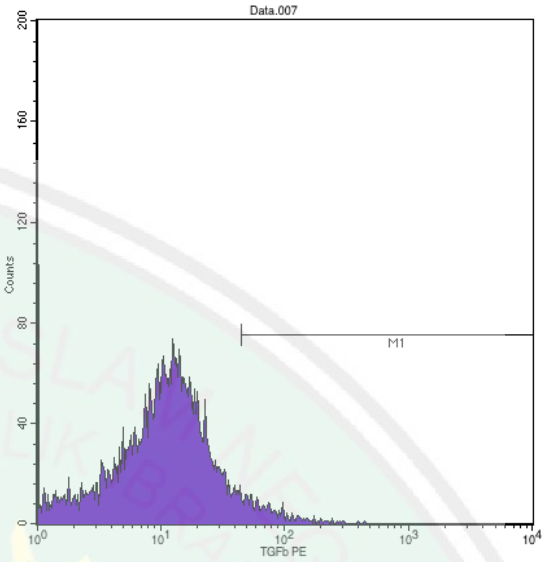
Keterangan :
- Keterangan Laik Etik Ini berlaku 1 (satu) tahun sejak tanggal dikeluarkan.
- Pada akhir penelitian, laporan Pelaksanaan Penelitian harus diserahkan kepada KEPK-FKIK dalam bentuk *soft copy*.
- Apabila ada perubahan protokol dan/atau Perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 5. Hasil Pengukuran *Flow Cytometry* TGF-β1

Kontrol (-) 1





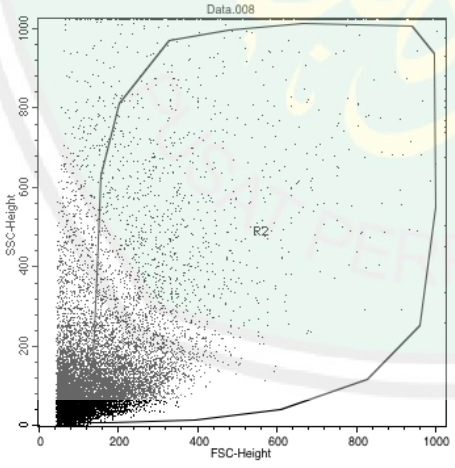
Histogram Statistics

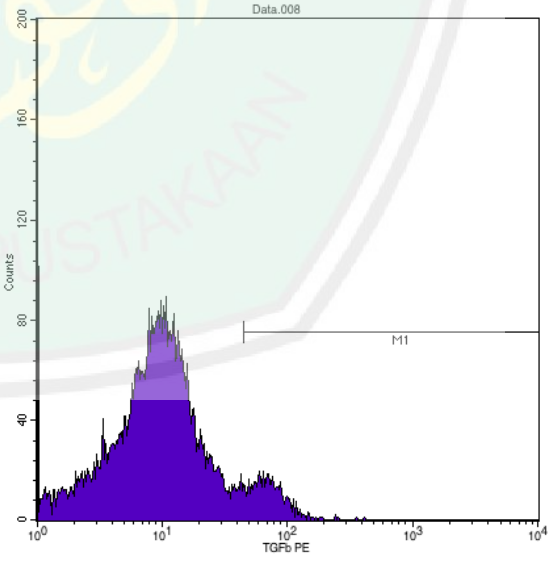
File: Data.007
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 11328
X Parameter: TGFb PE (Log)

Sample ID: kont-.1 - hpr
Gate: G2
Total Events: 28545

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	11328	100.00	39.68
M1	45, 9910	524	4.63	1.84

Kontrol (-) 2





Histogram Statistics

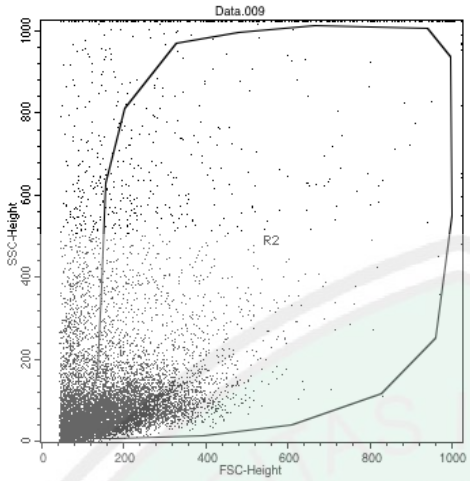
File: Data.008
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 13927
X Parameter: TGFb PE (Log)

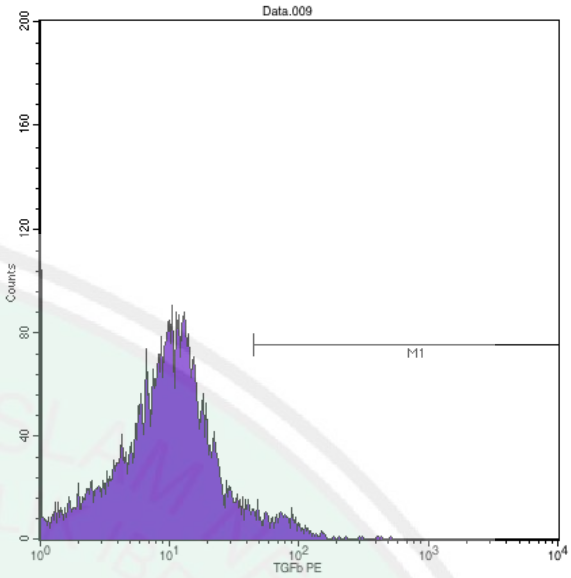
Sample ID: kont-.2 - hpr
Gate: G2
Total Events: 29295

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	13927	100.00	47.54
M1	45, 9910	1054	7.57	3.60

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Kontrol (-) 3





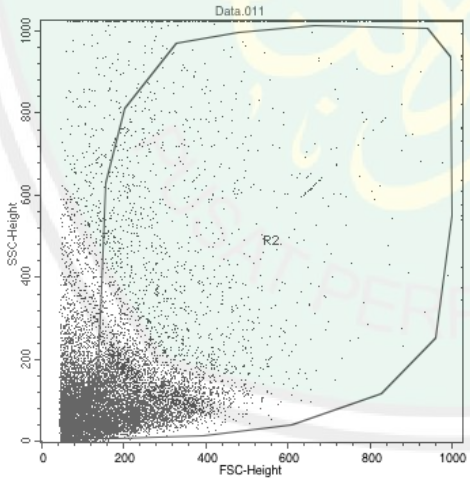
Histogram Statistics

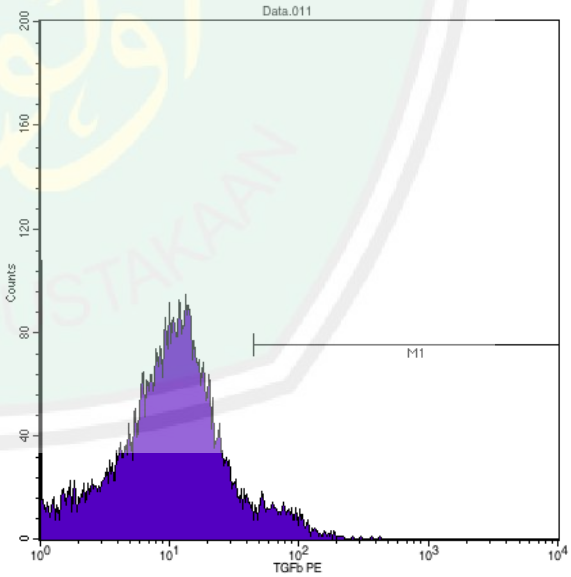
File: Data.009
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 13732
X Parameter: TGFb PE (Log)

Sample ID: kont-.3 - hpr
Gate: G2
Total Events: 21975

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	13732	100.00	62.49
M1	45, 9910	611	4.45	2.78

Kontrol (-) 4





Histogram Statistics

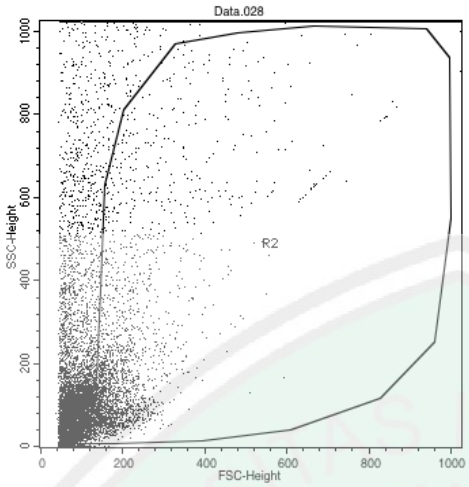
File: Data.011
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 16283
X Parameter: TGFb PE (Log)

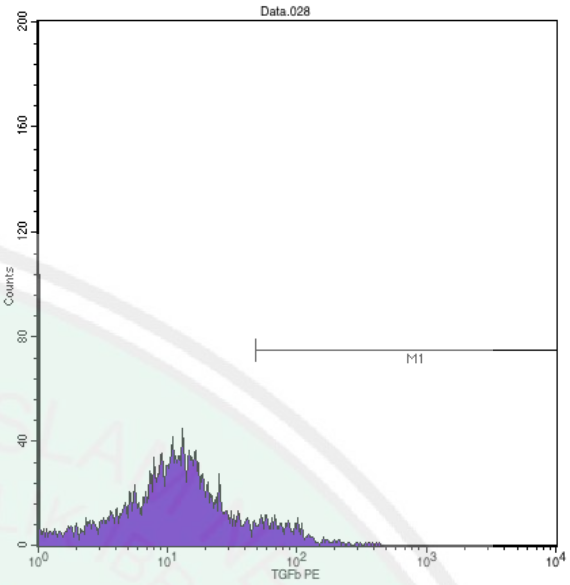
Sample ID: kont-.5 - hpr
Gate: G2
Total Events: 31170

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	16283	100.00	52.24
M1	45, 9910	946	5.81	3.03

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Kontrol (-) 5





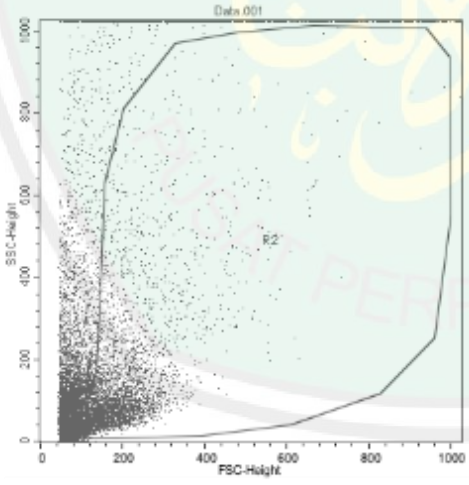
Histogram Statistics

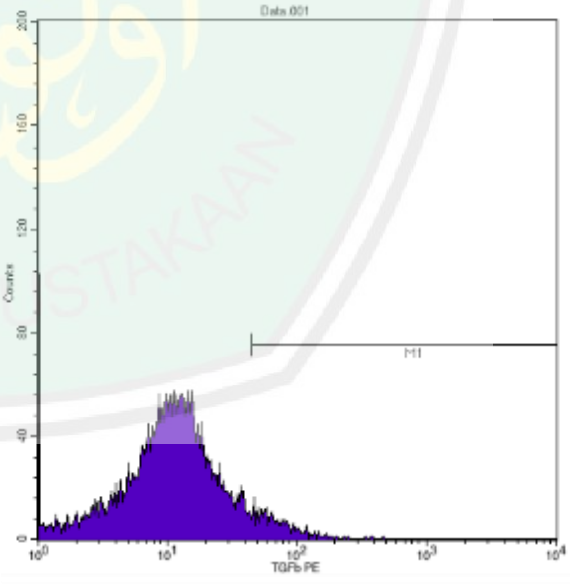
File: Data.028
Acquisition Date: 23-Mar-20
Gated Events: 6313
X Parameter: TGFb PE (Log)

Sample ID: kont-.6 - hpr
Gate: G2
Total Events: 28140

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	6313	100.00	22.43
M1	48, 9910	583	9.23	2.07

Kontrol (+) 1





Histogram Statistics

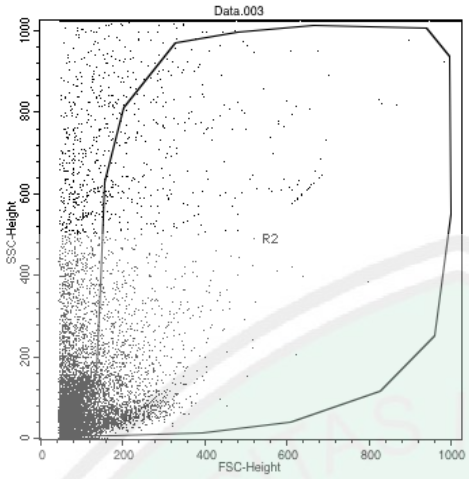
File: Data.001
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 9294
X Parameter: TGFb PE (Log)

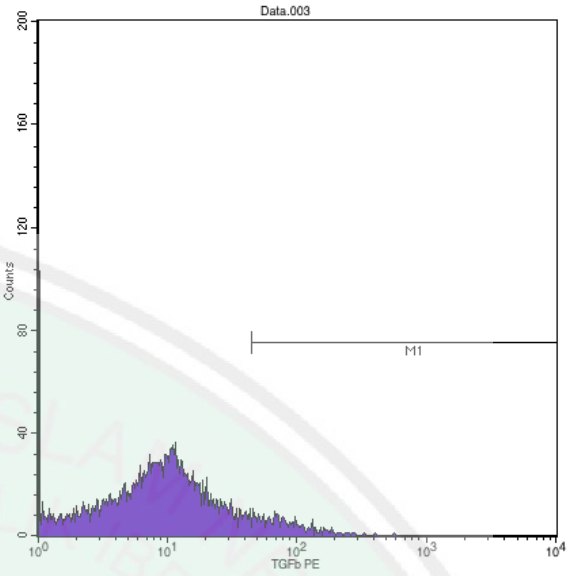
Sample ID: kont+.1 - hpr
Gate: G2
Total Events: 24345

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	9294	100.00	38.18
M1	45, 9910	563	6.06	2.31

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Kontrol (+) 2





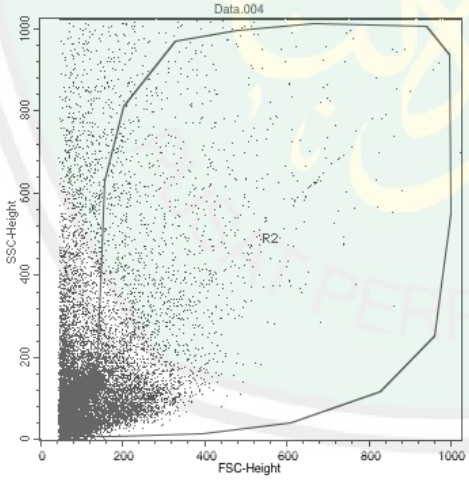
Histogram Statistics

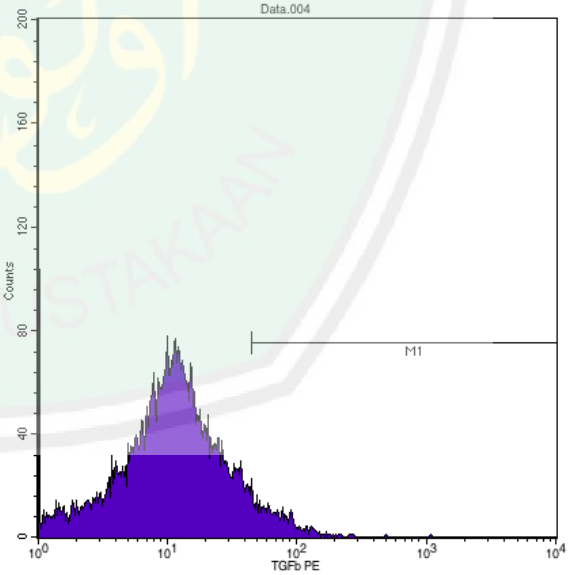
File: Data.003
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 6031
X Parameter: TGFb PE (Log)

Sample ID: kont+.3 - hpr
Gate: G2
Total Events: 27870

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	6031	100.00	21.64
M1	45, 9910	492	8.16	1.77

Kontrol (+) 3





Histogram Statistics

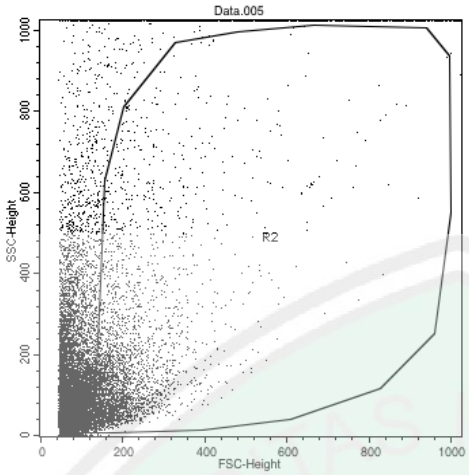
File: Data.004
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 12514
X Parameter: TGFb PE (Log)

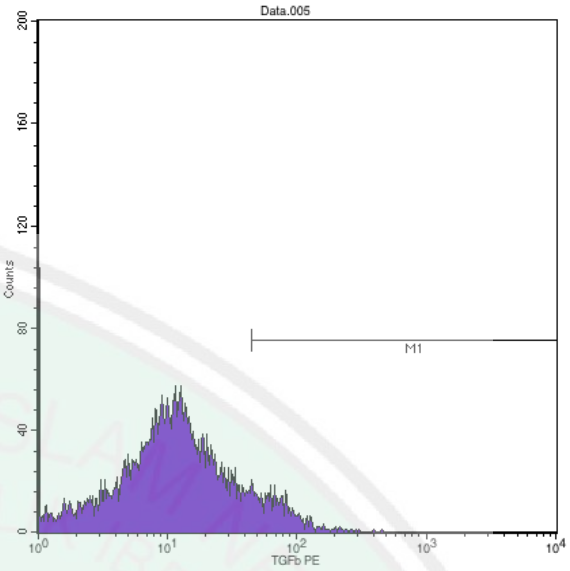
Sample ID: kont+.4 - hpr
Gate: G2
Total Events: 39720

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	12514	100.00	31.51
M1	45, 9910	729	5.83	1.84

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Kontrol (+) 4





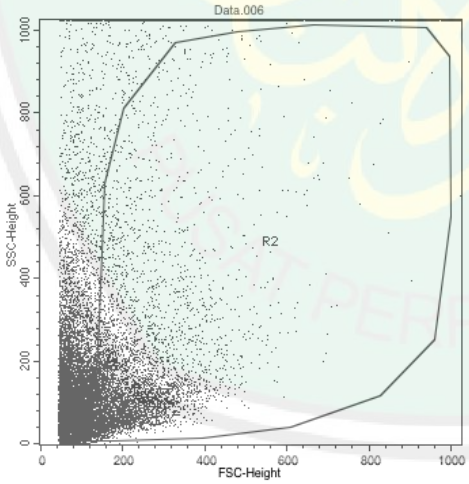
Histogram Statistics

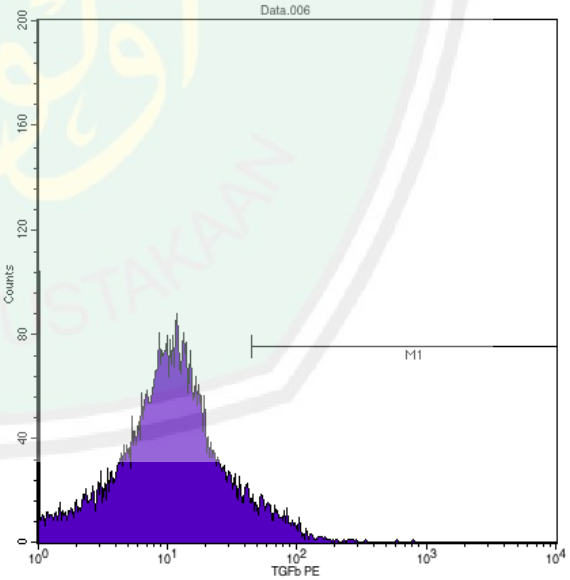
File: Data.005
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 9793
X Parameter: TGFb PE (Log)

Sample ID: kont+.5 - hpr
Gate: G2
Total Events: 35400

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	9793	100.00	27.66
M1	45, 9910	953	9.73	2.69

Kontrol (+) 5





Histogram Statistics

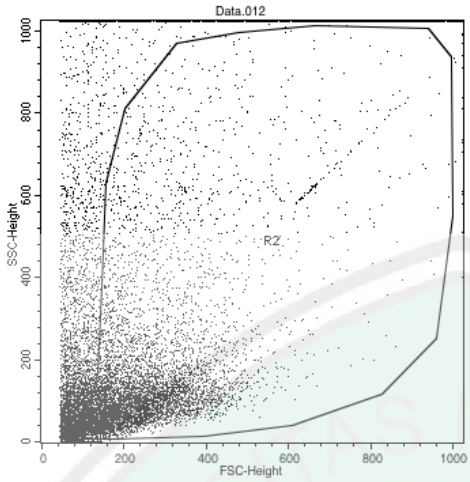
File: Data.006
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 14264
X Parameter: TGFb PE (Log)

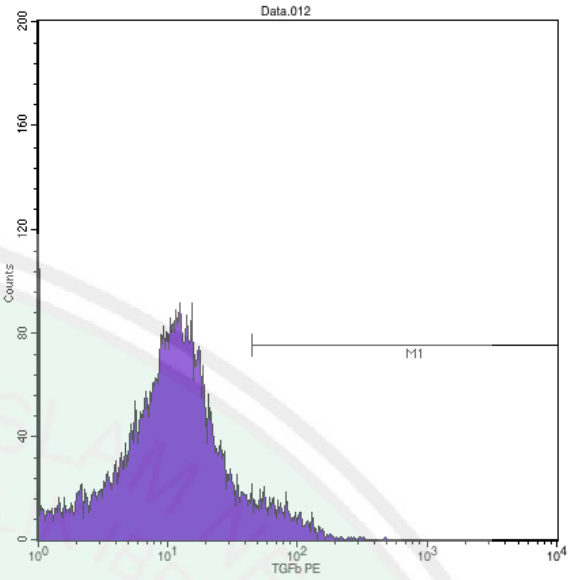
Sample ID: kont+.6 - hpr
Gate: G2
Total Events: 42900

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	14264	100.00	33.25
M1	45, 9910	897	6.29	2.09

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

P (1) 1





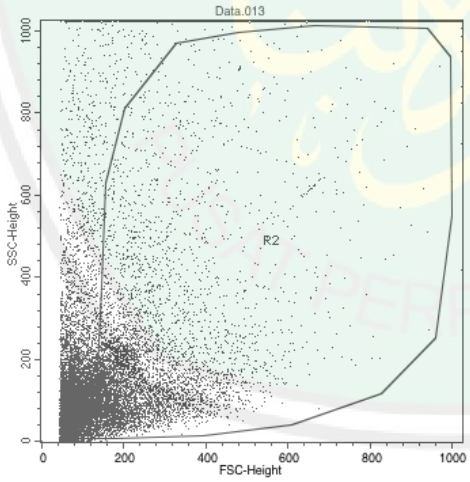
Histogram Statistics

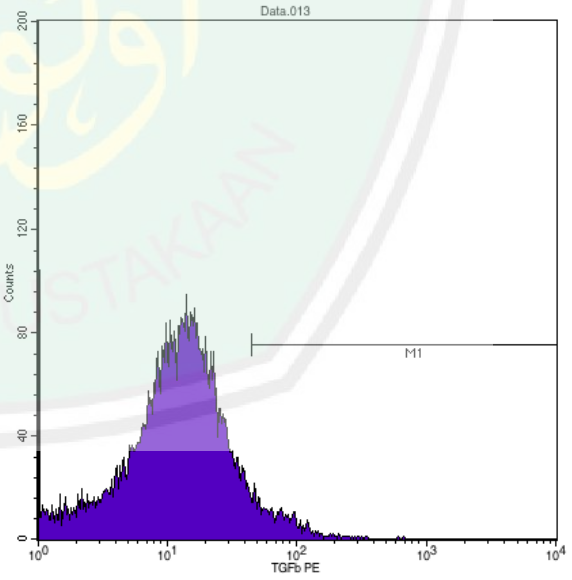
File: Data.012
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 15266
X Parameter: TGFb PE (Log)

Sample ID: P1.1 - hpr
Gate: G2
Total Events: 30900

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15266	100.00	49.40
M1	45, 9910	1045	6.85	3.38

P (1) 2





Histogram Statistics

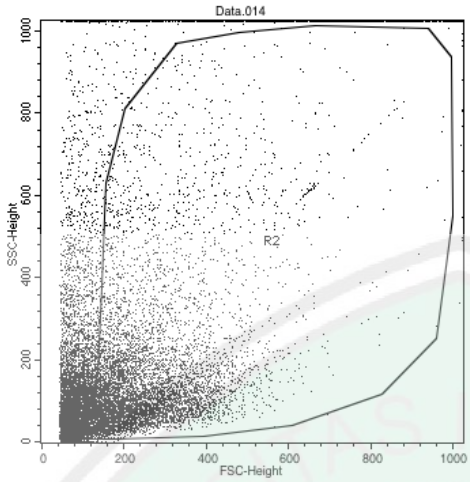
File: Data.013
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 15598
X Parameter: TGFb PE (Log)

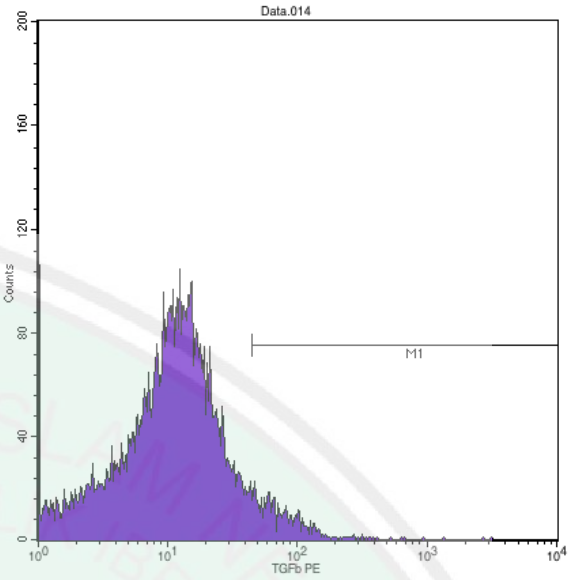
Sample ID: P1.2 - hpr
Gate: G2
Total Events: 38880

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15598	100.00	40.12
M1	45, 9910	911	5.84	2.34

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

P (1) 3





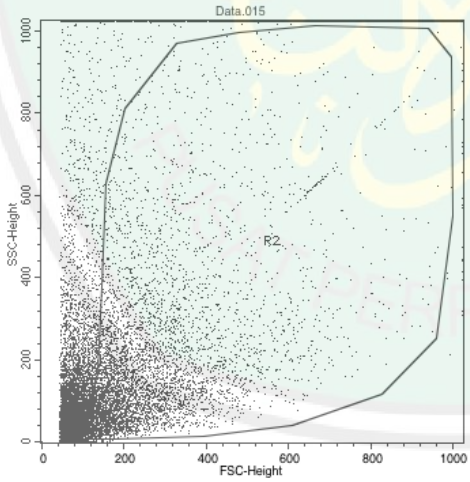
Histogram Statistics

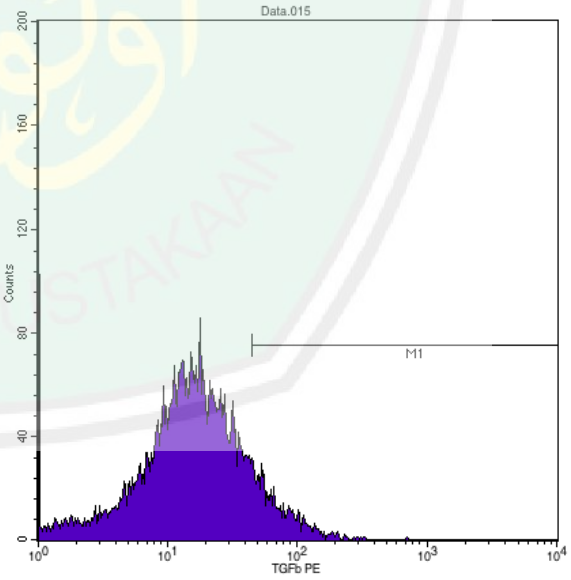
File: Data.014
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 16926
X Parameter: TGFb PE (Log)

Sample ID: P1.4 - hpr
Gate: G2
Total Events: 39705

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	16926	100.00	42.63
M1	45, 9910	1041	6.15	2.62

P (1) 4





Histogram Statistics

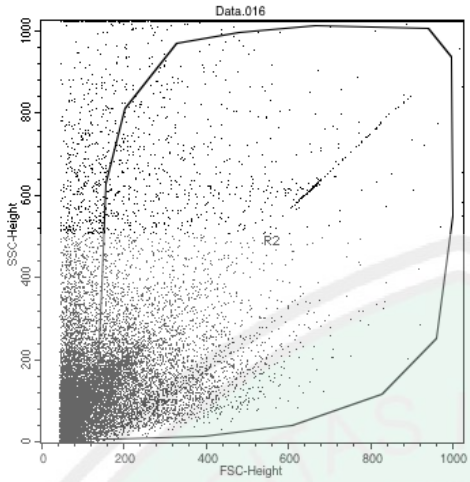
File: Data.015
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 12555
X Parameter: TGFb PE (Log)

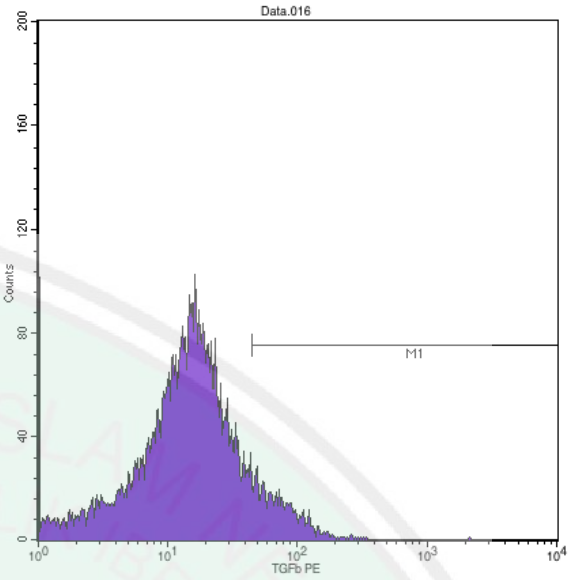
Sample ID: P1.5 - hpr
Gate: G2
Total Events: 39330

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	12555	100.00	31.92
M1	45, 9910	1312	10.45	3.34

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

P (1) 5



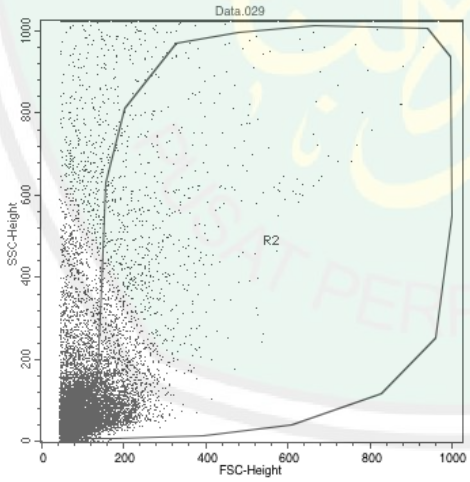


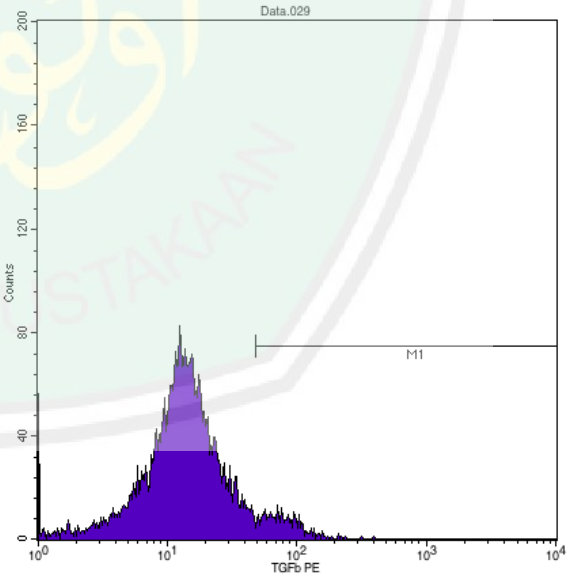
Histogram Statistics

File: Data.016
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 14645
X Parameter: TGFb PE (Log)
Sample ID: P1.6 - hpr
Gate: G2
Total Events: 50370

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	14645	100.00	29.07
M1	45, 9910	1420	9.70	2.82

P (2) 1





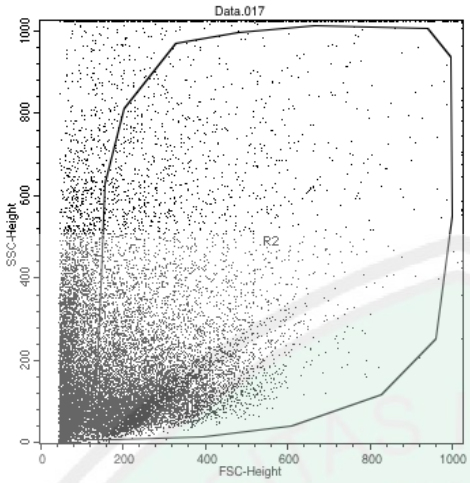
Histogram Statistics

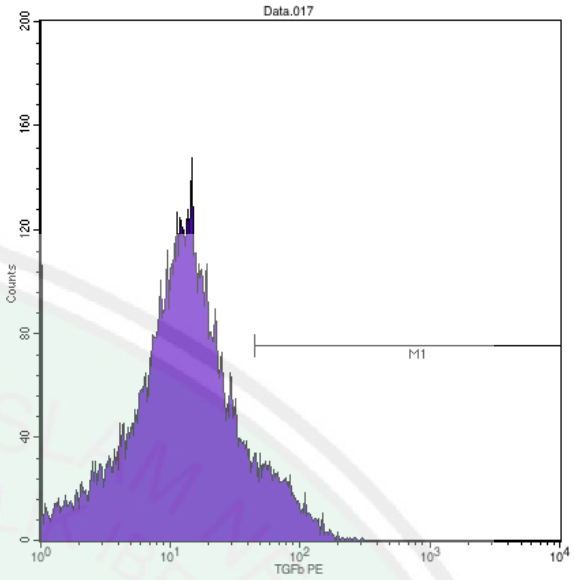
File: Data.029
Acquisition Date: 23-Mar-20
Gated Events: 9324
X Parameter: TGFb PE (Log)
Sample ID: P2.1 - hpr
Gate: G2
Total Events: 31320

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	9324	100.00	29.77
M1	48, 9910	589	6.32	1.88

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

P (2) 2





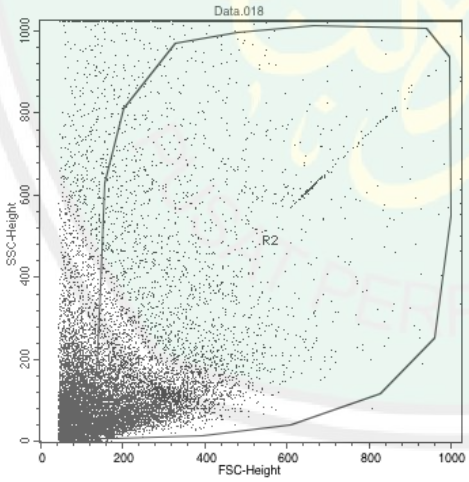
Histogram Statistics

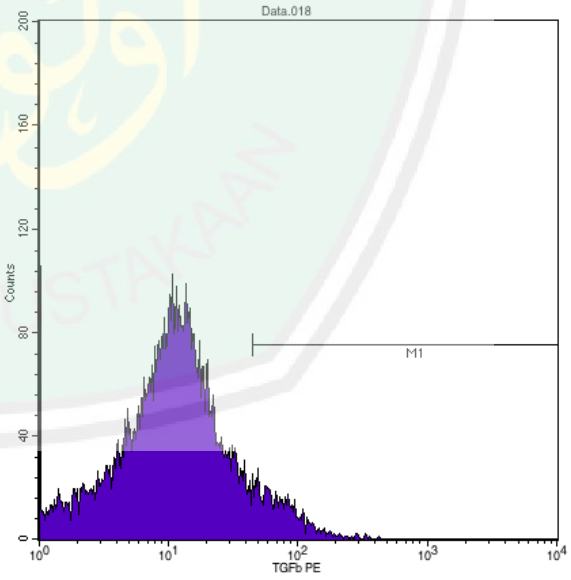
File: Data.017
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 23150
X Parameter: TGFb PE (Log)

Sample ID: P2.2 - hpr
Gate: G2
Total Events: 38873

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	23150	100.00	59.55
M1	45, 9910	2123	9.17	5.46

P (2) 3





Histogram Statistics

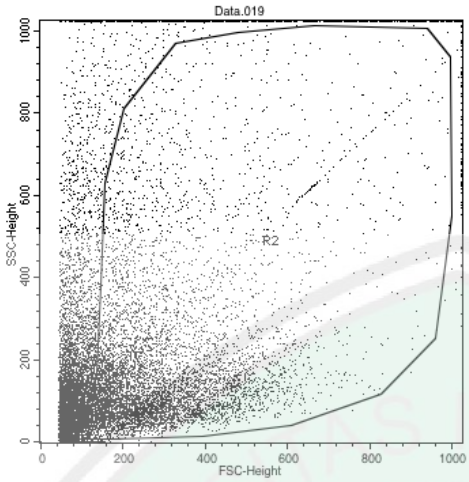
File: Data.018
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 17001
X Parameter: TGFb PE (Log)

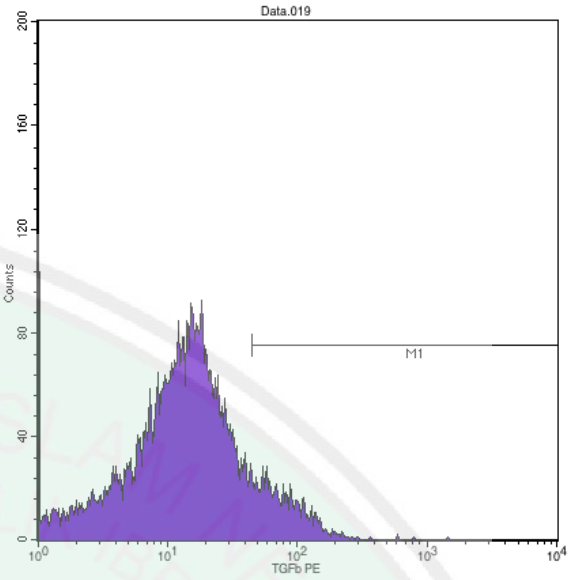
Sample ID: P2.3 - hpr
Gate: G2
Total Events: 42015

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	17001	100.00	40.46
M1	45, 9910	1387	8.16	3.30

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

P (2) 4





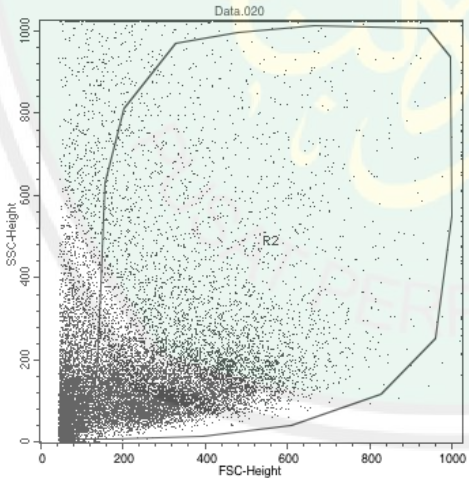
Histogram Statistics

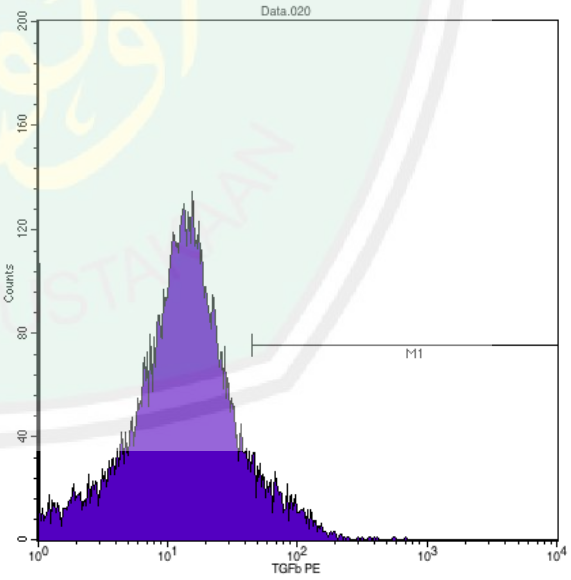
File: Data.019
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 15986
X Parameter: TGFb PE (Log)

Sample ID: P2.5 - hpr
Gate: G2
Total Events: 38385

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15986	100.00	41.65
M1	45, 9910	1752	10.96	4.56

P (2) 5





Histogram Statistics

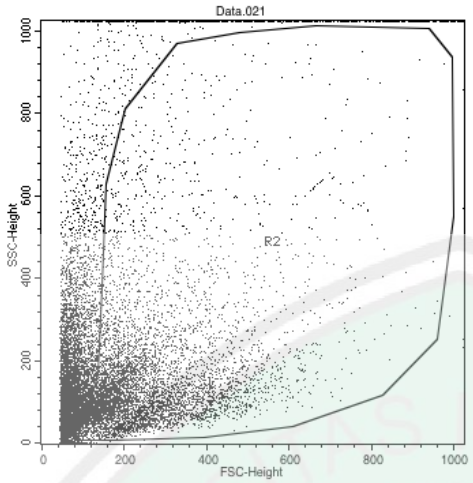
File: Data.020
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 22855
X Parameter: TGFb PE (Log)

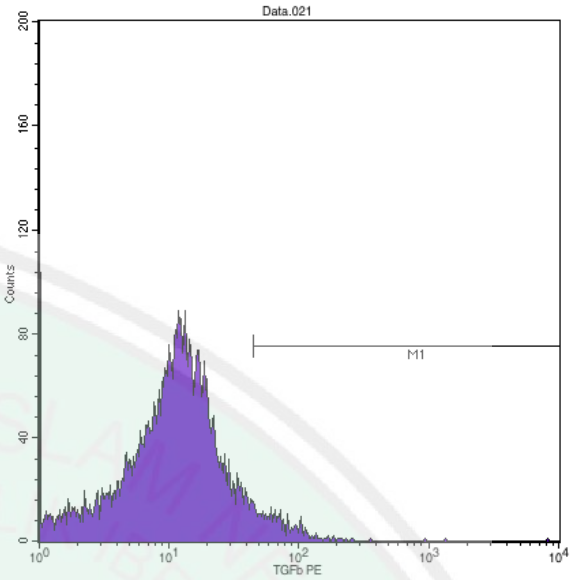
Sample ID: P2.6 - hpr
Gate: G2
Total Events: 40500

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	22855	100.00	56.43
M1	45, 9910	1751	7.66	4.32

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

P (3) 1





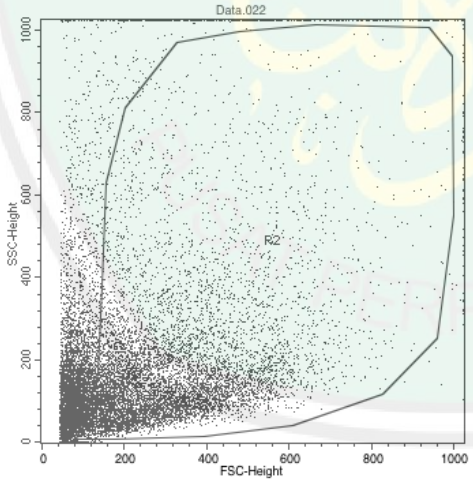
Histogram Statistics

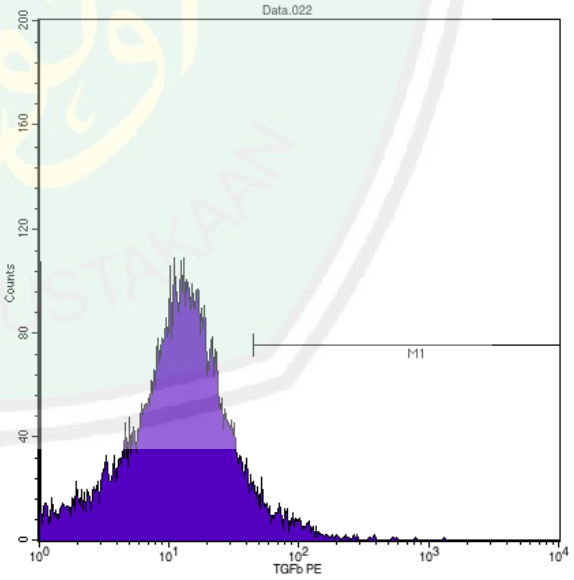
File: Data.021
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 13160
X Parameter: TGFb PE (Log)

Sample ID: P3.1 - hpr
Gate: G2
Total Events: 30135

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	13160	100.00	43.67
M1	45, 9910	634	4.82	2.10

P (3) 2





Histogram Statistics

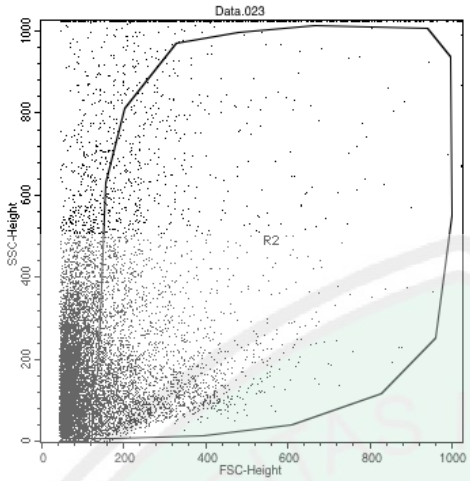
File: Data.022
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 18326
X Parameter: TGFb PE (Log)

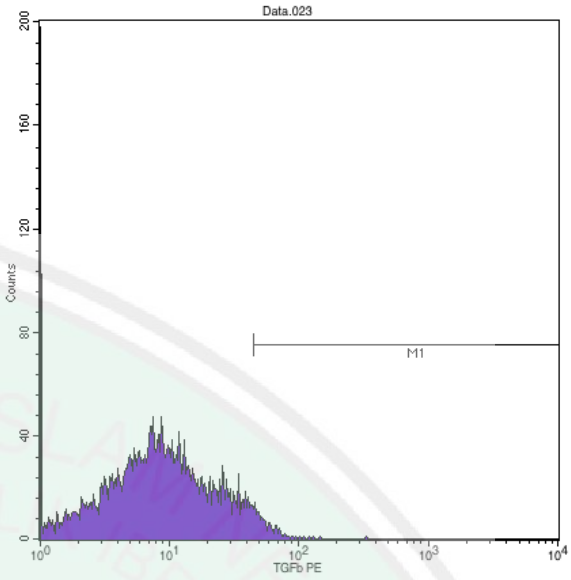
Sample ID: P3.2 - hpr
Gate: G2
Total Events: 32640

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	18326	100.00	56.15
M1	45, 9910	925	5.05	2.83

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

P (3) 3





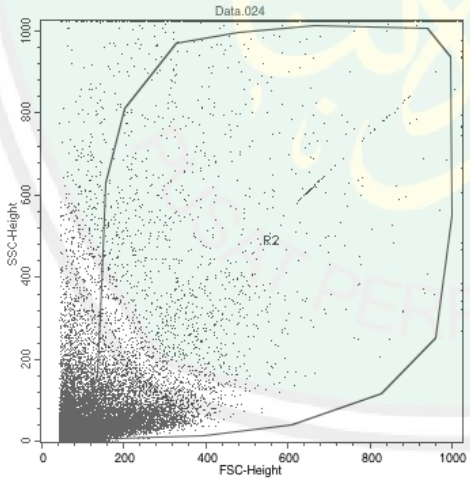
Histogram Statistics

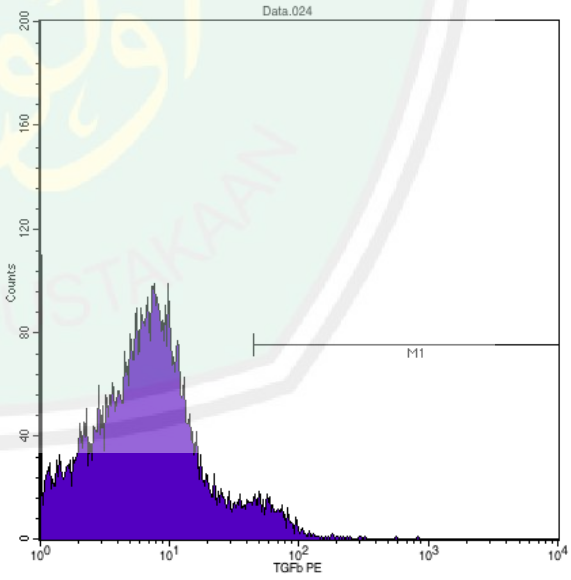
File: Data.023
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 7697
X Parameter: TGFb PE (Log)

Sample ID: P3.3 - hpr
Gate: G2
Total Events: 24960

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	7697	100.00	30.84
M1	45, 9910	248	3.22	0.99

P (3) 4





Histogram Statistics

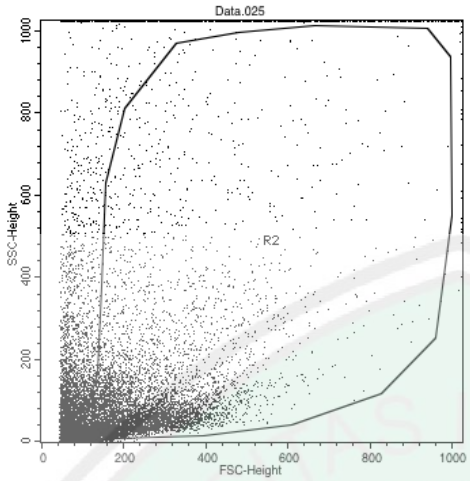
File: Data.024
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 18622
X Parameter: TGFb PE (Log)

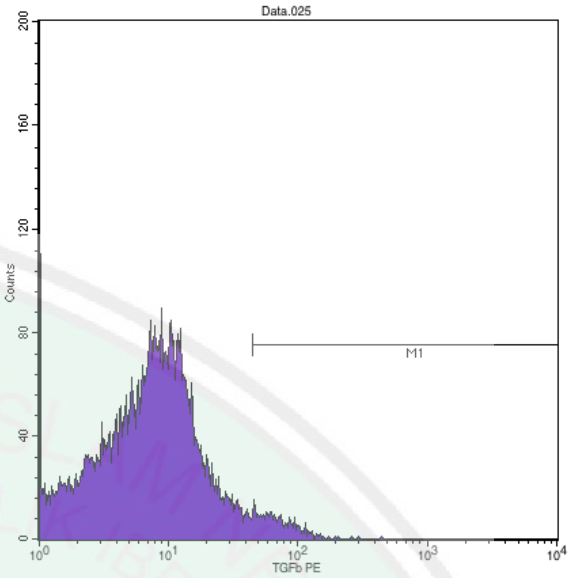
Sample ID: P3.4 - hpr
Gate: G2
Total Events: 40800

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	18622	100.00	45.64
M1	45, 9910	788	4.23	1.93

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

P (3) 5





Histogram Statistics

File: Data.025
Acquisition Date: 16-Mar-20
Gated Events: 15313
X Parameter: TGFb PE (Log)

Sample ID: P3.5 - hpr
Gate: G2
Total Events: 28890

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15313	100.00	53.00
M1	45, 9910	568	3.71	1.97

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Data Kadar TGF-β1 Setiap Kelompok Perlakuan

Kelompok	Sampel	Kadar (%)
Kontrol (-)	K(-) 1	4,63
	K(-) 2	7,57
	K(-) 3	4,45
	K(-) 4	5,81
	K(-) 5	9,23
Kontrol (+)	K (+) 1	6,06
	K (+) 2	8,16
	K (+) 3	5,83
	K (+) 4	9,73
	K (+) 5	6,29
Perlakuan (1)	P (1) 1	6,85
	P (1) 2	5,84
	P (1) 3	6,15
	P (1) 4	10,45
	P (1) 5	9,70
Perlakuan (2)	P (2) 1	6,32
	P (2) 2	9,17
	P (2) 3	8,16
	P (2) 4	10,96
	P (2) 5	7,66
Perlakuan (3)	P (3) 1	4,82
	P (3) 2	5,05
	P (3) 3	3,22
	P (3) 4	4,23
	P (3) 5	3,71

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 6. Hasil Analisis SPSS

Uji Normalitas Data

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Kelompok	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar TGF-β	K-	.202	5	.200*	.908	5	.454
	K+	.309	5	.135	.848	5	.188
	P1	.272	5	.200*	.849	5	.193
	P2	.167	5	.200*	.986	5	.963
	P3	.191	5	.200*	.954	5	.768

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

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas Levene

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Kadar TGF-β	Based on Mean	2.102	4	20	.118
	Based on Median	.574	4	20	.685
	Based on Median and with adjusted df	.574	4	15.711	.685
	Based on trimmed mean	1.961	4	20	.139

Deskriptif

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Kelompok	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar TGF-β	K-	.202	5	.200*	.908	5	.454
	K+	.309	5	.135	.848	5	.188
	P1	.272	5	.200*	.849	5	.193
	P2	.167	5	.200*	.986	5	.963
	P3	.191	5	.200*	.954	5	.768

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

a. Lilliefors Significance Correction

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

One-Way ANOVA

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	54.227	4	13.557	4.486	.009
Within Groups	60.439	20	3.022		
Total	114.666	24			

Uji *Post Hoc*

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar TGF-β

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
K-	K+	-.87600	1.09944	.435	-3.1694	1.4174
	P1	-1.46000	1.09944	.199	-3.7534	.8334
	P2	-2.11600	1.09944	.069	-4.4094	.1774
	P3	2.13200	1.09944	.067	-.1614	4.4254
K+	K-	.87600	1.09944	.435	-1.4174	3.1694
	P1	-.58400	1.09944	.601	-2.8774	1.7094
	P2	-1.24000	1.09944	.273	-3.5334	1.0534
	P3	3.00800*	1.09944	.013	.7146	5.3014
P1	K-	1.46000	1.09944	.199	-.8334	3.7534
	K+	.58400	1.09944	.601	-1.7094	2.8774
	P2	-.65600	1.09944	.557	-2.9494	1.6374
	P3	3.59200*	1.09944	.004	1.2986	5.8854
P2	K-	2.11600	1.09944	.069	-.1774	4.4094
	K+	1.24000	1.09944	.273	-1.0534	3.5334
	P1	.65600	1.09944	.557	-1.6374	2.9494
	P3	4.24800*	1.09944	.001	1.9546	6.5414
P3	K-	-2.13200	1.09944	.067	-4.4254	.1614
	K+	-3.00800*	1.09944	.013	-5.3014	-.7146
	P1	-3.59200*	1.09944	.004	-5.8854	-1.2986
	P2	-4.24800*	1.09944	.001	-6.5414	-1.9546

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

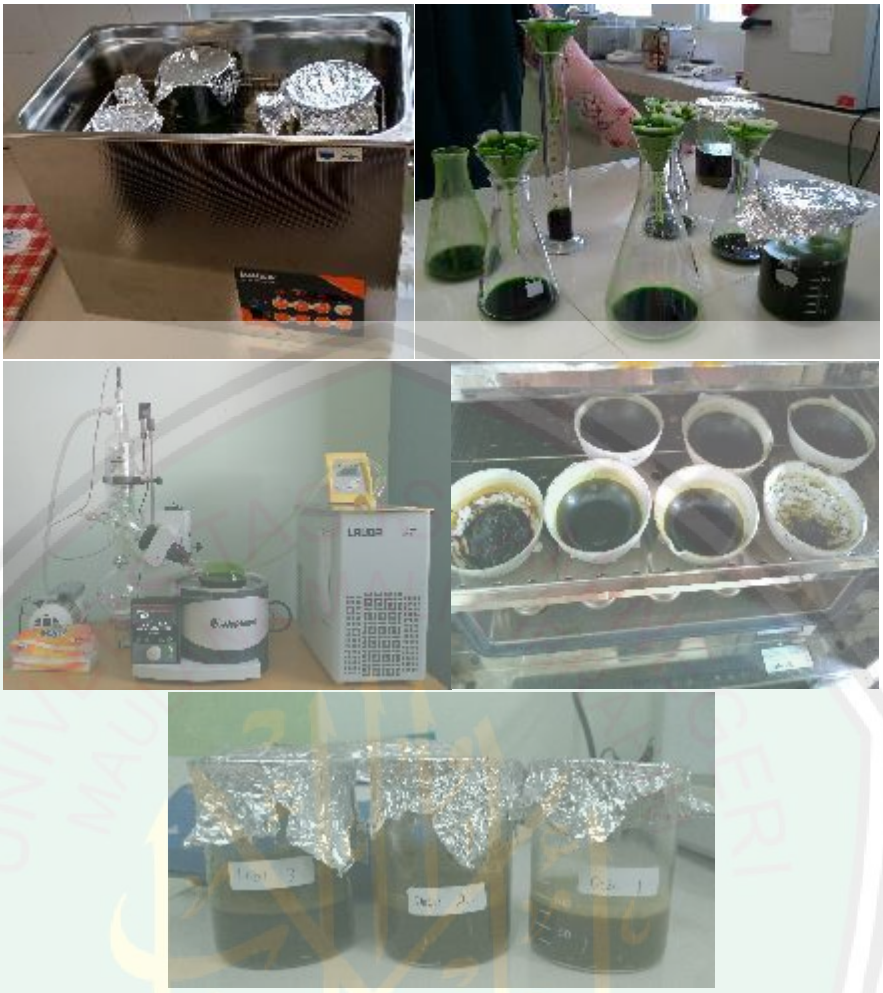
Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian

Gambar 1. Pemeliharaan Hewan Coba

Gambar 2. CCl_4 untuk Menginduksi Fibrosis Hepar pada Tikus

Gambar 3. Tanaman Kosambi

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



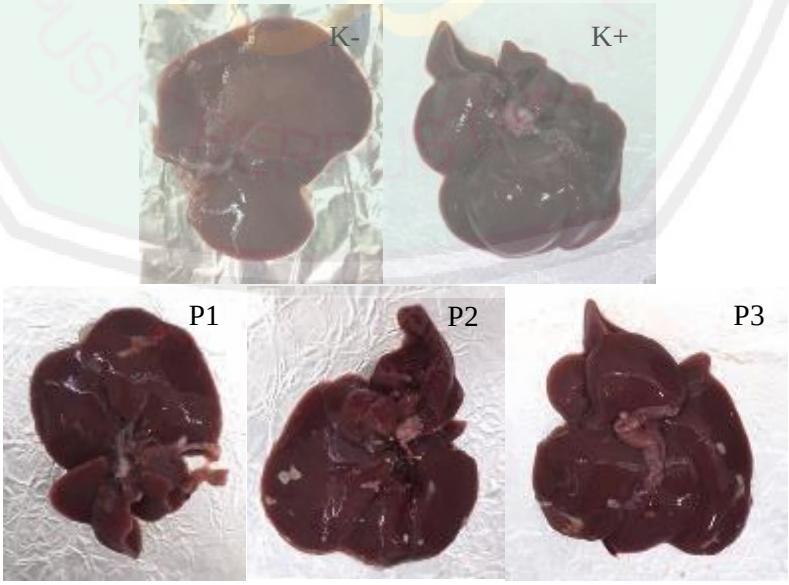
Gambar 4. Pembuatan Ekstrak Daun Kosambi

Gambar 5. Induksi CCl_4 secara Intraperitoneal

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Gambar 6. Pemberian Ekstrak Daun Kosambi dengan Sonde Lambung

Gambar 7. Proses Pembedahan dan Pengambilan Organ Hepar



Gambar 8. Organ Hepar Tikus

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG