

Isolasi Efektifitas Ekstrak Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) sebagai Hepatoprotektor pada Tikus (*Rattus norvegicus* L.) yang Diinduksi CCl₄

(The Effectiveness of Gambier Extract (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) as Hepatoprotective in Rat (*Rattus norvegicus* L.) Induced CCl₄)

FAHRI FAHRUDIN¹, DEDY DURYADI SOLIHIN¹, NASTITI KUSUMORINI²,
SRI NINGSIH^{3*}

¹Departemen Biologi-Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Institut Pertanian Bogor (IPB).

²Departemen Anatomi Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB.

³Pusat Teknologi Farmasi dan Medika (PTFM), BPPT, Kawasan Puspiptek, Serpong.

Diterima 18 Februari 2015, Disetujui 6 Mei 2015

Abstrak: Fungsi hati sebagai detoksifikasi sangat rentan terhadap kerusakan hati secara akut maupun kronis yang dapat menyebabkan terjadinya fibrosis hati. Salah satu pendekatan dalam pengobatan fibrosis hati adalah menggunakan antioksidan dari bahan alam. Ekstrak gambir terbukti mengandung senyawa fenolik yang bersifat antioksidan. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui potensi gambir sebagai hepatoprotektor pada hewan model fibrosis hati. Sebanyak 45 ekor tikus jantan galur *Sprague-Dawley* dibagi menjadi sembilan kelompok yang terdiri dari D1 (menerima ekstrak gambir 13 mg/200 g bb + CCl₄), D2 (ekstrak gambir 25 mg/200 g bb + CCl₄), D3 (ekstrak gambir 53 mg/200 g bb + CCl₄), K+1 (polifenol 25 mg/200 g bb + CCl₄), K+2 (ekstrak obat campuran 302 mg/200 g bb + CCl₄), K- (CCl₄), KG (hanya menerima ekstrak gambir 53 mg/200g bb), KP (menerima minyak kelapa), KN (kontrol normal). CCl₄ (0,1 ml/kg bb) diberikan dua kali seminggu. Semua sampel diberikan secara oral (1 ml/kg bb) selama enam minggu perlakuan. Parameter yang dianalisis adalah aktivitas enzim hati, kadar malondialdehid dan glutation hati serta histopatologi hati. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak gambir mampu memperbaiki kerusakan hati. Ekstrak gambir yang diberikan berpotensi sebagai hepatoprotektor yang signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K-). Ekstrak gambir yang efektif sebagai hepatoprotektor adalah dosis ekstrak gambir 26 mg/200 g bb (D2).

Kata kunci: Hepatoprotektif, gambir, tikus, fibrosis hati, CCl₄.

Abstract: The liver function as a detoxification create liver damage and can produce fibrosis condition both acute and chronic. One approach for the treatment of liver fibrosis is used antioxidant of natural materials. Extract of gambier was verified containing phenolic compounds of antioxidants. This research was aimed to evaluate gambier potency as hepatoprotective in animal models of liver fibrosis. Total 45 of male *Sprague-Dawley* rat were equally divided into nine groups. Consisted of D1 (received gambier 13 mg/200 g bw + CCl₄), D2 (gambier 26 mg/200 g bw + CCl₄), D3 (gambier 53 mg/200 g bw + CCl₄), K+1 (poliphenol 25 mg/kg bw + CCl₄), K+2 (mixture medicine extract 302 mg/kg bw + CCl₄), K- (CCl₄), KG (gambier 53 mg/200 g bw), KP (coconut oil), KN (normal group). CCl₄ (0.1 ml/kg bw) given twice a week. The all samples was administered orally (1 ml/200 g bb) for six consecutive weeks. The analyzed parameters were the activities of liver enzymes, malondyaldehyde and glutathione levels were measured in liver homogenates and histopathology were studied in liver sampels. The result showed that extract of gambier repaired the liver damage. Administered extract of gambier showed that gambier has

* Penulis korespondensi, Hp. 0816 762 142
e-mail: sriningsih_2202@yahoo.com

potential activity as a hepatoprotector significantly ($p < 0.05$) compared with the negative control (K-). The hepatoprotective activity of gambier extract was more effective in D2 (26 mg/200 g bw).

Keywords: Hepatoprotective, gambier, rat, liver fibrosis, CCl_4 .

PENDAHULUAN

HATI berperan sebagai organ utama dalam menjaga keseimbangan metabolisme. Hati berkaitan erat dengan metabolisme nutrisi dan detoksifikasi xenobiotik, sehingga hati rentan terhadap kerusakan⁽¹⁾. Xenobiotik merupakan senyawa atau zat asing yang masuk ke dalam tubuh dan bersifat racun, sehingga dapat merusak sel hati dan menyebabkan fungsi hati terganggu⁽²⁾.

Indikasi kerusakan hati dapat dilihat dari peningkatan kadar enzim hati seperti *alanine transaminase* (ALT) dan *aspartate transaminase* (AST) dalam darah, terjadi peroksidasi lipid yang tinggi dengan indikator peningkatan *malondialdehyde* (MDA) dan penurunan antioksidan endogen seperti glutathion (GSH)⁽³⁾. Kerusakan dan perubahan struktur sel hati juga dapat dilihat dari histologi hati meliputi hadirnya sel balloning, steatosis, sel radang^{(4), (5)} dan akumulasi *extracellular matrix* (ECM) seperti protein kolagen⁽⁶⁾.

Pengobatan fibrosis hati secara klinis memerlukan biaya mahal dan memungkinkan terjadi efek samping. Saat ini masyarakat mulai beralih pada pengobatan dengan bahan alam yang berkhasiat sebagai hepatoprotektor. Hepatoprotektor merupakan senyawa yang dapat melindungi dan memperbaiki sel hati⁽³⁾. Hepatoprotektor telah banyak digunakan untuk pencegahan kerusakan hati karena bersifat sebagai antioksidan. Beberapa bahan alam telah diketahui sebagai hepatoprotektor adalah pasak bumi⁽²⁾, curcumin⁽⁷⁾ dan pegagan⁽⁶⁾.

Ekstrak gambir berpotensi sebagai hepatoprotektor yang dapat mengurangi reaksi oksidasi lipid⁽⁸⁾. Gambir memiliki kandungan katekin⁽⁹⁾ yang termasuk pada golongan fenolik dan bersifat sebagai antioksidan⁽¹⁰⁾. Efektifitas khasiat gambir sebagai hepatoprotektor masih perlu pembuktian lebih lanjut, oleh karena itu dilakukan penelitian mengenai efektifitas ekstrak gambir sebagai hepatoprotektor pada tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) yang diinduksi carbon tetrachlorida (CCl_4). CCl_4 merupakan senyawa hepatotoksik yang banyak digunakan untuk model kerusakan hati^{(3), (11), (12)}. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efektifitas hepatoprotektor ekstrak gambir terhadap gangguan *liver fibrosis*.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan-bahan yang digunakan pada

penelitian ini adalah gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.), gambir yang digunakan merupakan produk gambir kering dari Sumatera Barat. Tikus jantan (*Rattus norvegicus* L.) strain Sprague-Dawley (SD) didapatkan dari Badan POM RI. Karbon tetrachlorida (CCl_4), pelarut ekstrak etanol (96%), dan polyphenon-60n (*green tea*) diperoleh dari Sigma Aldrich. Reagen-Kit untuk analisis enzim hati berasal dari DyaSys®. Pakan standard tikus diperoleh dari PT. Indofood-Bogor. Bahan pewarnaan hematoksilin-eosin diperoleh dari laboratorium patologi, Balitvet-Bogor. Bahan pewarnaan Van Gieson diperoleh dari Laboratorium Patologi Eijkman. Bahan-bahan lain yang digunakan pada penelitian ini meliputi n-MPI (n-metil-2-fenil-indol), larutan 1.1.3.3-tetrametoxipropane (TOMP), larutan *buffer neutral formalin* (BNF), minyak kelapa, dan CMC disediakan oleh laboratorium farmakologi dan laboratorium biofarmasi, Pusat Teknologi Farmasi dan Medika (PTFM-BPPT).

Alat. Peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi peralatan ekstraksi seperti blander, rotavapor, dan *shaker*. Alat-alat yang digunakan untuk pengukuran sampel (darah dan *homogenate* hati) adalah *micropastle*, tabung reaksi, *ependorf*, *sentrifuge*, dan spektrofotometer. Peralatan untuk histologi meliputi *basket tissue*, mikrotom, dan objek glass, sedangkan alat yang digunakan di laboratorium hewan meliputi kandang hewan (unit), syring, pipa kapiler, dan alat-alat bedah serta peralatan penunjang laboratorium lainnya.

METODE. Penelitian menggunakan metode rancang acak lengkap (RAL). Tikus dibagi menjadi sembilan kelompok perlakuan ($n=5$). Tiga kelompok diberikan variasi dosis ekstrak gambir dan CCl_4 yaitu D1 diberikan 13 mg/200 g bb, D2 diberikan 26 mg/200 g bb, dan D3 diberikan 53 mg/200 g bb. Dua kelompok sebagai kontrol positif yaitu K+1 diberikan polifenol ekstrak green tea 25 mg/200 g bb + CCl_4 dan K+2 diberikan dosis ekstrak campuran obat hati yang telah beredar dipasaran 302 mg/200 g bb + CCl_4 . Satu kelompok kontrol negatif (K-) hanya diberikan CCl_4 . Tiga kelompok kontrol normal yaitu KG (diberikan ekstrak gambir dosis tertinggi 53 mg/200 g bb), KP (diberikan minyak kelapa) dan KN (kelompok normal/hanya mendapat diet standar). Penentuan dosis ekstrak gambir berdasarkan pengembangan dari dosis setara kandungan fenol ekstrak *green tea*⁽¹³⁾ dengan memperhatikan kadar air ekstrak gambir. Dosis CCl_4 yang diberikan adalah 0.1 mL/kg bb dengan frekuensi

pemberian dua kali seminggu selama enam minggu⁽¹⁴⁾. Gambir dan obat perbandingan diberikan secara oral (1 mL/200 g bb) setiap hari selama tujuh hari sebelum pemberian CCl₄. Gambir dan obat perbandingan diberikan kembali setiap hari selama enam minggu perlakuan bersama dengan pemberian CCl₄.

Pemeliharaan Hewan. Hewan yang digunakan adalah tikus jantan berjumlah 45 ekor, usia 6-8 minggu, bobot badan (bb) berkisar antara 180-200 g. Tikus diaklimatisasi selama tujuh hari pada ruangan dengan siklus 12 jam (terang/gelap), kelembaban 70% ± 2%, suhu 22 °C ± 2 °C, pemberian pakan dan minum *ad libitum*.

Pembuatan Ekstrak Gambir. Metode ekstraksi gambir berdasarkan modifikasi Hayani⁽¹⁵⁾ yaitu metode *shaker* dengan mencampur pelarut ekstrak dan simplisia kemudian dilakukan pengocokan atau *shaker* selama waktu yang telah ditentukan. Pada penelitian ini waktu yang digunakan untuk *shaker* ekstrak gambir adalah 24 jam (*over night*). Gambir yang digunakan adalah produk gambir jadi atau gambir rakyat. Gambir dihaluskan dan direndam dengan etanol 96% dengan perbandingan 1:4, kemudian di *shaker* (180 rpm) selama 24 jam dan disaring menggunakan kertas saring, selanjutnya dilakukan rotavapour (40 °C) pada filtrat yang telah diperoleh. Ekstrak gambir yang diperoleh kemudian disimpan pada desikator selama sehari. Pemilihan ekstrak gambir dengan pelarut etanol 96% berdasarkan hasil dari evaluasi ekstrak gambir sebagai anti-peroksidasi lipid⁽¹⁰⁾.

Preparasi Homogenat Hati. Pembuatan homogenat hati untuk analisis kadar *malondialdehyde* (MDA) dan *gluthathion* (GSH) berdasarkan modifikasi dari Zainuri dan Wanandi⁽¹⁶⁾. Organ hati yang digunakan adalah ± 200 mg, jaringan hati dilumatkan dengan *micropestle* dan *homogenizer* dalam 2 mL Buffer fosfat 0,1M pH 7,0, dan 500 µL *trichloroacetic acid* (TCA) 10%. Homogenat kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatant yang dihasilkan kemudian disimpan pada tabung yang bersih dan digunakan untuk melakukan pengukuran MDA dan GSH.

Parameter yang Diamati. Kadar Enzim Hati (ALT dan AST). Darah tikus diambil melalui vena orbitalis menggunakan tabung kapiler (*Marienfeld Superior*). Darah disentrifugasi (Hettich Zentrifugen Mikro 22R) dengan kecepatan 7826 x g pada suhu 4 °C selama 15 menit untuk mendapatkan plasma. Plasma darah digunakan untuk analisis enzim hati. Pengukuran dilakukan sebanyak empat kali pada minggu ke-0 (M0), ke-2 (M2), ke-4 (M4), dan ke-6 (M6) menggunakan reagen-kit (DiaSys®). Pengukuran secara spektrofotometri (Genesis 10UV) yang mengacu pada katalog DiaSys®.

Kadar MDA Hati. Analisis kadar MDA ditentukan dengan menggunakan persamaan garis dari masing-masing persamaan kurva kalibrasi. Pembuatan kurva standar dilakukan dengan menggunakan larutan 1.1.3.3-tetrametoxipropane (TOMP) dalam 10 mM Tris-HCl dengan konsentrasi akhir yaitu 0, 0,5, 1, 2, 3, dan 4, µM. Sebanyak 200 µL sampel homogenat hati direaksikan dengan 10 µL BHT 5%, 650 µL NMPI (N-metil-2-fenil-indol), dan 150 µl HCl pekat kemudian divorteks dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatant yang terbentuk diambil dan ditambahkan 400 µL TBA 0,67%. Sampel *divorteks* dan diinkubasi pada suhu 45 °C selama 60 menit, kemudian sampel didinginkan pada suhu ruang. Selanjutnya dibaca serapan sampel pada spektrofotometri dengan panjang gelombang 586 nm⁽¹⁷⁾. Parameter yang dianalisis adalah nilai serapan dari setiap sampel pada masing-masing kelompok perlakuan.

Kadar GSH Hati. Pengukuran kadar GSH menggunakan modifikasi metode Ellman dengan perbandingan senyawa *reduced* GSH⁽¹⁸⁾. Analisis kadar GSH ditentukan dengan menggunakan persamaan garis dari masing-masing persamaan kurva kalibrasi. Kurva GSH dibuat dengan melakukan pengukuran serangkaian konsentrasi GSH standar (mM) yaitu 0; 0,04; 0,08; 0,16; 0,2; dan 0,4 µM kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama satu jam. Serapan dibaca pada panjang gelombang 412 nm menggunakan spektrofotometri. Homogenat hati dari masing-masing kelompok perlakuan diambil 100 µL dan ditambahkan 1775 µL 0.1 M Buffer fosfat pH 8 kemudian divortex hingga homogen, selanjutnya ditambahkan 25 µl dTNB dan diinkubasi pada suhu kamar selama satu jam (*light protected*). Larutan blanko dibuat menggunakan 2000 µl 0,1 M dapar fosfat pH 8 dan ditambahkan 25 µL dTNB. Serapan dibaca pada panjang gelombang 412 nm menggunakan spektrofotometri. Parameter yang dianalisis adalah nilai serapan dari setiap sampel pada masing-masing kelompok perlakuan.

Mikroanatomi (Histopatologi) Hati. Organ hati difiksasi di dalam larutan dapar netral formalin (BNF), selanjutnya dipersiapkan untuk pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan hematoxilino-eosin (H&E) dan Van Gieson⁽¹⁹⁾. Evaluasi histologi dilakukan dengan teknik *scoring* pada parameter dari setiap pewarnaan⁽⁶⁾. Parameter yang diamati adalah perubahan struktur sel hati yang meliputi sel ballooning, steatosis, sel radang (H&E), dan pembentukan kolagen (Van Gieson).

Prosedur *scoring* histopatologi yang dilakukan adalah sebagai berikut: setiap slide diambil foto sebanyak lima medan pandang (perbesaran 100x) di

sekitar vena sentralis (daerah zone 3). Setiap medan pandang, dibagi menjadi sembilan kuadran. Dilakukan *scoring* jumlah sel yang mengalami steatosis, ballooning, sel radang (pada pewarnaan H&E), dan pembentukan jaringan kolagen (pada pewarnaan Van Gieson) pada kuadran 2, 4, 6, 8. *Scoring* setiap medan pandang adalah rata-rata dari ke-4 kuadran. *Scoring* setiap ekor adalah rata-rata dari kelima medan pandang. Selanjutnya dibuat indeks *scoring*. Setiap ekor hewan coba dijumlah total pada parameter dari masing-masing pewarnaan. Nilai dari setiap kelompok merupakan rata-rata dari seluruh individu dalam kelompok dan disebut indeks *scoring*. Nilai *scoring* yang digunakan pada masing-masing parameter mengacu pada Merat *et al*⁽⁶⁾.

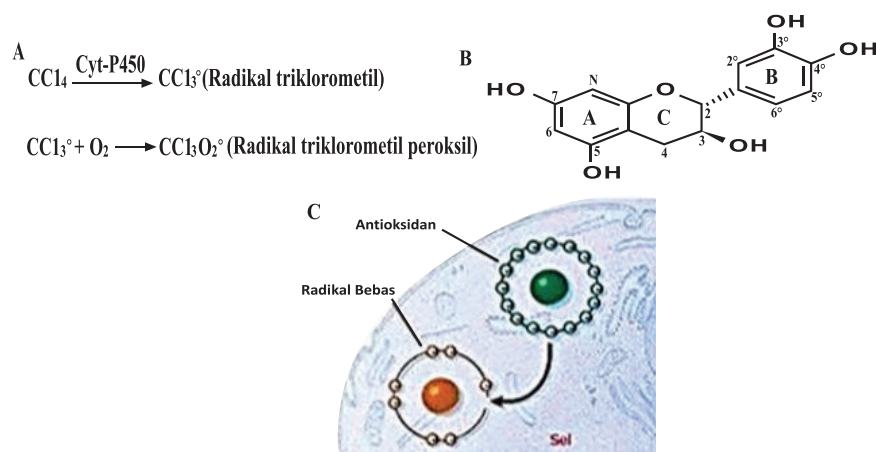
Analisis Data. Keseluruhan data dianalisis menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji DUNCAN dengan tingkat kepercayaan 95% menggunakan Minitab 16.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Mekanisme Penetralkan Radikal Bebas oleh Antioksidan dari Ekstrak Gambir. Karbon tetraklorida (CCl_4) melalui proses metabolisme oleh sitokrom P_{450} (Cyt- P_{450}) di dalam hati menghasilkan metabolit radikal triklorometil ($CCl_3\cdot$)⁽³⁾. $CCl_3\cdot$ jika bereaksi dengan O_2 akan menjadi radikal triklorometil peroksil ($CCl_3O_2\cdot$) dengan sifat yang sangat reaktif sebagai radikal bebas^(11, 12) (Gambar 1A). Radikal bebas merupakan molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan dan akan menarik atau mencari elektron dari molekul lain yang ada di dalam tubuh sehingga akan mengganggu keseimbangan metabolisme tubuh. Kondisi tidak seimbang antara radikal bebas dengan mekanisme pertahanan tubuh dapat menciptakan kerusakan oksidatif yang akan tersebar pada semua sel target (lipid, protein dan

DNA)⁽²⁰⁾. Molekul yang pertama diserang oleh radikal bebas adalah lipid sebagai pelindung sel. Lipid yang diserang oleh radikal bebas akan menghasilkan radikal lipid ($L\cdot$)^(21, 22). $L\cdot$ dengan kehadiran oksigen akan bereaksi menjadi radikal lipid peroksida ($LOO\cdot$) dan akan terus menyerang molekul lain sehingga sumber lipid pada sel di dalam tubuh habis. Adanya proses oksidasi lipid oleh radikal bebas menyebabkan kerusakan sel kemudian terjadi apoptosis. Reaksi radikal bebas di dalam sel tubuh dapat dinetralisir atau dihentikan dengan bantuan antioksidan alami yang berasal dari metabolit sekunder tanaman⁽²¹⁾. Mekanisme antioksidan dalam menghentikan reaksi radikal bebas meliputi donor elektron dari atom hidrogen, pengikatan ion logam (*metal chelator*), dan inaktivasi *singlet oxygen*^(21, 22). Antioksidan berperan dalam menetralkan radikal bebas karena memiliki atom H pada gugus OH yang dapat mendonorkan elektron pada radikal bebas sehingga molekul radikal bebas memiliki atom terluar yang seimbang (genap). Gambir berperan sebagai antioksidan karena mengandung senyawa-senyawa fenol meliputi katekin, quersetin, alkaloid dan tanin^(9, 21, 28).

Ekstrak gambir mengandung antioksidan dari katekin yang merupakan golongan flavonoid dan termasuk ke dalam senyawa fenolik^(10, 20, 23). Flavonoid mempunyai peran utama sebagai pencegah terjadinya proses peroksidasi lipid⁽²²⁾. Katekin merupakan kandungan utama dalam gambir⁽⁹⁾ yang bersifat antioksidan^(10, 23), sehingga dapat menetralkan radikal bebas. Gambar 1B merupakan struktur katekin yang mempunyai gugus OH pada tiga cincin aromatik yaitu dua gugus fenol (cincin A dan B) dan satu gugus dihidropin (cincin C). Pemusnahan radikal bebas di dalam tubuh berhubungan dengan aktivitas flavonoid yang memiliki gugus OH^(20, 22, 24). Atom H yang berasal dari gugus OH dapat mendonorkan elektron^(20, 25) dan mengikat ion logam⁽²²⁾ dari molekul radikal



Gambar 1. Mekanisme reaksi CCl_4 menjadi radikal bebas (A), struktur polifenol (+)-katekin (B) dan mekanisme donor elektron antioksidan dalam menetralkan radikal bebas (C).

bebas, sehingga radikal bebas menjadi netral atau tidak reaktif (Gambar 1C). Ekstrak gambir dengan kandungan fenol yang tinggi⁽¹⁰⁾ sangat berpotensi sebagai hepatoprotektor karena mampu menurunkan kadar enzim hati di dalam darah, meningkatkan kadar GSH, menurunkan kadar MDA dan mampu memperbaiki gambaran kerusakan sel hati akibat akumulasi radikal bebas.

Pengaruh Pemberian Gambir terhadap Kadar Enzim Hati (ALT dan AST). Hasil pengukuran kadar enzim hati (ALT) disajikan pada Tabel 1. Kelompok kontrol negatif (K-) yang hanya diberikan CCl₄ menghasilkan kadar ALT yang tinggi dan kelompok tanpa pemberian CCl₄ (KG, KP, dan KN) nilai kadar ALT rendah. Pemberian ekstrak gambir (D1, D2, dan D3) dapat mengurangi kadar ALT dalam darah secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan kontrol negatif (K-). Gambir yang lebih efektif adalah gambir D2, hal ini tidak berbeda ($p > 0,05$) dengan perlakuan pada kontrol positif (K+1 dan K+2) yang diberikan hepatoprotektor komersil. Hasil yang sama dengan pengukuran kadar

ALT terjadi pada pengukuran kadar AST (Tabel 2), namun pada pengukuran kadar AST terdapat dua dosis gambir yang lebih efektif ($p < 0,05$) dalam memberikan pengaruh terhadap kadar AST yaitu gambir D2 dan D3.

Hasil analisis kadar enzim hati menunjukkan pemberian ekstrak gambir berpotensi sebagai hepatoprotektor. Kandungan katekin (polifenol) pada ekstrak gambir bersifat antioksidan^{(10), (20)} dan terbukti dapat menetralkan radikal bebas hasil metabolisme CCl₄. Katekin mempunyai cincin aromatik dengan lebih dari satu gugus hidroksil (OH). Gugus hidroksil memiliki aktivitas biologis yang digunakan dalam reaksi enzimatik oksidasi sebagai substrat donor elektron dari atom H^{(20), (24), (25)}. Reaksi radikal bebas pada sel di dalam tubuh yang hadir akibat metabolisme CCl₄ dapat dinetralkan dengan cara mengikat ion logam radikal bebas⁽²²⁾ dan donor elektron dari atom H⁽²⁵⁾, sehingga molekul radikal bebas yang mempunyai elektron terluar tidak berpasangan menjadi stabil (tidak reaktif). Antioksidan berperan dalam menangkap

Tabel 1. Pengaruh pemberian gambir terhadap kadar ALT (U/L) dalam darah.

| Kelompok perlakuan | Kadar ALT pada pengukuran minggu ke- | | | |
|--------------------|--------------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | M0 | M2 | M4 | M6 |
| D1 | 40 ± 2,6 | 47 ± 3,9 ^a | 301 ± 81,7 ^b | 231 ± 100,8 ^b |
| D2 | 42 ± 5,9 | 43 ± 5,6 ^a | 132 ± 48,4 ^a | 157 ± 19,8 ^a |
| D3 | 42 ± 6,2 | 48 ± 7,0 ^a | 137 ± 26,7 ^a | 214 ± 65,9 ^b |
| K+1 | 43 ± 8,5 | 51 ± 8,9 ^a | 109 ± 27,9 ^a | 170 ± 76,1 ^a |
| K+2 | 40 ± 5,5 | 68 ± 18,6 ^b | 131 ± 32,0 ^a | 141 ± 23,7 ^a |
| K- | 44 ± 6,5 | 65 ± 12,1 ^b | 519 ± 214,4 ^c | 527 ± 234,0 ^c |
| KG | 39 ± 3,1 | 44 ± 6,8 ^a | 39 ± 12,0 ^a | 40 ± 6,0 ^a |
| KP | 39 ± 4,7 | 40 ± 13,6 ^a | 34 ± 3,9 ^a | 41 ± 7,1 ^a |
| KN | 45 ± 8,7 | 40 ± 6,8 ^a | 40 ± 5,0 ^a | 36 ± 6,9 ^a |

Keterangan:

Nilai rata-rata pada kolom yang sama dan diikuti huruf superscript yang berbeda menunjukkan terdapat beda nyata pada uji Duncan ($p = 0,05$). M (minggu ke-), D1 (gambir dosis 1; 13 mg/200g bb + CCl₄), D2 (gambir dosis 2; 26 mg/200 g bb + CCl₄), D3 (gambir dosis 3; 53 mg/200 g bb + CCl₄), K+1 (obat pembanding 1; 25 mg/200 g bb + CCl₄), K+2 (obat pembanding 2; 302 mg/200 g bb + CCl₄), K- (CCl₄), KG (gambir dosis 3; 53 mg/200g bb), KP (minyak kelapa 1 ml/200 g bb), KN (kontrol normal/tanpa perlakuan).

Tabel 2. Pengaruh pemberian gambir terhadap kadar AST (U/L) dalam darah.

| Kelompok perlakuan | Kadar AST pada pengukuran minggu ke- | | | |
|--------------------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | M0 | M2 | M4 | M6 |
| D1 | 92 ± 15.5 | 100 ± 13.6 ^a | 288 ± 83.6 ^c | 385 ± 159.0 ^b |
| D2 | 99 ± 11.5 | 103 ± 7.2 ^a | 167 ± 36.3 ^b | 158 ± 35.4 ^a |
| D3 | 91 ± 10.2 | 115 ± 29.4 ^a | 166 ± 30.5 ^b | 243 ± 87.3 ^a |
| K+1 | 97 ± 23.5 | 109 ± 6.8 ^a | 193 ± 40.2 ^b | 223 ± 116.7 ^a |
| K+2 | 97 ± 8.6 | 114 ± 34.0 ^a | 144 ± 22.2 ^a | 165 ± 39.3 ^a |
| K- | 91 ± 8.2 | 145 ± 44.0 ^b | 301 ± 77.2 ^c | 541 ± 245.5 ^c |
| KG | 86 ± 9.1 | 96 ± 12.6 ^a | 71 ± 8.3 ^a | 77 ± 17.2 ^a |
| KP | 109 ± 19.0 | 94 ± 22.6 ^a | 68 ± 11.7 ^a | 77 ± 15.8 ^a |
| KN | 97 ± 13.7 | 85 ± 7.9 ^a | 81 ± 16.2 ^a | 71 ± 3.1 ^a |

Keterangan:

Nilai rata-rata pada kolom yang sama dan diikuti huruf superscript yang berbeda menunjukkan terdapat beda nyata pada uji Duncan ($p = 0,05$). M (minggu ke-), D1 (gambir dosis 1; 13 mg/200g bb + CCl₄), D2 (gambir dosis 2; 26 mg/200 g bb + CCl₄), D3 (gambir dosis 3; 53 mg/200 g bb + CCl₄), K+1 (obat pembanding 1; 25 mg/200 g bb + CCl₄), K+2 (obat pembanding 2; 302 mg/200 g bb + CCl₄), K- (CCl₄), KG (gambir dosis 3; 53 mg/200g bb), KP (minyak kelapa 1 ml/200 g bb), KN (kontrol normal/tanpa perlakuan).

radikal bebas dan melindungi permeabilitas membran sel hati dari kerusakan^{(18), (26)}. Proses netralisasi radikal bebas oleh antioksidan menghasilkan kondisi lingkungan yang optimal bagi sel-sel hati untuk regenerasi⁽²⁷⁾. Kondisi jaringan hati yang berangsur membaik dapat mengurangi keberadaan enzim hati dalam darah. Pemberian ekstrak gambir dapat mengurangi kadar enzim hati dan dosis gambir yang lebih efektif mengurangi peningkatan enzim hati dalam darah adalah gambir dosis 2.

Pengaruh Pemberian Gambir terhadap Kadar MDA dan GSH Hati. Metabolisme CCl_4 di dalam tubuh menjadi radikal bebas dan menyerang lipid (peroksidasi lipid) sehingga menghasilkan MDA sebagai produknya. Kadar MDA akan meningkat jika radikal bebas tidak dapat dinetralisir oleh antioksidan endogen seperti GSH. Kadar GSH terdeteksi menurun jika kadar MDA meningkat akibat serangan radikal bebas dan akan berdampak pada degradasi sel. Hasil pengukuran kadar MDA dan GSH disajikan pada Tabel 3. Kadar MDA dan GSH pada kelompok K- berbeda nyata ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain. Hal ini terjadi karena proses peroksidasi lipid pada tikus kelompok K- yang diberi CCl_4 terus berlanjut dan tidak ada antioksidan eksogen masuk ketika antioksidan endogen dalam keadaan menurun.

MDA merupakan hasil proses peroksidasi lipid akibat adanya akumulasi radikal bebas. Peroksidasi lipid dapat menghasilkan sejumlah senyawa turunan bersifat toksik seperti golongan aldehid⁽¹⁶⁾. Peroksidasi lipid terjadi karena ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan dalam tubuh. Ketika

Tabel 3. Pengaruh ekstrak gambir terhadap kadar MDA ($\mu M/g$) dan GSH (mM/g).

| Kelompok perlakuan | Malondialdehyde (MDA) | Gluthathion (GSH) |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| D1 | 2.32 ± 0.12 ^a | 2.26 ± 0.23 ^a |
| D2 | 2.37 ± 0.20 ^a | 2.40 ± 0.21 ^a |
| D3 | 2.25 ± 0.37 ^a | 2.09 ± 0.19 ^a |
| K+ (1) | 1.66 ± 0.40 ^a | 2.48 ± 0.10 ^a |
| K+ (2) | 2.85 ± 0.64 ^a | 2.09 ± 0.02 ^a |
| K- | 3.25 ± 0.19 ^b | 0.81 ± 0.27 ^b |
| KG | 2.78 ± 0.42 ^a | 1.89 ± 0.13 ^a |
| KP | 2.77 ± 0.15 ^a | 1.56 ± 0.44 ^a |
| KN | 2.02 ± 0.27 ^a | 2.38 ± 0.30 ^a |

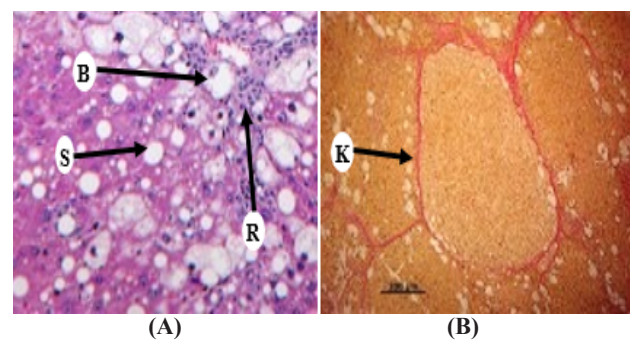
Keterangan:

Nilai rata-rata pada kolom yang sama dan diikuti huruf superscript yang berbeda menunjukkan terdapat beda nyata pada uji Duncan ($p = 0.05$). M (minggu ke-), D1 (gambir dosis 1; 13 mg/200g bb + CCl_4), D2 (gambir dosis 2; 26 mg/200 g bb + CCl_4), D3 (gambir dosis 3; 53 mg/200 g bb + CCl_4), K+1 (obat pembanding 1; 25 mg/200 g bb + CCl_4), K+2 (obat pembanding 2; 302 mg/200 g bb + CCl_4), K- (CCl_4), KG (gambir dosis 3; 53 mg/200g bb), KP (minyak kelapa 1 ml/200 g bb), KN (kontrol normal/tanpa perlakuan).

kadar MDA meningkat, maka salah satu antioksidan endogen (GSH) akan menurun⁽⁷⁾. GSH adalah enzim antioksidan alami yang berada di dalam tubuh. Daya proteksi suatu senyawa terhadap radikal bebas dapat dinilai dari kemampuan detoksifikasi, mengurangi peroksidasi lipid, dan dapat meningkatkan antioksidan endogen⁽³⁾. Gambir dapat mengurangi kadar MDA agar tetap rendah dan terbukti meningkatkan kadar GSH hati dengan signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok K-.

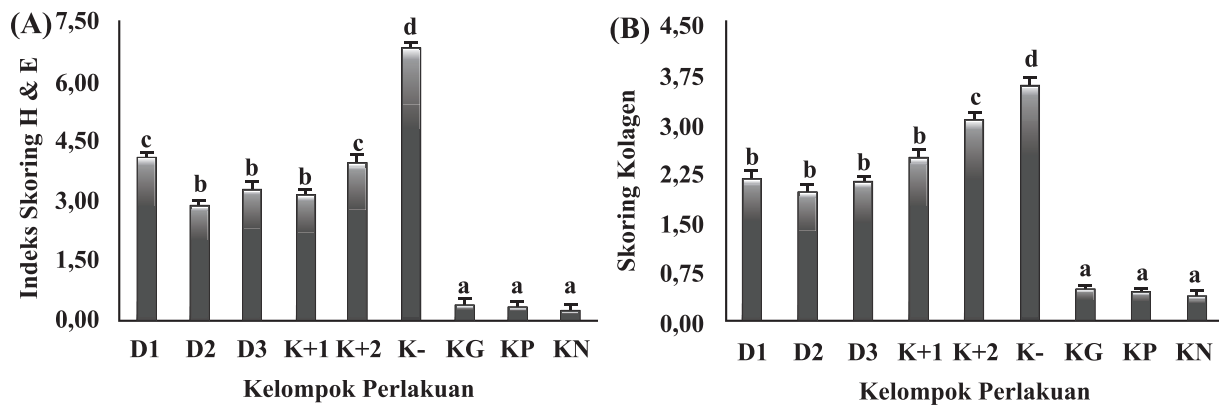
Uji Pengaruh Pemberian Gambir terhadap Histopatologi Hati. Radikal bebas yang ditimbulkan akibat metabolisme CCl_4 akan berdampak pada bentuk dan struktur sel, diantaranya sel hati tempat metabolisme dan detoksifikasi. Sel hati akan mengalami degradasi seperti bentuk *balloning*, peradangan, serta perlemakan. Sel hati yang telah terdegradasi akibat paparan radikal bebas akan timbul kolagen. Kolagen yang terdapat pada sel hati merupakan salah satu ciri dari fibrosis hati. Gambaran patologi sel hati tersaji pada Gambar 2. Pada pewarnaan H&E patologi yang diamati adalah sel *balloning*, *steatosis* dan sel radang, sedangkan pada pewarnaan Van Gieson patologi yang diamati adalah kolagen.

Histologi hati dengan pewarnaan H&E dan Van Gieson menunjukkan adanya perbedaan distribusi patologi pada kelompok perlakuan yang diinduksi CCl_4 (Gambar 2A dan 2B). Indeks *scoring* patologi hati (*steatosis*, sel *balloning*, dan sel radang) pada pewarnaan H&E menunjukkan bahwa pemberian ekstrak gambir dapat mengurangi kerusakan sel hati secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K-). Gambir D2 memberikan penurunan patologi hati lebih besar dibandingkan dengan gambir D1, D3, dan kelompok kontrol positif (K+) (Gambar 3A). Persentase penurunan patologi hati oleh gambir D2 terhadap patologi dari kelompok K- sebesar 58%. Hasil *scoring* kolagen pada histologi hati dengan pewarnaan *Van Gieson* terdapat perbedaan secara nyata antara kelompok perlakuan



Gambar 2. Patologi hati (B: sel balloning, S: steatosis, R: sel radang, K: kolagen).

Keterangan: (A) Pewarnaan H&E, (B) Pewarnaan Van Gieson.



Gambar 3. Hasil *scoring* patologi hati pewarnaan H&E (A) dan pewarnaan Van Gieson (B).

Keterangan: Nilai rata-rata pada kolom yang sama dan diikuti huruf superscript yang berbeda menunjukkan terdapat beda nyata pada uji Duncan ($p=0.05$). M (minggu ke-), D1 (gambir dosis 1; 13 mg/200g bb + CCl₄), D2 (gambir dosis 2; 26 mg/200 g bb + CCl₄), D3 (gambir dosis 3; 53 mg/200 g bb + CCl₄), K+1 (obat pembanding 1; 25 mg/200 g bb + CCl₄), K+2 (obat pembanding 2; 302 mg/200 g bb + CCl₄), K- (CCl₄), KG (gambir dosis 3; 53 mg/200g bb), KP (minyak kelapa 1 ml/200 g bb), KN (kontrol normal/tanpa perlakuan).

yang diinduksi CCl₄ (Gambar 3B). Pemberian ekstrak gambir menurunkan patologi kolagen secara nyata ($p<0,05$) dibandingkan dengan kelompok K- dan K+. Gambir D2 memberikan penurunan kolagen lebih besar dibandingkan dengan gambir D1 dan D3. Persentase penurunan kolagen oleh gambir D2 terhadap kolagen dari kelompok K- sebesar 44,4%.

Patologi hati ditemukan pada organ hati yang mengalami gangguan fungsi akibat induksi CCl₄. Metabolisme CCl₄ menghasilkan senyawa metabolit CCl₃• dan CCl₃O₂• yang menjadi radikal bebas dengan sifat sangat reaktif. Triklorometil menimbulkan reaksi oksidasi berantai dan mengakibatkan kerusakan pada struktur sel hati⁽³⁾. Triklorometil peroksil menyebabkan gangguan homeostasis sel hati⁽¹²⁾ dan berlanjut pada kematian sel⁽²⁾. Kerusakan sel hati yang berlanjut akan digantikan oleh patologi hati berupa kolagen. Kolagen merupakan salah satu extracellular matrix (ECM) sebagai indikasi fibrosis hati⁽²⁶⁾. Patologi sel hati yang terdistribusi luas pada jaringan, mengindikasikan terjadi kerusakan sel dan jaringan yang semakin parah⁽²⁷⁾. Jumlah patologi sel hati yang berkurang merupakan kondisi pemulihan dari jaringan atau sel yang rusak⁽⁵⁾. Ekstrak gambir dapat mengurangi jumlah dan distribusi patologi hati akibat akumulasi radikal bebas, sehingga gambir berpotensi sebagai agen hepatoprotektor. Ekstrak gambir dosis 26 mg/200g bb merupakan dosis gambir yang lebih efektif sebagai hepatoprotektor

SIMPULAN

Ekstrak gambir terbukti berpotensi sebagai hepatoprotektor yang mampu mengurangi peningkatan kadar enzim hati dalam darah, menurunkan kadar

MDA, mempertahankan kadar GSH, dan mampu memperbaiki gambaran kerusakan sel hati. Dosis ekstrak gambir 26 mg/200g bb (D2) mampu menjadi dosis efektif sebagai hepatoprotektor.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami ucapkan terima kasih kepada Direktur Pusat Teknologi Farmasi dan Medika (PTFM)-BPPT yang telah mendukung dan menyediakan fasilitas untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Klaassen CD. Casarett & Doull's toxicology: The basic science of poisons. New York: McGraw-Hill. 2008. 557-62.
2. Panjaitan RGP. Pengujian aktivitas hepatoprotektor akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.) [disertasi]. Bogor: Departemen Biologi Institut Pertanian Bogor; 2008.
3. Khan RA, Khan MR, Ahmed M, Sahreen S, Shah NA, Shah MS. *et al.* Hepatoprotection with a chloroform extract of *Launaea procumbens* against CCl₄-induced injuries in rats. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2012. 12:1-11.
4. Hubscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. Histopathology. 2006. 49:450-6.
5. Merat S, Sameni FK, Nourae M, Derakhshan MH, Tavangar SM, Mossaffa S, *et al.* A modification of the brunt system for scoring liver histology of patients with non-alcoholic fatty liver disease. Arch Iran Med. 2010. 13(1):38-44.
6. Tang LX, He RH, Yang G, Tan JJ, Zhou L, Meng XM. *et al.* Asiatic acid inhibits liver fibrosis by blocking TGF- β /smad signaling *in vivo* and *in vitro*. PlosONE.

2012. 7(2):1-13.
7. Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, Saha BP, Mukherjee PK. Curcumin-phospholipid complex: preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *Int. Journal of Pharmaceutic*. 2007. 330:155-63.
 8. Edward Z. Pemanfaatan fungsi antioksidan gambir (*Uncaria gambir*) sebagai hepatoprotektor. *Jurnal Riset Kimia*. 2009. 2(2):1-7.
 9. Amos L. Kandungan katekin gambir sentra produksi di Indonesia. *Jurnal Standardisasi*. 2010.12(3):149-55.
 10. Ningsih S, Fahrudin F, Rismana R, Purwaningsih EH, Sumaryono W, Jusman SWA. Evaluation of antilipid peroxidation activity of gambir extract on liver homogenat *in vitro*. *Int. J. PharmTech Res*. 2014. 6(3):982-9.
 11. Venukumar MR, Latha MS. Hepatoprotective effect of the methanolic of *Curculigo orchiooides* in CCl₄ treated male rats. *Indian Journal of Pharmacology*. 2002. 34:269-275.
 12. Jeon TI, Hwang SG, Park NG, Jung YR, Shin SI, Choi SD. *et al.* Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Toxicology*. 2003. 187:67-73.
 13. Tsai CF, Hsu YW, Ting HC, Huang CF, Yen CC. The *in vivo* antioxidant and antifibrotic properties of green tea (*Camellia sinensis*, Theaceae). *Food Chemistry*. 2013. 136:1337-44.
 14. Fahrudin F, Ningsih S, Solihin DD, Kusumorini N. Optimization study development animal model of liver fibrosis using a variety of dose level of carbon tetrachloride (CCl₄). *Proceedings of International Symposium on Medicinal Plant and Traditional Medicine*, Tawangmangu 4-6 Juni, 2014. (in press).
 15. Hayani E. Analisis kadar catechin dari gambir dengan berbagai metode. *Buletin Teknik Pertanian*. 2003. 8(1):31-3.
 16. Zainuri M, Wanandi SI. Aktivitas spesifik manganese superoxide dismutase (MnSOD) dan katalase pada hati tikus yang diinduksi hipoksia sistemik: hubungannya dengan kerusakan oksidatif. *Media Litbang Kesehatan*. 2012. 22(2):87-92.
 17. Inoue T, Ando K, Kikugawa K. Specific determination of malonaldehyde by *n*-methyl-2-phenylindole or thiobarbituric acid. *JAOCS*. 1998. 75(5):597-600.
 18. Mansour HH, Hafez HH, Fahmy NM. Silymarin modulates cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2006. 39(6):656-61.
 19. Humason GL. *Animal tissue techniques*. 3rd edition. San Fransisco: W.H. Freeman and Company; 1972. 173-7.
 20. Amic D, Davidovic-Amic D, Beslo D, Trinastjitic N. Structure-radical scavenging activity relationship of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*. 2003: 76(1).55-61.
 21. Winarsi H. *Antioksidan alami & radikal bebas*. Yogyakarta: Kanisius; 2007. 13-15.
 22. Sugihara N, Ohnishi M, Imamura M, Furuno K. Differences in antioxidative efficiency of catechin in various metal-induced lipid peroxidation in cultured heaptocytes. *Journal of Health Science*. 2001. 42(2): 99-106.
 23. Pembayun R, Gardjito M, Sudarmadji S, Kuswanto KR. Kandungan fenol dan sifat antibakteri dari berbagai jenis ekstrak produk gambir (*Uncaria gambir* Roxb.). *Majalah Farmasi Indonesia*. 2007. 18(3):141-6.
 24. Dias SA, Cardoso FP, Santini SMO, da Costa WF, Vidotti GJ, de Souza MC, *et al.* Free radical scavenging activity and chemical constituents of *Urvillea ulmaceae*. *Pharmaceutical Biology*. 2009: 47(8):717-20.
 25. Caillet S, Lorenzo G, Cote J, Sylvain JF, Laroxic M. free radical-scavenging properties and antioxidant activity of fractions from Cranberry products. *Food and Nutrition Science*. 2012. 3:337-47.
 26. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest*. 2005. 115:209-18.
 27. Di Sario A, Bendia E, Macarri G, Candelaresi C, Taffetani S, Marzioni M, *et al.* The anti-fibrotic effect of pirfenidone in rat liver fibrosis is mediated by downregulation of procollagen α 1(I), TIMP-1 and MMP-2. *Digestive and Liver Disease*. 2004. 36:744-51.
 28. Gumbira-Sa'id E, Syamsu K, Mardliyati E, Herryandie A, Evalina NA, Rahayu DL. *et al.* *Agroindustri dan bisnis gambir Indonesia*. Bogor: IPB Press; 2009.