

**Efek Hepatoprotektif Ekstrak Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness.) terhadap Gambaran Histopatologi Hepar Mencit (*Mus musculus* L.) yang Dipapar Timbal Asetat Per Oral**

**Hepatoprotective Effect of *Andrographis paniculata* Ness. Leaves Extract Towards Mice (*Mus musculus* L.) Liver Histopathology Which Exposed by Lead Acetate Orally**

**Deynara Septin Dwi Putri<sup>1</sup>, Lucia Tri Suwanti<sup>2</sup>, Dewa Ketut Meles<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

e-mail : deynaraseptin@gmail.com

**Abstract**

The aim of this study was to know the hepatoprotective effect of *Andrographis paniculata* Ness.leaves extract due to mice liver histopathological changes which exposed by lead acetate. The research used 25 mice (*Mus musculus* L.) aged 3 months with BW 20 g. These animals were divided into five groups (K-, K+, P1, P2 and P3). K- was treated with CMC Na 1%, K+ was treated with CMC Na 1% and lead acetate 100 mg/kg BW, P1 was treated with extract 3,54 mg/20 g BW and lead acetate 100 mg/kg BW, P2 was treated with extract 5,46 mg/20 g BW and lead acetate 100 mg/kg BW, P3 was treated with extract 7,40 mg/20 g BW and lead acetate 100 mg/kg BW. The extract was given in four weeks. Interval giving of *A. paniculata* Ness.leaves extract with lead acetate was 1 hour, during two weeks. The histopathological changes which observed were hydropic degeneration and hepatocyte necrose. The dataanalyzed with statistical test Kruskall Wallis, followedby Z test. The result showed that there were significant differences ( $P<0,05$ ) and *A. paniculata* Ness.leaves extract dose of 7,40 mg/20 g BW could provide optimal hepatoprotective effect.

**Keywords :** extract of *Andrographis paniculata* Ness.leaves, lead acetate, liverhistopathology, mice

**Pendahuluan**

Pencemaran logam berat termasuk timbal merupakan masalah yang serius di negara-negara maju maupun negara berkembang seperti Indonesia.Timbal sering juga menyebabkan keracunan pada hewan ruminansia. Rumput pakan ternak

yang terkontaminasi oleh timbal dari udara sering menyebabkan keracunan kronis, tetapi padang rumput yang terkontaminasi cemaran limbah peleburan logam ataupun limbah baterai/aki sering menyebabkan toksisitas akut. Pada hewan ruminansia gejala khas keracunan

Pb antara lain: Gastroenteritis, anemia dan ensephalopati. Hasil penelitian menunjukkan sapi yang mengalami keracunan Pb terjadi akumulasi pada jaringan hepar, ginjal dan otot (Darmono, 2001).

Salah satu organ yang mengalami perubahan akibat paparan timbal yang berlebihan adalah hepar. Organ ini terlibat dalam metabolisme zat makanan serta sebagian besar obat dan toksikan (Lu, 1995). Mekanisme kerusakan hepar yang diakibatkan oleh timbal adalah timbal dapat menginduksi pembentukan radikal bebas dan menurunkan kemampuan sistem antioksidan tubuh sehingga akan terjadi stres oksidatif (Gurer and Ercal, 2000).

Stres oksidatif menyebabkan katalisis peroksidasi asam lemak jenuh, reduksi pereduksi N-oxide, dan pembentukan radikal hidroksil. Perusakan sel oleh radikal bebas reaktif didahului oleh kerusakan membran sel antara lain mengubah fluiditas, struktur dan fungsi membran sel. Timbal merupakan senyawa lipofilik sehingga ketika timbal ditransfer ke hepar akan mudah berikatan dengan lipid dari membran sel hepar dan membentuk peroksidasi lipid. Fosfolipid yang menjadi unsur utama membran plasma seringkali menjadi subjek peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid yang berikatan dengan timbal akan meningkatkan permeabilitas membran dan mengganggu distribusi ion-ion sehingga mengakibatkan nekrosis dan kerusakan sel hepar (Sipos *et al.*, 2003). Timbal dalam hepar juga mengakibatkan gangguan oksidasi seluler yang akan mempengaruhi kebutuhan sel dalam mencapai keseimbangan cairan di dalam sel dan pada akhirnya akan terjadi akumulasi cairan dalam sel (Lu, 1995).

Sambiloto mengandung senyawa *andrographolide* yang mampu menangkal radikal bebas, sehingga mengurangi stres oksidatif dan pembentukan zat asam thiobarbiturat (Lin *et al.*, 2009). Pemberian

Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) meningkatkan aktivitas enzim-enzim antioksidan meliputi superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase dan glutathione yang menurun akibat pemberian benzene hexachloro cyclohexane (BHC) (Widyawati, 2007). Aktivitas hepatoprotektif suatu senyawa obat seringkali berkaitan dengan sifat senyawa tersebut sebagai agen antioksidan dan pemutus rantai radikal bebas. *Andrographolide* dimasukkan ke dalam golongan antioksidan pemutus rantai, yang memutuskan reaksi berantai peroksidasi lipid. Selain itu sambiloto juga mengandung flavonoid. Flavonoid adalah senyawa polifenol yang merupakan salah satu golongan antioksidan, suatu senyawa kimia yang dapat menghambat terjadinya proses oksidasi yang dipicu oleh radikal bebas (Kamdem dan Ho, 2002).

## Materi dan Metode Penelitian

### Alat dan Bahan Penelitian

Hewan coba yang digunakan adalahmencit putih (*Mus musculus* L.) berumur 3 bulan, sejumlah 25 ekor dengan berat badan 30gram.

Bahan yang diperlukan dalam pembuatanekstrak etanol sambiloto adalah tanaman sambiloto yang didapatkan dari Desa Sidowangi, Kecamatan Sukosewu, Kabupaten Bojonegoro, aquades steril, air, etanol teknis 96% untuk maserasi dan seterusnya hingga cairan hasil saringan terlihat bening, serta CMC Na 1% sebagai suspensator.

Bahan yang diperlukan untuk pembuatan preparat histopatologi hepar adalah larutan garam fisiologis (NaCl) 0,9%, untuk membersihkan organ hati, larutan formalin 10% untuk menyimpan organ agar tidak rusak, alkohol bertingkat (70%, 80%, 90% dan Alkohol absolut) untuk proses dehidrasi, parafin cair untuk proses infiltrasi, entellan (perekat transparan), *Haematoxylin-Eosin* untuk pewarnaan dan *xylol*

Bahan yang diperlukan untuk paparan timbal adalah Timbal Asetat  $Pb(C_2H_3O_2)_2$  dalam bentuk bubuk yang diencerkan dengan air hingga mencapai konsentrasi 5 mg/ml, Bahan lainnya adalah pakan hewan coba berupa pakan pellet produksi PT. Charoen Pokphand, air minum yang digunakan adalah air PDAM, dan dibutuhkan sekam sebagai alas kandang.

Peralatan yang digunakan untuk perlakuan adalah kandang mencit yang terbuat dari bahan plastik dengan ukuran 40 cm x 25 cm x 12 cm beserta tempat makan, tempat minum dan alas kandang, serta spuit 1 cc untuk pemberian terapi, sonde oral untuk pemberian ekstrak daun sambiloto secara peroral.

Peralatan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak etanol sambiloto adalah timbangan ohauss, blender, thermometer, *beaker glass*, gelas ukur, baskom plastik, toples kaca, cocong pisah, corong kaca, batang pengaduk, *rotavapor*, labu erlenmayer, cawan porselen, pompa *vacuum*, penyaring *Buchner*.

Peralatan yang digunakan untuk koleksi organ seperangkat alat bedah (gunting, pisau, *pinset steril* dan papan bedah), pot organ, *embedding machine*, mikrotom, *waterbath*, *processor*, *auto stainer*, inkubator, gelas ukur, gelas penutup dan gelas obyek, *disposable hand gloves*. Untuk pengamatan hasil dan perhitungan sel menggunakan mikroskop cahaya.

#### Metode Penelitian

Hewan coba mencit dipersiapkan dalam kandang yang terpisah. Penempatan dan penentuan perlakuan setiap hewan coba dilakukan dengan metode acak. Sebelum dilakukan penelitian, semua mencit dipelihara terlebih dahulu selama 5 hari dengan hanya diberi pakan dan minum *ad libitum* untuk penyesuaian.

Mencit dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dengan 5 pengulangan. Pada kelompok perlakuan K- dan K+ diberi

CMC Na 1%. Kelompok P1, P2 dan P3 diberi preventif ekstrak daun sambiloto dengan dosis yaitu P1 3,54 mg/20 g BB, P2 5,46 mg/20 g BB dan P3 7,40 mg/20 g BB selama 28 hari. Setelah hari ke 15, kelompok perlakuan K+, P1, P2 dan P3 diberi timbal asetat dengan dosis 100mg/kg BB sampai hari ke 28. Pada hari ke 30 dilakukan nekropsi untuk pengambilan organ hepar dan pembuatan preparat histopatologi hepar.

Pemeriksaan histopatologi hepar dilakukan dengan mengamati lesi pada lima lapangan pandang dengan vena sentralis berada ditengah-tengah lapang pandang dengan perbesaran 400x. Tingkat kerusakan pada hepar dinilai menggunakan metode skoring Brunt *et al.*, (1999) berdasarkan persen terjadinya degenerasi dan nekrosis (Tabel 1)

Tabel 1. skor penilaian derajat histopatologi sel hepar

	Degenerasi	Nekrosis
Tidak ada	0	0
Minimal (0-25%)	1	1
Ringan (25-50%)	2	2
Sedang (50-75%)	3	3
Berat (75-100%)	4	4

(sumber: Brunt *et al.*, 1999)

Data hasil penilaian preparat histopatologi hepar dianalisis menggunakan *software SPSS 22 for windows* dengan menggunakan *Kruskal Wallis test*, jika terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan dilanjutkan dengan *Z test* dengan taraf signifikan 0,05 untuk mengetahui perlakuan yang terbaik.

#### Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap gambaran histopatologi hepar didasarkan pada pengamatan pada tingkat sel dan jaringan. Perubahan-perubahan yang diamati pada penelitian ini adalah terjadinya degenerasi dan nekrosis sel hepar.

Tabel 2. Nilai mean tingkat degenerasi sel hepar

Perlakuan	Nilai Degenerasi	
	Mean Skor	Mean Rank $\pm$ SE
K-	0,5	4,20 <sup>c</sup> $\pm$ 0,120
K+	2,8	19,80 <sup>a</sup> $\pm$ 0,136
P1	2,5	18,40 <sup>a</sup> $\pm$ 0,136
P2	1,8	15,10 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,063
P3	1,0	7,50 <sup>b</sup> $\pm$ 0,075

a, ab, b, c : superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan

Berdasarkan perhitungan hasil uji statistik Kruskall Wallis terdapat perbedaan nyata ( $p<0,05$ ) pada tiap kelompok perlakuan, sehingga dilanjutkan dengan uji Z. Hasil mean rank kelompok kontrol K- (4,20) berbeda

nyata dengan kelompok kontrol K+ (19,80) kelompok perlakuan P1 (18,40) dan P2 (15,10), tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan P3 (7,50).

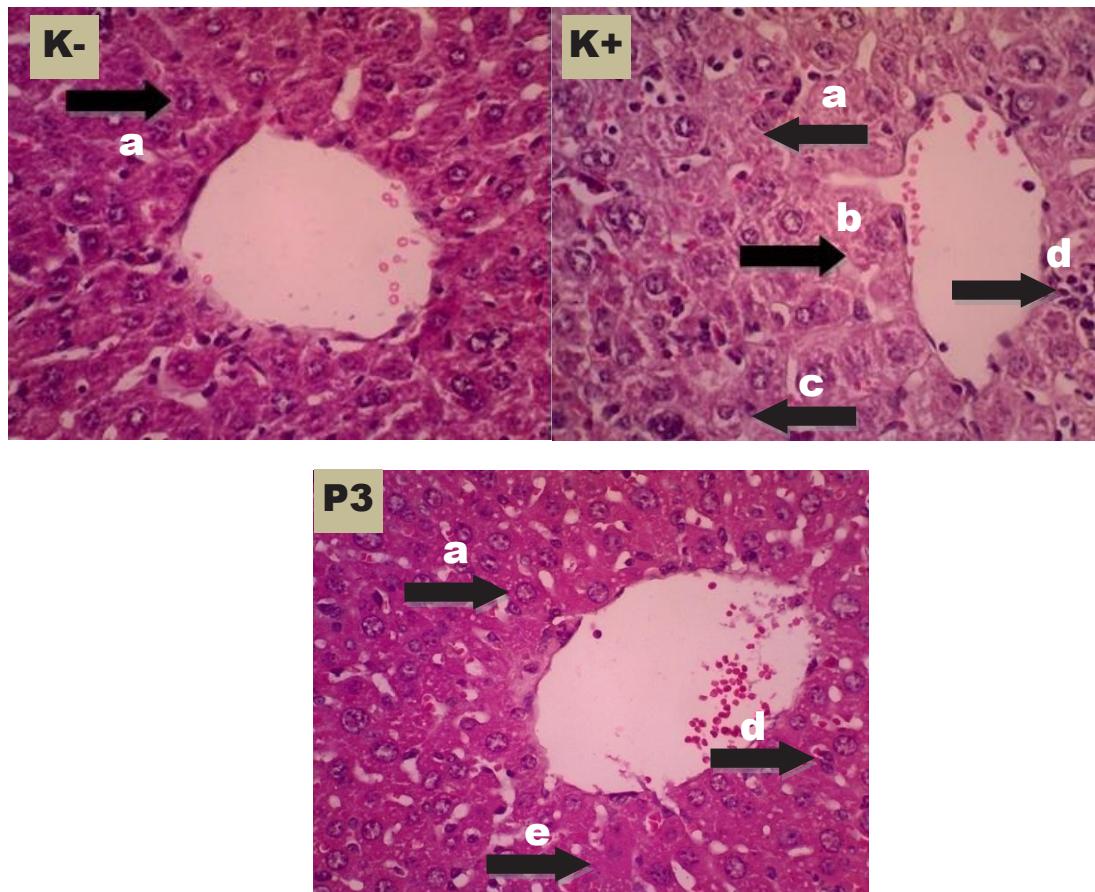
Tabel 3.Nilai mean tingkat nekrosissel hepar

Perlakuan	Nilai Nekrosis	
	Mean Skor	Mean Rank $\pm$ SE
K-	0,1	3,00 <sup>d</sup> $\pm$ 0,049
K+	2,2	22,70 <sup>a</sup> $\pm$ 0,098
P1	1,9	18,30 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,049
P2	1,5	13,00 <sup>bc</sup> $\pm$ 0,040
P3	0,7	8,00 <sup>c</sup> $\pm$ 0,080

a, ab, bc, c, d : superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan

Berdasarkan perhitungan hasil uji statistik Kruskall Wallis terdapat perbedaan nyata ( $p<0,05$ ) pada tiap kelompok perlakuan, sehingga dilanjutkan dengan uji Z. Hasil mean rank

kelompok kontrol K- (3,00) berbeda nyata dengan kelompok kontrol K+ (22,70) dan kelompok perlakuan P1 (18,30) tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan P2 (13,00), dan P3 (8,0).



Gambar 1. Histopatologi hepar.

(a) Inti sel hepar mencit normal, (b) sel hepar mengalami degenerasi hidrofik, (c) inti sel hepar mengalami piknotis, (d) karioreksis, (e) kariolisis (Pewarnaan HE, Perbesaran 400x)

Timbal dalam sel hepar dapat menginduksi pembentukan radikal bebas dan menurunkan kemampuan sistem antioksidan tubuh sehingga terjadi stres oksidatif. Menurut penelitian Jin *et al.*, (2008) Mencit yang diberi timbal asetat dengan dosis 100 mg/kg BB secara oral dapat memicu timbulnya stress oksidatif. Stres oksidatif memicu pembentukan radikal bebas yaitu *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat bereaksi dan menyebabkan kerusakan pada banyak molekul di dalam sel.

Pada perlakuan K<sup>+</sup> sel hepar menunjukkan tingkat degenerasi hidrofik yang parah. Hal ini dikarenakan radikal bebas yang terbentuk berikatan dengan lipid dari membran sel hepar dan membentuk peroksidasi lipid.

Konsekuensi penting dari peroksidasi lipid adalah meningkatnya permeabilitas membran yang dapat mengganggu proses pompa ion Ca<sup>2+</sup> dan hambatan terhadap proses pompa ion Na<sup>+</sup> dan K<sup>+</sup> di dalam sel sehingga terjadi degenerasi pada sel karena gangguan hemostasis (Krisnasari dkk, 2014).

Degenerasi hidrofik yang terjadi apabila terus menerus terpapar oleh radikal bebas dari timbal maka akan terjadi kematian sel yang bersifat irreversible atau yang biasa disebut nekrosis, akumulasi cairan di dalam intraseluler akan merusak fungsi organela sel di dalamnya seperti mitokondria. Terganggunya mitokondria sel hepar menyebabkan penurunan kecepatan resistensi ATP. Disfungsi mitokondria

menyebabkan suplai ATP atau energi menuju nukleus terhenti dan terjadilah nekrosis (Gunawan dan Sumadiono, 2007).

Pemberian preventif ekstrak daun sambiloto dengan dosis 7,40 mg/20 g BB pada kelompok perlakuan P3 terbukti mampu memberikan penurunan yang signifikan untuk degenerasi dan nekrosis sel hepar. Sambiloto mengandung senyawa *Andrographolide* yang dapat meningkatkan aktivitas enzim superoxide dismutase, catalase dan glutathione peroxidase Enzim-enzim tersebut berperan menangkal radikal bebas, sehingga mengurangi stres oksidatif. Zat *Andrographolide* dalam ekstrak etanol daun sambiloto dapat menghambat pembentukan radikal bebas dan peroksidase lipid sebesar 80% (Sheeja *et al*, 2006). Terhambatnya peroksidase lipid pada membran dapat mencegah terjadinya kerusakan sel hepar.

Sambiloto juga mengandung flavonoid. Senyawa flavonoid berperan dalam aktivitas antioksidan, yaitu dengan menghambat dihasilkannya agen oksidatif seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) oleh sel darah perifer, atau dengan menghambat paparan oksidatif dalam tubuh yang melindungi lipid dan protein agar tidak berubah menjadi lipid peroksid. Kedua mekanisme itu membuat flavonoid memiliki beberapa efek, diantaranya menghambat peroksidase lipid, menahan kerusakan jaringan oleh radikal bebas (Krisnatuti dan Yenrina, 2005). Menurut penelitian Wardatun (2011) ekstrak etanol daun sambiloto pada konsentrasi 0,5%, memiliki daya antioksidan sebesar 76,63%. Daya antioksidan menggambarkan besarnya potensi ekstrak untuk berperan sebagai antioksidan. Antioksidan yang ada dapat meredam dampak negatif dari oksidan dengan cara memberikan elektronnya pada oksidan, antioksidan tersebut mampu mencegah dan meregenerasi kerusakan sel akibat radikal bebas (Widjaja, 1997).

## Kesimpulan

Pemberian ekstrak daun sambiloto memberikan efek hepatoprotektif dan pada dosis 7,40 mg/20 g BB paling baik memproteksi sel hepar dari kerusakan akibat paparan timbal asetat.

## Daftar Pustaka

- Brunt, E.M., C.G. Janney, A.M. Di Bisceglie, B.A. Neuschwander-Tetri and B.R. Bacon. 1999. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging the Histological Lesions. American Journal of Gastroenterology. 94: 2467-2474.
- Darmono. 2001. Lingkungan Hidup dan Pencemaran: Hubungannya dengan Toksikologi Senyawa Logam. Universitas Indonesia Press. Jakarta. 112,140,179.
- Gunawan, B. dan Sumadiono. 2007. Stress dan Sistem Imun Tubuh. Suatu Pendekatan Psikoneuroimunologi. Majalah Cermin Kedokteran No. 154.
- Gurer, H. and N. Ercal. 2000. Can Antioxidants be Beneficial in The Treatment Of Lead Poisioning?. Free Radic Biol Med. 29(10): 927-945.
- Jin, X., L. Ling-jun, W. Chen, W. Xiaofeng, F. Wen-yuand X. Li-hong. 2008. Lead Induces Oxidative Stress, DNA Damage And Alteration Of P53,Bax and Bcl-2 Expressions In Mice. Food and Chemical Toxicology 46.1488–1494.
- Kamdem, R.E. and C.T. Ho. 2002. Transfer Allylic Hydrogen as the Antioxidant Mechanism of Diterpene Lacton Andrographolide. In: Session: Neutraceuticals and Functional Foods, Anual Meeting And Food Expo. (84): 11.
- Krisnatuti, D. dan S, Yenrina. 2005. Menyiapkan Makanan Pendamping Asi. Pustaka Swara. Jakarta.

- Krisnasari D., K. Diah, S. Hidayat, dan R.B.A. Viva. 2014. Efek Propolis Terhadap Fungsi dan Perlemakan Hati Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Model Hiperkolesterolemia. Jurusan Kedokteran FKIK. Universitas Jendral Soedirman. Purwokerto
- Lin, F.L., S.J. Wu, S.C. Lee and L.T. Ng. 2009. Antioxidant, antioedema and analgesic activities of *Andrographis paniculata* extracts and their active constituent andrographolide. *Phytotherapy Research.* 23(7): 958–964.
- Lu, F.C. 1995. Toksikologi Dasar: Azaz, Organ Sasaran dan Penilaian Resiko, Edisi 2. Universitas Indonesia Press. Jakarta. 350-360.
- Sheeja K, P.K. Shihab, G. Kuttan. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the plant *Andrographis paniculata* Nees. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2006;28:129-40.
- Sipos, P.K. Szentmihalyi, E.Feher, M. Abaza, M. Szilagyi and A. Blazovics. 2003. Some Effects of Lead Contamination on Liver and Gallbladder Bile. *Acta Biologica Szegediensis.* 47(1-4): 139-142.
- Wardatun, S. 2011. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Akar, Kulit Batang Dan Daun Tanaman Sambiloto (*Andrographis Paniculata* Ness.) Dengan Metode Linoleat – Tiosianat. *Fitofarmaka.* 1(2): 13.
- Widjaja S. 1997. Antioksidan: Pertahanan Tubuh Terhadap Efek Oksidan dan Radikal Bebas. *Maj. Ilm. Fak. Kedokt. Usakti.* 16(1): 162.
- Widyawati, T. 2007. Aspek Farmakologi Sambiloto (*Andrographis Paniculata* Nees.). Majalah Kedokteran Nusantara. 40(3): 216-218.