

153

LIT

Tawangmangu

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

**Studi Praklinik Potensi Hepatoprotektif Ramuan Jamu
(Rimpang Temulawak, Rimpang Kunyit,
dan Herba Jombang)**



Sari Haryanti, M.Sc., Apt

**BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN
TANAMAN OBAT DAN OBAT TRADISIONAL**

Jalan Raya Lawu No 11 Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah

Telepon (0271)697010, Fax (0271)697451

E-mail: b2p2to2t@gmail.com, b2p2to2t@litbang.depkes.go.id

2012

LAPORAN AKHIR PENELITIAN

Studi Praklinik Potensi Hepatoprotektif Ramuan Jamu (Rimpang Temulawak, Rimpang Kunyit, dan Herba Jombang)



Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan	
PERPUSTAKAAN	
Tanggal :	<hr/>
No. Induk :	<hr/>
No. Klass :	<hr/> 153 LIT Tawangmangu.

Sari Haryanti, M.Sc., Apt

BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN TANAMAN OBAT DAN OBAT TRADISIONAL

Jalan Raya Lawu No 11 Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah

Telepon (0271)697010, Fax (0271)697451

E-mail: b2p2to2t@gmail.com, b2p2to2t@litbang.depkes.go.id

2012



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN

TANAMAN OBAT DAN OBAT TRADISIONAL

Jalan Raya Lawu No. 11 Tawangmangu, Karanganyar, Surakarta, Jawa Tengah

Telepon: (0271) 697010 Faksimile: (0271) 697451

E-mail: b2p2to2t@litbang.depkes.go.id Website: <http://www.b2p2to2t.litbang.depkes.go.id>

SURAT KEPUTUSAN
KEPALA BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN
TANAMAN OBAT DAN OBAT TRADISIONAL
BADAN LITBANG KESEHATAN
NO. HK.03.07/3/242j/2011

Tentang

STUDI PRAKLINIK POTENSI HEPATOPROTEKTIF RAMUAN JAMU

MENIMBANG

- : 1. Bahwa penyakit akibat kerusakan hati dapat terjadi di segala usia, yang prevalensi terus meningkat.
- : 2. Bahwa banyak taraman obat yang secara empiris disebutkan memiliki khasiat untuk melindungi hati dari kerusakan
- : 3. Bahwa ramuan tanaman yang dinyatakan berkhasiat untuk mengobati kerusakan hati perlu diuji khasiatnya melalui uji praklinik
- : 4. Bahwa mereka yang namanya tercantum dalam Surat Keputusan ini dipandang cukup cakap untuk melaksanakan penelitian tersebut.

MENGINGAT

- : 1. Undang-undang No. 18 Tahun 2001 tentang Sistem Nasional Penelitian, Pengembangan dan Penerapan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi.
- : 2. Peraturan Pemerintah Nomor 39 Tahun 1995 tentang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
- : 3. Surat Persetujuan Pelaksanaan Penelitian No: LB.01.07/3/168j/2011 tanggal 26 Januari 2011, tentang Studi Praklinik Potensi Hepatoprotektif Ramuan Jamu
- : 4. Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional tahun Anggaran 2011, No. 0811/024-11.2.01/XIII/2011 tanggal 20 Desember 2010, Program Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi.

MEMUTUSKAN

MENETAPKAN

Pertama

- : Membentuk Tim Pelaksana Penelitian Studi praklinik Potensi Hepatoprotektif Ramuan Jamu

- | | | |
|----------------------|---|---|
| 1. Ketua Pelaksana | : | Sari Haryanti, M.Sc., Apt. |
| 2. Peneliti | : | drh. Galuh Ratnawati
Awal Pritchati KD, M.Sc., Apt |
| 3. Pembantu Peneliti | : | Sulis Prasetyo
Supamo
Endang Brotojoyo, Amd |
| 4. Administrasi | : | Sarwono |



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN

TANAMAN OBAT DAN OBAT TRADISIONAL

Jalan Raya Lawu No. 11 Tawangmangu, Karanganyar, Surakarta, Jawa Tengah

Telepon: (0271) 697010 Faksimile: (0271) 697451

E-mail: b2p2t@litbang.depkes.go.id Website: <http://www.b2p2t.litbang.depkes.go.id>

Kedua

Tim bertugas:

- Melaksanakan penelitian sampai selesai dengan menyerahkan laporan kepada Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional sesuai dengan Surat Persetujuan Peiaksanaan Penelitian.
- Membuat pertanggung jawaban penggunaan anggaran sesuai ketentuan yang berlaku.

Ketiga

Semua pengeluaran untuk pelaksanaan Surat Keputusan ini dibebankan pada DIPA Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional tahun anggaran 2011 sesuai peraturan yang berlaku.

Keempat

Surat Keputusan ini berlaku sejak tanggal 1 Februari 2011 sampai dengan 31 Desember 2011, dengan catatan segala sesuatu akan ditinjau kembali apabila di kemudian hari ternyata terdapat kekeliruan dalam penetapan ini.

Ditetapkan di : Tawangmangu
Pada Tanggal : 8 Februari 2011

A.n. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Kepala Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan
Obat Tradisional



Surat Keputusan ini disampaikan Kepada Yth:

- Kepala Badan Litbang Kesehatan, Kemenkes RI
- Inspektur Jenderal Kemenkes RI
- Sekretaris Jenderal Kemenkes RI
- Kepala Biro Keuangan dan Perlengkapan Set. Jend. Kemenkes RI
- Kepala Kantor Pelayanan Perbendaharaan Negara Slagen
- Bendahara Pengeluaran Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional
- Yang bersangkutan



KEMENTERIAN KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
Jalan Peretak Negara No. 29 Jakarta 10560 Kotak Pos 1226
Telepon: (021) 4261088 Faksimile: (021) 4243933
E-mail: scsban@litbang.depkes.go.id, Website: http://www.litbang.depkes.go.id

PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL APPROVAL)

Nomor : KE. 01.08 / EEC / 496 / 2011

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul :

"Studi Praklinik Potensi Hepatoprotektif Ramuan Jamu"

yang mengikutsertakan hewan percobaan sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana / Peneliti Utama :

Sari Haryanti, M.Sc., Apt.

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 12 Agustus 2011

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,



Prof. Dr. M. Sudomo

RINGKASAN EKSEKUTIF

Hati merupakan organ yang sangat rentan dan peka terhadap serangan senyawa asing yang berakibat pada kerusakan/disfungsi hati. Penyakit hati dapat terjadi pada manusia di segala usia dan salah satu penyebab utama kematian saat ini. Kerusakan hati utamanya disebabkan paparan senyawa kimia yang bersifat hepatotoksik seperti CCl₄, parasetamol (dosis besar), konsumsi alkohol yang berlebihan. Senyawa hepatotoksik merusak sel hati melalui induksi peroksidasi lipid dan kerusakan oksidatif lainnya. Saat ini belum tersedia obat modern yang efektif dalam menstimulasi fungsi hati, melindungi hati dari kerusakan, atau membantu meregenerasi sel-sel hati. Oleh karena itu, masih diperlukan pengembangan pengobatan alternatif yang efektif dan aman. Tanaman obat merupakan salah satu sumber utama dalam eksplorasi penemuan senyawa baru, termasuk senyawa untuk menanggulangi penyakit hati.

Secara empiris, masyarakat menggunakan campuran/ramuan beberapa tanaman obat untuk menjaga kesehatan hati. Ramuan tersebut adalah rimpang temulawak dan kunyit, serta herba jombang. Komponen ramuan tersebut secara tunggal telah terbukti secara ilmiah memiliki aktivitas hepatoprotektif, namun belum ada data dalam bentuk ramuan. Penelitian ini mengkaji potensi hepatoprotektif dan keamanan ramuan tersebut secara praklinik serta mengetahui profil KLT ramuan. Ramuan yang diuji dalam bentuk infusa. Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih galur Wistar jantan dan betina yang diinduksi dengan hepatotoksin parasetamol dosis 500 mg/kg bb, diberikan sekali sehari selama tujuh hari. Ramuan jamu dan standar silimarin diberikan bersamaan dengan parasetamol. Potensi hepatoprotektif ditetapkan dengan menggunakan parameter aktivitas enzim hati, yaitu SGPT, SGOT, ALP, serta kadar MDA dan bilirubin. Selain itu diamati juga gambaran sel-sel hati secara histopatologi menggunakan pengecatan HE. Keamanan ramuan ditetapkan menggunakan uji toksisitas akut dan subkronis. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi khasiat dan keamanan ramuan, serta memberikan alternatif dalam pengobatan dan pencegahan gangguan fungsi hati.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Parasetamol dosis 500 mg/kg bb yang diberikan sekali sehari pada tikus selama 7 hari dapat meningkatkan kadar serum SGPT,

SGOT, MDA dan ALP sebagai indikator terjadinya kerusakan sel hati. Ramuan jamu rimpang temulawak, rimpang kunyit dan herba jombang yang diberikan pada tikus dapat menghambat kenaikan kadar SGPT, SGOT, MDA dan ALP. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ramuan jamu tersebut memiliki aktivitas hepatoprotektif. Berdasarkan hasil uji toksitas akut, ramuan jamu tersebut termasuk ke dalam kategori praktis tidak toksik. Dosis tertinggi yang masih dapat diberikan adalah 100 g/kg bb. Pemberian ramuan jamu dosis 1000, 2000 dan 4000 mg/kg bb memberikan perubahan yang tidak berbeda nyata dengan kontrol tanpa perlakuan, terhadap parameter yang diukur yaitu SGPT, SGOT, BUN, ureum dan kreatinin serta gambaran makroskopis dan mikroskopis organ jantung, paru, hati, ginjal, lambung dan limpa serta ditambah uterus pada tikus betina.

Salah satu parameter mutu yang digunakan untuk mengetahui profil senyawa kimia yang ada dalam ramuan jamu adalah dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Profil KLT dengan tiga jenis eluen yang digunakan memperlihatkan senyawa dalam ramuan dapat terpisah dengan baik. Berdasarkan hasil optimasi menggunakan 3 metode preparasi dan 3 jenis eluen, profil ramuan jamu paling baik menggunakan metode kombinasi ekstraksi dilanjutkan infusa, menggunakan eluen toluen:eter (5:5).. Berdasarkan data praklinik yang dihasilkan, ramuan jamu yang digunakan cukup potensial dikembangkan sebagai agent hepatoprotektif.

ABSTRAK

Hati adalah pusat metabolisme serta ekskresi metabolit berbagai jenis bahan makanan dan obat. Hal tersebut menyebabkan hati menjadi organ yang sangat rentan dan peka terhadap serangan senyawa asing yang berakibat pada kerusakan/disfungsi hati. Saat ini belum tersedia obat modern yang efektif dalam menstimulasi fungsi hati, melindungi hati dari kerusakan, atau membantu meregenerasi sel-sel hati. Oleh karena itu, masih diperlukan pengembangan pengobatan alternatif yang efektif dan aman. Tanaman obat merupakan salah satu sumber utama dalam eksplorasi penemuan senyawa baru, termasuk senyawa untuk menanggulangi dan mencegah terjadinya penyakit hati (hepatoprotektif).

Penelitian ini mengkaji efek hepatoprotektif, toksisitas akut dan subkronis serta profil KLT ramuan rimpang temulawak, rimpang kunyit dan herba jombang (5:2:1) pada tikus galur Wistar. Kerusakan hati diinduksi dengan parasetamol dosis 500 mg/kg bb sekali sehari selama 7 hari. Ramuan jamu dosis 1000, 2000, 4000 dan 8000 mg/kg bb serta standard silimarin 100 mg/kg bb diberikan bersamaan dengan parasetamol.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Parasetamol dosis 500 mg/kg bb yang diberikan sekali sehari pada tikus selama 7 hari dapat meningkatkan kadar serum SGPT, SGOT, MDA dan ALP sebagai indikator terjadinya kerusakan sel hati. Ramuan jamu rimpang temulawak, rimpang kunyit dan herba jombang yang diberikan pada tikus dapat menghambat kenaikan kadar SGPT, SGOT, MDA dan ALP. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ramuan jamu tersebut memiliki aktivitas hepatoprotektif. Berdasarkan hasil uji toksisitas akut, ramuan jamu tersebut termasuk ke dalam kategori praktis tidak toksik. Dosis tertinggi yang masih dapat diberikan adalah 100 g/kg bb. Pemberian ramuan jamu dosis 1000, 2000 dan 4000 mg/kg bb memberikan perubahan yang tidak berbeda nyata dengan kontrol tanpa perlakuan, terhadap parameter yang diukur yaitu SGPT, SGOT, BUN, ureum dan kreatinin. Berdasarkan hasil optimasi menggunakan 3 metode preparasi dan 3 jenis eluen, profil ramuan jamu paling baik menggunakan metode kombinasi ekstraksi dilanjutkan infusa, menggunakan eluen toluen:eter (5:5).

Berdasarkan data praklinik yang dihasilkan, ramuan jamu yang digunakan cukup potensial dikembangkan sebagai agent hepatoprotektif.

SUSUNAN TIM PENELITIAN

No	Nama	Bidang kepakaran	Kedudukan dalam tim	Uraian Tugas
1.	Sari Haryanti, M.Sc., Apt	Farmasi	Peneliti Utama	Bertanggung jawab pada keseluruhan kegiatan penelitian
2.	drh. Galuh Ratnawati	Dokter Hewan	Peneliti I	Bertanggungjawab pada pelaksanaan uji hepatoprotektif
3.	Awal Prichatin KD, M.Sc., Apt	Farmasi	Peneliti III	Bertanggungjawab pada pelaksanaan uji toksisitas akut dan subkronis
4.	Endang Brotojoyo	Litkayasa	Tenaga pendukung	Membantu pelaksanaan ekstraksi
5.	Suparno, S.Pd	Litkayasa	Tenaga pendukung	Membantu pelaksanaan pembuatan simplisia dan pelaksanaan uji aktivitas
6.	Sulis Prsetyo	SMA	Tenaga pendukung	Membantu pemeliharaan hewan uji dan kebersihan kandang
7.	Sarwono	SMA	Tenaga Administrasi	Membantu kelancaran administrasi

KATA PENGANTAR

Kinerja B2P2TO-OT diukur melalui tiga indikator output yaitu tanaman obat terstandar, formula jamu terstandar, dan publikasi hasil litbang yang diterbitkan dalam media cetak dan elektronik. Ketiga indikator tersebut dicapai melalui beberapa tahapan penelitian. Formula Jamu terstandar diperoleh dengan melakukan penelitian pra klinik menggunakan hewan coba dilanjutkan uji klinik. Penelitian yang telah dilakukan harus dapat dipertanggungjawabkan secara finansial dan substansi.

Laporan Akhir ini disusun sebagai wujud pertanggungjawaban penelitian dengan judul Studi Praklinik Potensi Hepatoprotektif Jamu (Ramuan Temulawak, Kunyit dan Jombang). Penelitian ini mengkaji aktivitas dan toksisitas ramuan Jamu sebagai hepatoprotektor. Hasil penelitian praklinik digunakan sebagai dasar pelaksanaan penelitian uji klinik sehingga diperoleh ramuan Jamu hepatoprotektor yang aman dan berkhasiat. Selanjutnya, diperoleh *evidence based data* sebagai landasan pemanfaatan jamu dalam pelayanan kesehatan formal.

Kami menyadari bahwa laporan ini jauh dari sempurna, walaupun kami telah berusaha semampu yang kami bisa. Saran, kritik dan masukan sangat kami harapkan sehingga laporan ini dapat memberikan sumbangsih dalam mewujudkan Jamu sebagai brand Indonesia dan berjaya di negeri sendiri.

Februari 2011

Penyusun

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
SK Penelitian	ii
Persetujuan Etik	iii
Ringkasan Eksekutif	v
Abstrak	vi
Susunan Tim Penelitian	viii
Kata Pengantar	ix
Daftar Isi	x
Daftar Gambar	ix
Daftar Tabel	xii
Bab I. Pendahuluan	1
Bab II. Manfaat Dan Tujuan Penelitian	5
Bab III. Metode Penelitian	6
Bab IV. Hasil Penelitian	13
Bab V. Pembahasan	21
Bab VI. Kesimpulan dan Saran	43
Ucapan Terima Kasih	44
Daftar Pustaka	45
Lembar Pengesahan	46
Lampiran	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Bahan penelitian potensi hepatoprotektif ramuan jamu, dari kiri ke kanan: temulawak (<i>Curcuma xanthorrhiza</i>), jombang (<i>Taraxacum officinale</i>), dan kunyit (<i>Curcuma longa</i>)	5
Gambar 2.	Kerangka konsep penelitian	7
Gambar 3.	Kurva baku standard MDA sebelum perlakuan pada tikus jantan (kiri) dan betina (kanan)	15
Gambar 4.	Kurva baku MDA setelah perlakuan, pada tikus jantan (kiri) dan betina (kanan)	16
Gambar 5.	Gambaran peningkatan kadar ALP berbanding waktu	19
Gambar 6.	Gambaran histologi hepar tikus jantan dengan pengecatan HE setelah perlakuan sesuai kelompoknya	22
Gambar 7.	Gambaran histologi hepar tikus betina dengan pengecatan HE setelah perlakuan sesuai kelompoknya	23
Gambar 8.	Gambaran histologi organ lambung, hepar, dan ginjal tikus jantan dengan pengecatan HE setelah perlakuan sesuai kelompoknya (perbesaran 400x)	29
Gambar 9.	Gambaran histologi organ jantung, paru, dan limpa tikus jantan dengan pengecatan HE setelah perlakuan sesuai kelompoknya (perbesaran 400x)	30
Gambar 10.	Gambaran histologi organ lambung, hepar, dan ginjal tikus betina dengan pengecatan HE setelah perlakuan sesuai kelompoknya (perbesaran 400x)	31
Gambar 11.	Gambaran histologi organ jantung, paru, dan limpa tikus betina dengan pengecatan HE setelah perlakuan sesuai kelompoknya (perbesaran 400x)	32
Gambar 12.	Gambaran histologi organ uterus tikus betina dengan pengecatan HE setelah perlakuan sesuai kelompoknya (perbesaran 400x)	33
Gambar 13.	Profil KLT dengan 3 jenis eluen, dari atas ke bawah: kloroform; toluen:eter (5 : 5); dan kloroform:etanol:asam asetat (94:5:1) ..	34
Gambar 14.	Pengaruh perlakuan ramuan jamu terhadap kadar MDA pada tikus jantan (atas) dan tikus betina (bawah)	36
Gambar 15	Korelasi peningkatan level ALP dengan dosis ramuan jamu yang diberikan pada tikus jantan	37
Gambar 16	Pengaruh perlakuan ramuan jamu dan silimarin terhadap kadar ALP pada tikus betina yang diinduksi parasetamol	37
Gambar 17	Perubahan kadar SGPT dan SGOT pada tikus jantan karena induksi parasetamol	38
Gambar 18	Perubahan kadar SGPT dan SGOT pada tikus betina karena induksi parasetamol	39
Gambar 19	Histologi sel hati pada kelompok kontrol dan perlakuan ramuan jamu	40
Gambar 20	Peningkatan berat badan tikus selama 90 hari perlakuan	41
	Profil KLT ramuan jamu dengan 3 jenis eluen, dari kiri ke kanan: klorofor m, toluen:eter (5:5), dan kloroform:etanol:asam asetat (94:5:1)	42

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Perhitungan dosis yang digunakan berdasarkan hasil penelitian ekstrak tunggal disetarakan dengan bentuk sediaan infusa	8
Tabel 2.	Absorbansi/serapan serum untuk pengukuran MDA sebelum	15
Tabel 3.	Absorbansi serum untuk pengukuran MDA setelah perlakuan	
Tabel 4.	Hasil perhitungan kadar MDA serum sebelum dan setelah perlakuan pada tikus jantan	17
Tabel 5.	Hasil perhitungan kadar MDA serum sebelum dan setelah perlakuan pada tikus betina	18
Tabel 6.	Kadar Alkaline Phosphatase (ALP IU/L) pada tikus sebelum dan setelah perlakuan	19
Tabel 7.	Kadar rata-rata SGOT, SGPT, dan bilirubin sebelum dan setelah perlakuan	20
Tabel 8.	Berat organ hati (gram) setelah 8 hari perlakuan sesuai kelompoknya	21
Tabel 9.	Uji toksisitas akut tidak menyebabkan kematian pada tikus	24
Tabel 10.	Perubahan kadar SGOT, SGPT, BUN, ureum dan kreatinin pada hari ke-0 (sebelum perlakuan) dosis 8000 mg/kg bb	24
Tabel 11.	Perubahan kadar SGOT, SGPT, BUN, ureum dan kreatinin pada hari ke-0 (sebelum perlakuan) dosis 4000 mg/kg bb	25
Tabel 12.	Perubahan kadar SGOT, SGPT, BUN, ureum dan kreatinin pada hari ke-0 (sebelum perlakuan) dosis 2000 mg/kg bb	26
Tabel 13.	Perubahan kadar SGOT, SGPT, BUN, ureum dan kreatinin pada hari ke-0 (sebelum perlakuan) pada kelompok kontrol tanpa perlakuan	26
Tabel 14.	Perubahan berat badan tikus sebelum dan sesudah perlakuan	27
Tabel 15.	Pengaruh perlakuan ramuan jamu dan silimarin terhadap kadar ALP pada tikus betina yang diinduksi parasetamol	37

BAB I

PENDAHULUAN

Liver/hati/hepar merupakan organ penting dalam tubuh, berperan dalam regulasi berbagai proses fisiologi dan fungsi vital tubuh seperti metabolisme, sekresi, dan penyimpanan. Hati memelihara dan mengatur homeostatis tubuh, terlibat dalam hampir semua jalur biokimia pertumbuhan, perlawanannya terhadap penyakit, asupan makanan, persediaan energi serta reproduksi (Adewusi and Afolayan, 2010). Hati adalah pusat metabolisme serta ekskresi metabolit berbagai jenis bahan makanan seperti karbohidrat, protein dan lipid. Metabolisme obat dan ekskresi obat serta xenobiotik lainnya juga terjadi di dalam hati (Saleem *et al.*, 2010). Hal tersebut menyebabkan hati menjadi organ yang sangat rentan dan peka terhadap serangan senyawa asing yang berakibat pada kerusakan/disfungsi hati (Adewusi and Afolayan, 2010).

Penyakit hati dapat terjadi pada manusia di segala usia dan salah satu penyebab utama kematian saat ini. Berdasarkan estimasi WHO, terdapat 170 juta orang terinfeksi hepatitis C kronis dan 5 juta orang menderita HBV akut, dan akan terus bertambah hingga 3-4 juta orang per tahun (Negi *et al.*, 2007). Kerusakan hati utamanya disebabkan paparan senyawa kimia yang bersifat hepatotoksik seperti Carbon tetraklorida (CCl_4), parasetamol (dosis besar), konsumsi alkohol yang berlebihan, infeksi dan gangguan autoimun. Senyawa hepatotoksik merusak sel hati melalui induksi peroksidasi lipid dan kerusakan oksidatif lainnya (Adewusi and Afolayan, 2010).

CCl_4 merupakan salah satu senyawa yang paling lama dan paling sering digunakan sebagai toksin dalam penelitian untuk menginduksi terjadinya kerusakan hati menggunakan hewan uji. CCl_4 selektif sebagai senyawa hepatotoksik melalui pembentukan radikal bebas reaktif kemudian menginisiasi terjadinya kerusakan sel hati. Dua mekanisme berbeda terlibat dalam menyebabkan kerusakan sel hati oleh CCl_4 , yaitu membentuk ikatan kovalen dengan membran protein dan peroksidasi lipid (Kanter *et al.*, 2005). CCl_4 tergolong dalam bahan kimia sangat berbahaya. Kontak langsung maupun inhalasi akan menyebabkan keracunan tingkat berat yang dapat menyebabkan kematian. Keberadaannya di udara dapat mencemari lingkungan dan merusak lapisan ozon. Hal tersebut menjadikan peredaran CCl_4 sangat ketat, bahkan dilarang masuk di berbagai negara, termasuk Indonesia.

Senyawa hepatotoksin lainnya adalah parasetamol, obat analgesik dan antipiretik yang umum digunakan. Parasetamol dosis tinggi (≥ 1 g/kg BB per oral) mengakibatkan kerusakan hati akut, berupa nekrosis pada hepatocytes sentrilobular. Karakteristik kerusakan berupa piknosis dan sitoplasma eosinofilik berlanjut pada lesi organ hati yang sangat parah. Produk oksidatif parasetamol yaitu N-asetil-P-benzoquinone imine (NAPQI), dapat berikatan kovalen dengan gugus sulphydryl protein menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dan nekrosis (Deshwal *et al.* 2011).

Saat ini belum tersedia obat modern yang efektif dalam menstimulasi fungsi hati, melindungi hati dari kerusakan, atau membantu meregenerasi sel-sel hati. Oleh karena itu, masih diperlukan pengembangan pengobatan alternatif yang efektif dan aman. Tanaman obat merupakan salah satu sumber utama dalam eksplorasi penemuan senyawa baru, termasuk senyawa untuk menanggulangi penyakit hati (Adewusi *and* Afolayan, 2010). *Silybum marianum* (silibum), berasal dari family Asteraceae, merupakan salah satu tanaman tertua yang digunakan dalam pengobatan penyakit hati dan terus diteliti secara berkesinambungan hingga sekarang (Pradhan *and* Girish, 2006). Tanaman ini telah dimanfaatkan selama lebih dari 2000 tahun untuk mengatasi berbagai gangguan hati dan kandung empedu, termasuk hepatitis, sirosis, dan ikterus. Biji silibum memiliki aktivitas melindungi dan membersihkan hati dari senyawa toksik seperti alkohol, obat, merkuri dan logam berat lainnya, serta pestisida (Negi, *et al.*, 2008).

Komponen aktif silibum terdiri atas flavonolignan, yang mengandung 70-80% silymarin dan 20-30% fraksi polymerik dan polifenol teroksidasi. Silymarin tidak larut dalam air, biasanya dibuat dalam sediaan kapsul yang berisi ekstrak terstandard (70-80% silymarin) (Radko *and* Cybulski, 2007). Senyawa utama dalam silymarin adalah silybinin (60-70%), silydianin dan silychristine. Walaupun seluruh bagian tanaman digunakan dalam pengobatan, tetapi kandungan silymarin tertinggi terdapat dalam biji (1.5-3%). Silymarin menunjukkan level toksisitas yang sangat rendah dengan LD₅₀ per oral pada mencit 20g/kg bb; per intra vena 400mg/kg bb mencit dan 385mg/kg bb (Negi, *et al.*, 2008). Aktivitas hepatoprotektif silymarin didukung oleh mekanisme aksi yang kompleks. Berbagai penelitian menyimpulkan bahwa aktivitas tersebut terutama didukung oleh kemampuan silymarin sebagai antioksidan dan berfungsi dalam

percepatan regenerasi sel melalui peningkatan sintesis protein (Pradhan and Girish, 2006). Silymarin berpengaruh terhadap komposisi membran lipid dengan menghambat sintesis kolesterol dan beberapa fosfolipid, seperti fosfatidilkolin dan fosfatidiletanolamin, sehingga integritas membran dapat terjaga. Silymarin juga dapat secara langsung menstabilisasi membran plasma yang terpapar stress mekanik dan kimiawi (Khabiya and Joshi, 2010).

Silimarín merupakan tanaman introduksi dari Eropa, sebagai salah satu contoh sukses pengembangan obat modern berdasarkan informasi empiris sehingga layak digunakan sebagai pembanding dalam penelitian ini (Negi *et al.*, 2008). Tanaman tersebut belum banyak dibudidayakan di Indonesia. Beberapa tanaman berpotensi hepatoprotektif yang sudah dibudidayakan dan tumbuh baik secara luas di wilayah Indonesia adalah kunyit, temulawak dan jombang. *Circuma longa* (kunyit) termasuk dalam family Zingiberaceae, dengan kandungan utama curcumin. Curcumin merupakan senyawa aktif utama yang bertanggung jawab dalam aktivitas hepatoprotektif. Rimpang kunyit memiliki aktivitas sebagai kolagogum, menstimulasi produksi empedu sehingga dapat meningkatkan kemampuan tubuh dalam metabolisme lemak, memperbaiki sistem pencernaan, dan eliminasi toksin dari hati. Efek hepatoprotektif kunyit memiliki karakteristik yang setara dengan silymarin (Akram, *et al.*, 2010). Pra perlakuan tikus dengan ekstrak etanol kunyit (100 mg/kg BB) yang diinduksi parasetamol 600 mg/kg BB menunjukkan adanya penurunan aktifitas enzim hati, yaitu ALT, AST dan ALP (Somchit, *et al.*, 2005).

Mekanisme aksi hepatoprotektif curcumin melalui penghambatan proses inflamasi, menangkap stress oksidatif, dan penurunan aktivasi *hepatic stellate cells* (HSC). Aktivitas HSC dihambat dengan meningkatkan regulasi ekspresi dan stimulasi signaling gen PPAR- γ . Curcumin menekan proses inflamasi sel hati melalui penurunan level sitokin inflamasi termasuk interferon- γ , TNF- α , dan interleukin-6 (Fu, *et al.*, 2007). Aktivitas curcumin didukung sifat toksitas yang sangat rendah. Kurkumin dosis 5 g/kg bb tikus tidak menyebabkan kematian; dosis 3.5 g/kg bb diberikan pada tikus, anjing dan kera selama 3 bulan tidak menunjukkan timbulnya gejala toksik (Sharma *et al.* 2005).

Curcuma xanthorrhiza (temulawak/javanese turmeric) merupakan tumbuhan asli Indonesia. Temulawak mengandung kurkuminoid dan senyawa aktif jenis bisabolane seperti α -curcumene, ar-turmerone dan xanthorrhizol. Xanthorrhizol adalah komponen utama minyak atsiri temulawak (Itokawa *et al.* 2008). Evaluasi aktivitas hepatoprotektif ekstrak temulawak terstandard (0,1238 mg xanthorrhizol dalam 1 mg ekstrak etanol absolut) telah dilakukan oleh Devaraj *et al.*, 2010. Perlakuan temulawak dosis 500 mg/kg bb tikus putih galur SD dengan pra perlakuan etanol terbukti dapat menurunkan kadar ALT, AST, ALP dan protein darah, serta menunjukkan perbaikan histopatologi jaringan hati (Devaraj *et al.* 2010).

Taraxacum officinale (taraksakum/jombang/dandelion) adalah salah satu anggota family Asteraceae. Jombang dimanfaatkan secara empiris dalam pengobatan dyspepsia, mual dan panas perut, gangguan ginjal dan hati, hepatitis, dan anoreksia. Berdasarkan hasil review komprehensif, jombang memiliki aktivitas farmakologis sebagai diuretik, kholeretik, antiinflamasi, antioksidan, antikarsinogen, analgesik, antihiperglikemik, antikoagulan, dan efek prebiotik (Schutz, *et al.*, 2006). Penggunaan taraksakum telah diakui penggunaannya di Jerman sebagai diuretik, anoreksia, dyspepsia, dan gangguan empedu (Yarnell and Abascal, 2009).

Senyawa kimia utama yang terkandung dalam jombang adalah seskuiterpen lakton, yaitu taraxinic acids, lactucin, cichorin, taraxacosides, taraxacolides, dihydrolactucin, ixerin, dan ainslioside. Chicoric acid menghambat penetrasi sel virus, mencegah oksidasi kolagen dan sel; sedangkan chlorogenic acid bersifat kolagogum, membantu kelancaran aliran empedu. Aktivitas tersebut yang mendukung potensi taraksakum sebagai hepatoprotektif (Singh, *et al.*, 2008). Efek hepatoprotektif jombang terhadap tikus yang diinduksi CCl₄ telah dilakukan Park *et al.*, 2007. Jombang diekstraksi menggunakan air panas dan dihilangkan senyawa lemaknya, pada dosis 500 mg/kg bb dan 2 g/kg bb terbukti dapat menurunkan *glutathione peroxidase*, *glutathione reductase*, *superoxide dismutase*, dan *cytochrome p450* (Park *et al.*, 2007).

Secara empiris tanaman obat digunakan dalam bentuk kombinasi ramuan/campuran. Berdasarkan perbedaan mekanisme aksi yang mendukung potensi hepatoprotektif dari rimpang temulawak, rimpang kunyit, dan herba jombang maka kemungkinan besar akan memberikan efek yang sinergis atau additif. Dalam rangka mengetahui aktivitas yang

terjadi jika tanaman obat tersebut berada dalam satu ramuan, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengkaji toksisitas dan khasiatnya. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi ramuan jamu yang terdiri dari rimpang temulawak, rimpang kunyit, dan herba jombang sebagai agent hepatoprotektor, dengan standard senyawa yang digunakan sebagai kontrol positif adalah sylimarin. Penelitian dilakukan secara *in vivo* menggunakan hewan coba tikus putih. Potensi ramuan jamu merupakan hasil perhitungan rasio kemanfaatan/khasiat dibandingkan toksisitasnya baik akut maupun sublronis. Jika terbukti potensial, data penelitian praklinik ini akan digunakan sebagai dasar uji klinik untuk memperoleh *evidence based data* pemanfaatan jamu dalam pelayanan kesehatan.



Gambar 1. Bahan penelitian potensi hepatoprotektif ramuan jamu, dari kiri ke kanan: temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*), jombang (*Taraxacum officinale*), dan kunyit (*Curcuma longa*)

BAB II

MANFAAT DAN TUJUAN PENELITIAN

I. MANFAAT PENELITIAN

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat dijadikan dasar dalam pengembangan ramuan hepatoprotektif

II. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan umum

- a. Mengkaji potensi hepatoprotektif ramuan rimpang temulawak, rimpang kunyit dan herba jombang pada tikus putih yang diinduksi parasetamol dosis tinggi
- b. Mengkaji gambaran sitotoksik akut dan subkronis ramuan tersebut pada tikus putih

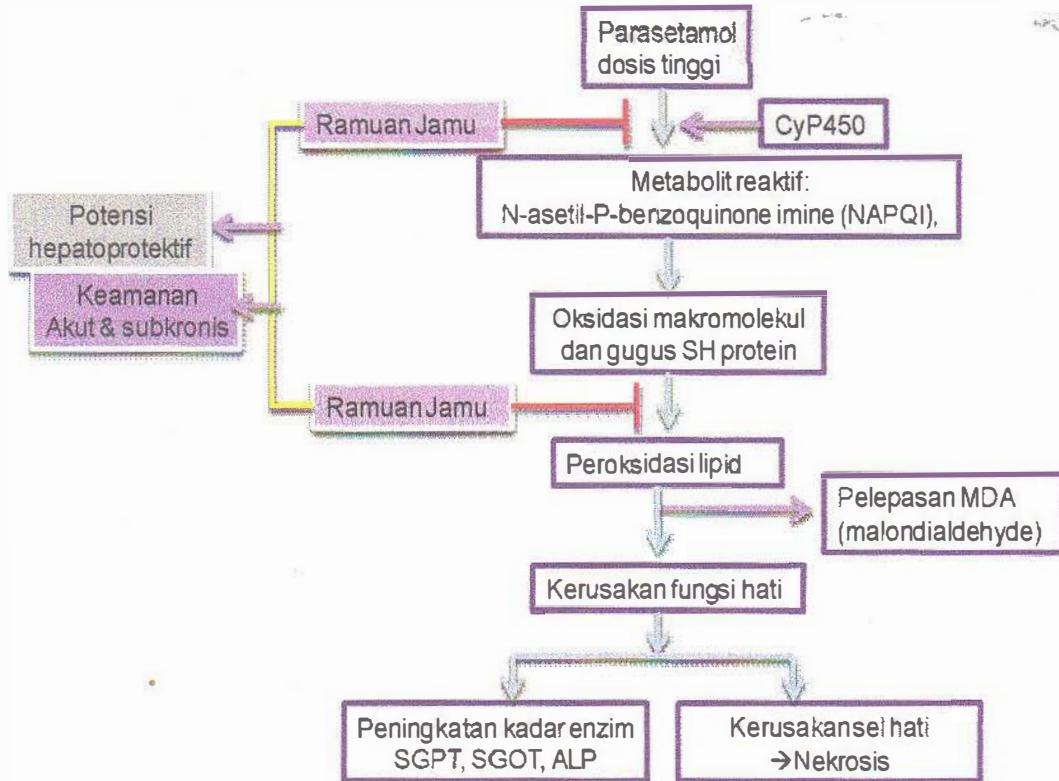
Tujuan khusus

- a. Mengetahui perubahan kadar enzim sebagai parameter fungsi hati tikus (SGPT, SGOT, MDA, ALP) sebelum dan sesudah diinduksi dengan parasetamol
- b. Mengetahui efek ramuan jamu (rimpang temulawak, rimpang kunyit dan herba jombang) terhadap perubahan kadar enzim seperti tersebut pada point a dan histopatologi organ hati
- c. Mengamati gejala ketoksikan akut dan mengetahui besaran LD50 ramuan jamu pada tikus putih
- d. Mengamati gejala ketoksikan subkronis, perubahan parameter darah tikus putih dan mengetahui perubahan fungsi organ dalam, baik mikroskopis maupun makroskopis pada tikus putih yang diberikan ramuan jamu selama 90 hari

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

1. Kerangka konsep



Gambar 2. Kerangka konsep penelitian

2. Tempat dan Waktu

Tempat penelitian di B2P2TO2T Tawangmangu.

Waktu penelitian delapan bulan dari bulan April sampai dengan Desember 2011

3. Jenis Penelitian

Jenis penelitian eksperimental laboratorium

4. Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap

5. Populasi dan Sampel

Hewan uji yang digunakan adalah 84 ekor tikus putih jantan dan 84 betina (*Rattus norvegicus*) galur Wistar. Jumlah tikus putih yang dibutuhkan dalam keseluruhan penelitian adalah 168 ekor. Tikus diperoleh dari UPHP Fakultas kedokteran Hewan UGM Yogyakarta.

6. Variabel

Variabel bebas : konsentrasi ramuan

Variabel tergantung : parameter fungsi hati (level SGPT, SGOT, ALP, MDA), fungsi ginjal, (ureum dan creatinin), dan parameter darah rutin

7. Bahan dan Cara kerja

a. Bahan

Bahan tanaman berupa rimpang temulawak, rimpang kunyit, rimpang temu mangga, herba jombang, dan biji sylibum. Bahan tanaman diperoleh di daerah Karanganyar. Spesimen masing-masing tanaman dideterminasi di laboratorium Farmakognosi B2P2TO2T Tawangmangu. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih jantan galur Wistar. Tikus diperoleh dari UPHF Fakultas Kedokteran Hewan UGM Yogyakarta.

b. Cara kerja :

b.1. Pembuatan bahan uji

Bahan segar setelah dipanen dicuci dengan air mengalir hingga bersih; bahan dilakukan pengubahan bentuk, sedangkan rimpang diiris dengan ketebalan sekitar 0.3 cm. Setelah itu diangin-anginkan dilanjutkan pengeringan di dalam oven suhu 30-40°C, hingga kadar air kurang dari 10%. Setelah kering, simplisia dibuat ramuan dengan komposisi sebagai berikut rimpang temulawak, rimpang kunyit dan herba jombang. Dosis per oral diberikan pada tikus berdasarkan hasil penelitian tunggal pada tikus.

Tabel 1. Perhitungan dosis yang digunakan berdasarkan hasil penelitian ekstrak tunggal disetarakan dengan bentuk sediaan infusa

Simplisia	Dosis ekstrak	\approx simplisia
Kunyit	100 mg/kg bb ekstrak etanol (Somchit, <i>et al.</i> , 2005)	1000 mg/kg bb
Temulawak	500 mg/kg bb ekstrak etanol (Devaraj <i>et al.</i> 2010)	5000 mg/kg bb
Jombang	2000 mg/kg bb ekstrak air (Park <i>et al.</i> , 2007)	2000 mg/kg bb

Berdasarkan tabel I maka diperoleh perbandingan dosis kunyit : temulawak : jombang (1000 : 5000 : 2000 mg/kg bb), jadi dosis ramuan simplisia sebesar 8000 mg/kg bb tikus. Dosis tersebut digunakan sebagai dosis terapi

tertinggi. Pada penelitian ini digunakan 4 peringkat dosis ramuan simplisia yaitu:

1. D1: 1000 mg/kg bb tikus
2. D2: 2000 mg/kg bb tikus
3. D3: 4000 mg/kg bb tikus
4. D4: 8000 mg/kg bb tikus

Dosis ramuan simplisia tersebut kemudian dibuat infusa. Penelitian ini menggunakan stok sari infusa 10%, maka rumus volume pemberian adalah: $(\text{Dosis}/10) \times \text{vol stok}$. Pembuatan infusa sesuai Farmakope Indonesia, dengan perbandingan 10% b/v. Ramuan dipanaskan dalam panci infus berisi air suhu 90°C selama 15 menit. Infus didinginkan kemudian disaring dan diuapkan di atas waterbath agar volume yang diberikan tidak terlalu besar.

b.2. Profil kromatogram

Preparasi sampel:

- 1 gram ramuan ditambahkan 150 ml air kemudian diinfus. Ekstrak air hasil infusa ditambahkan kloroform (3 x 50 ml). Sari kloroform diuapkan di atas waterbath hingga kering kemudian ditambahkan metanol (F1)
- Ramuan dimaserasi dengan alkohol 96% selama 3 hari. Maserat dikeringkan hingga diperoleh 1 gram ekstrak kering. Ekstrak dilarutkan dalam alkohol 40% kemudian diinfus. Infusa diuapkan hingga kering, kemudian ditambah kloroform (3 x 12,5 ml). Sari kloroform diuapkan di atas waterbath hingga kering kemudian ditambahkan metanol (F2)
- 1 gram ekstrak alkohol 96% dilarutkan dalam 25 ml air, kemudian ditambah kloroform (3 x 25 ml). Sari kloroform diuapkan di atas waterbath hingga kering kemudian ditambahkan metanol (F3)

Ketiga sampel kemudian ditotolkan pada lempeng KLT dan dieluasi menggunakan 3 jenis eluen, yaitu: kloroform; toluen:eter (5 : 5); dan kloroform:etanol:asam asetat (94:5:1). Setelah selesai eluasi, spot diamati pada cahaya visual, 366 nm, dan 254 nm.

b.3. Uji Aktivitas dan toksisitas

b.3.1 Perlakuan sebelum uji aktivitas

Tikus putih galur Wistar diadaptasikan dalam kandangnya selama satu minggu. Sekam sebagai alas kandang diganti dengan yang baru. Tiap kandang (ukuran 35 x 25 x 20 cm) berisi tidak lebih dari 5 ekor tikus dengan jenis kelamin yang sama. Makan dan minum diberikan *ad libitum*. Kandang ditempatkan dalam ruangan dengan kondisi terang-gelap yang seimbang dan suhu ruang yang terjaga.

b.3.2 Uji Aktivitas Hepatoprotektif

Penelitian ini mengadopsi metode yang digunakan oleh Kanchana and Sadiq, 2011 dalam menguji efek hepatoprotektif *Plumbago zeylanica* pada tikus terinduksi parasetamol (Kanchana and Sadiq, 2011).

Tikus dikelompokkan menjadi 7 kelompok (@ 12 ekor, terdiri dari 6 ekor jantan dan 6 betina). Tikus umur 2 bulan dengan berat badan 150-250 g. Sebelum diperlakukan sesuai kelompok, semua tikus yang digunakan dilakukan pemeriksaan kadar serum SGPT, SGOT, MDA, dan ALP. Darah diambil melalui vena mata. Kadar MDA dan ALP serum ditetapkan menggunakan Quantichrome assay kit, brosur cara kerja terlampir.

- Kelompok I : Kelompok kontrol tanpa perlakuan
Kelompok ini hanya diberikan hepatotoksin parasetamol dalam CMC 1% dosis 500 mg/kg bb per oral selama 7 hari.
- Kelompok II : Kelompok Kontrol negatif
Kelompok ini diberikan CMC Na 1% bersama parasetamol dalam CMC 1% dosis 500 mg/kg bb per oral selama 7 hari.
- Kelompok III: Kelompok Kontrol positif
Kelompok ini diberikan sylimarin 100 mg/kg bb bersama parasetamol dalam CMC 1% dosis 500 mg/kg bb per oral selama 7 hari.
- Kelompok IV: Kelompok ramuan D1
Kelompok ini diberikan infusa D1 bersama parasetamol dalam CMC 1% dosis 500 mg/kg bb per oral selama 7 hari.

- Kelompok V : Kelompok ramuan D2
Kelompok ini diberikan infusa D2 bersama parasetamol dalam CMC 1% dosis 500 mg/kg bb per oral selama 7 hari.
- Kelompok VI : Kelompok ramuan D3
Kelompok ini diberikan infusa D3 bersama parasetamol dalam CMC 1% dosis 500 mg/kg bb per oral selama 7 hari.
- Kelompok VII : Kelompok ramuan D4
Kelompok ini diberikan infusa D4 bersama parasetamol dalam CMC 1% dosis 500 mg/kg bb per oral selama 7 hari.
Semua kelompok diberikan makan dan minum seperti biasa. Pada hari ke delapan (8) dilakukan pengambilan darah melalui vena mata menggunakan mikropipet kemudian dilakukan pemeriksaan kadar serum SGPT, SGOT, MDA, dan ALP. Penetapan kadar menggunakan metode spektrofotometri sesuai dengan kit yang digunakan.

Setelah diambil darahnya dilakukan pembedahan/nekropsi. Cara pembedahan adalah sebagai berikut: tikus dimasukkan ke dalam bejana bertutup rapat berisi kapas yang dibasahi eter. Setelah tikus menunjukkan kematian, tikus ditelentangkan pada papan bedah. Pembedahan diawali dengan insisi di bagian perut bawah menggunakan gunting dan pinset bedah. Setelah rongga perut terbuka dilakukan pengambilan organ hepar/hati dan ginjal dibersihkan dengan aquadest kemudian disimpan dalam larutan formalin 10%. Histopatologi hati dilakukan dengan pengecatan Hematoxilin Eosin (HE).

b.3.3 Uji Toksisitas akut

Prinsip toksisitas akut adalah pemberian dosis tunggal suatu bahan uji secara oral dengan berbagai dosis pada hewan coba kemudian diobservasi adanya gejala toksik/keracunan dan kematian hewan coba. Uji toksisitas akut bertujuan untuk menetapkan nilai LD₅₀ dan menentukan organ sasaran yang mungkin rusak, efek toksik spesifik dan petunjuk dosis terapi. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok, masing-masing terdiri dari 6 ekor tikus jantan dan 6 ekor tikus betina galur

Wistar, umur 2 bulan berat badan 150-250 g. Tiap kelompok diberikan ramuan secara oral untuk sekali pemberian dengan dosis:

- Kelompok I : 25 g/kg bb
- Kelompok II : 50 g/kg bb
- Kelompok III : 100 g/kg bb

Ramuan diekstraksi dengan metode infusa 10% sesuai Farmakope Indonesia III.

Sebelum dan sesudah perlakuan bobot badan tikus ditimbang, dicatat terjadinya gejala klinik/toksik. Pengamatan meliputi kesehatan hewan/gejala klinis, berat badan, jumlah kematian dan *gross pathology* (patologi makro) untuk hewan coba yang mati pada waktu pengamatan. Pengamatan dilakukan selama 14 hari. Pengamatan yang dilakukan meliputi perubahan kulit dan bulu, mata dan membran mukosa, gerakan tubuh, tremor, konvulsi, salivasi, diare, dan pernafasan. Jika terdapat hewan coba yang mati dilakukan otopsi/pembedahan.

Cara pembedahan adalah sebagai berikut: tikus dimasukkan ke dalam bejana bertutup rapat berisi kapas yang dibasahi eter. Setelah tikus menunjukkan kematian, tikus ditelentangkan pada papan bedah. Pembedahan diawali dengan insisi di bagian perut bawah menggunakan gunting dan pinset bedah. Setelah rongga perut terbuka dilakukan pengambilan organ hepar, pankreas, ginjal dan usus dilanjutkan pembukaan rongga dada untuk mengambil paru-paru dan jantung. Organ dibersihkan dan dicuci dengan larutan dapar. Organ ditimbang dan diamati kemudian dimasukkan dalam larutan formalin untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi.

Penentuan LD₅₀ (dosis yang menyebabkan kematian 50% hewan uji) menggunakan analisa probit. Apabila tidak terjadi kematian maka hasil toksisitas akut dapat ditentukan dosis terbesar yang masih dapat diterima hewan coba dan dinyatakan sebagai LD₅₀ semu.

b.3.4 Uji Toksisitas Subkronis

Tujuan dari uji ini adalah melihat efek toksik bahan uji yang diberikan sekali setiap hari selama 3 bulan, untuk melihat perubahan karena akumulasi, toleransi, metabolisme dan kelainan khusus pada organ tertentu. Hewan uji menggunakan tikus putih Wistar umur 1 bulan; dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing terdiri dari 6 ekor tikus jantan dan 6 ekor tikus betina, galur Wistar, umur 1 bulan berat badan 100-150 g.. Sebelum perlakuan, semua tikus diperiksa kadar serum SGOT, SGPT, ureum, dan kreatinin.

Kelompok I : kelompok kontrol tanpa perlakuan

Kelompok II : kelompok ramuan D2

Kelompok III : kelompok ramuan D3

Kelompok IV : kelompok ramuan D4

Parameter yang diukur adalah gambaran darah normal, biokimia darah dan patologi anatomi organ penting. Pengukuran kadar SGOT, SGPT, ureum, dan kreatinin dilakukan pada hari ke-90 pemberian bahan uji. Penimbangan bobot badan dilakukan sebelum pemberian bahan uji, kemudian setiap minggu selama masa pemberian bahan uji. Setelah masa observasi berakhir, hewan dikorbankan, semua organ diamati secara makroskopis dan mikroskopis.

Perlakuan setelah uji aktivitas dan toksisitas

Setelah selesai masa percobaan, tikus dikorbankan dengan cara inhalasi menggunakan kloroform, setelah itu tikus dibakar dalam galian dan ditimbun dengan tanah.

8. Analisis Data

- a. Data kuantitatif yang diperoleh dari pengukuran kadar SGPT, SGOT, MDA, ALP dan toksisitas subkronis dianalisa secara statistik : uji kenormalan menggunakan metode distribusi frekuensi. Apabila data yang diperoleh terdistribusi normal, dan variasi homogen dilakukan analisa sidik ragam (ANOVA). Apabila data yang diperoleh tidak normal dan atau varian tidak homogen, maka data dianalisa secara

statistik non parametrik yaitu dengan metode Friedman dan dilanjutkan dengan uji berganda Friedman.

- b. Penentuan LD₅₀ (dosis yang menyebabkan kematian 50% hewan uji) menggunakan probit. Apabila tidak terjadi kematian hewan coba, maka hasil toksisitas akut dapat ditentukan dosis terbesar tersebut sebagai nilai LD₅₀ semu.

9. Pertimbangan Etik Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan sebagai subyek penelitian, etik penelitian telah diterbitkan Komisi Etik Badan Litbang Kesehatan.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

A. UJI HEPATOPROTEKTIF

1. Kadar MDA (malondialdehyde)

Metode: ELISA menggunakan Quantichrom TBARS assay Kit. Sampel yang digunakan adalah serum yang di-deproteinase ditambahkan reagen dan serapannya/absorbansinya dibaca pada panjang gelombang 490 nm. MDA merupakan produk akhir dari TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)

Tabel 2. Absorbansi/serapan serum pengukuran MDA sebelum perlakuan

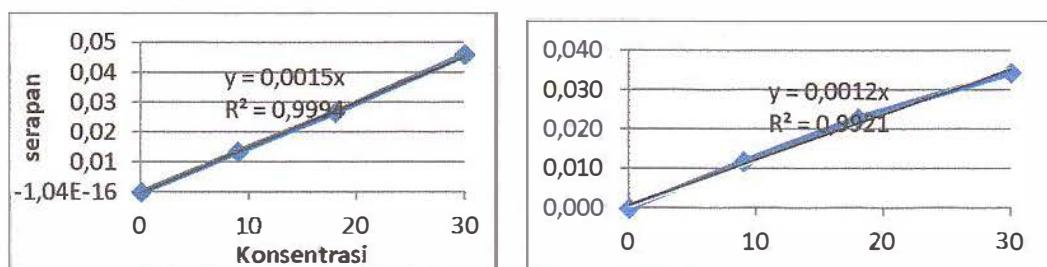
a. Tikus Jantan

MDA (TBARS) pre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,055	0,055	0,053	0,054	0,055	0,057	0,053	0,053	0,057	0,065	0,057	0,061
B	0,056	0,055	0,053	0,057	0,056	0,056	0,053	0,054	0,06	0,057	0,057	0,059
C	0,053	0,053	0,051	0,052	0,053	0,058	0,059	0,061	0,054	0,055	0,055	0,061
D	0,06	0,06	0,050	0,058	0,054	0,056	0,054	0,058	0,058	0,057	0,056	0,057
E	0,059	0,056	0,055	0,055	0,056	0,057	0,058	0,058	0,057	0,059	0,067	0,066
F	0,062	0,055	0,054	0,057	0,053	0,053	0,056	0,056	0,055	0,057	0,07	0,075
G	0,041	0,046	0,04	0,055	0,056	0,056	0,072	0,067	0,068	0,09	0,086	0,089
H	0,039	0,038	0,036	0,041	0,037	0,036	0,037	0,036	0,035	0,043	0,04	0,036

b. Tikus Betina

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,047	0,05	0,05	0,065	0,053	0,056	0,058	0,061	0,062	0,064	0,065	0,065
B	0,049	0,05	0,05	0,051	0,055	0,056	0,057	0,06	0,062	0,063	0,063	0,063
C	0,048	0,049	0,048	0,05	0,052	0,055	0,055	0,056	0,056	0,055	0,057	0,057
D	0,052	0,053	0,055	0,058	0,139	0,135	0,064	0,065	0,067	0,067	0,069	0,069
E	0,053	0,056	0,057	0,058	0,061	0,062	0,065	0,066	0,066	0,069	0,067	0,067
F	0,046	0,049	0,047	0,052	0,054	0,056	0,056	0,055	0,055	0,057	0,066	0,066
G	0,038	0,043	0,038	0,04	0,051	0,047	0,047	0,046	0,05	0,04	0,069	0,067
H	0,051	0,052	0,065	0,06	0,074	0,074	0,04	0,041	0,04	0,041	0,04	0,04

Keterangan: kolom warna pink adalah serapan standard MDA



Gambar 3. Kurva baku standard MDA sebelum perlakuan pada tikus jantan (kiri) dan betina (kanan)

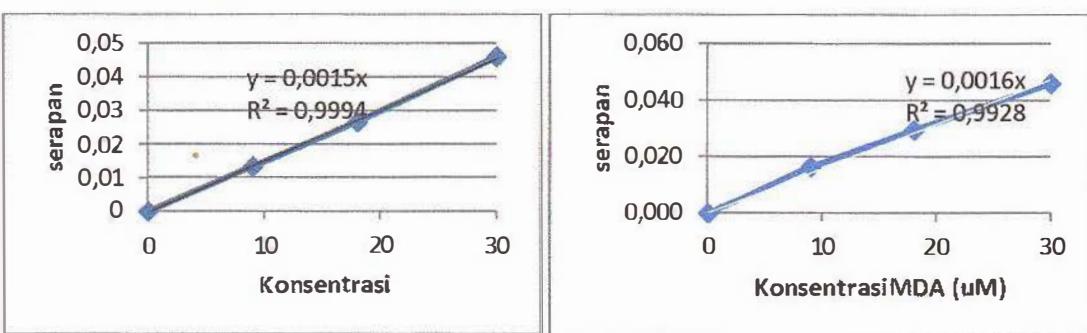
Tabel 3. Absorbansi serum untuk pengukuran MDA setelah perlakuan

a. Tikus Jantan

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,055	0,055	0,053	0,054	0,055	0,057	0,053	0,053	0,057	0,065	0,057	0,01
B	0,056	0,055	0,053	0,057	0,056	0,056	0,053	0,054	0,06	0,057	0,057	0,059
C	0,053	0,053	0,051	0,052	0,053	0,058	0,059	0,061	0,054	0,05	0,055	0,061
D	0,06	0,06	0,058	0,058	0,054	0,056	0,054	0,058	0,058	0,057	0,056	0,057
E	0,059	0,056	0,055	0,055	0,056	0,057	0,058	0,058	0,057	0,059	0,067	0,066
F	0,062	0,055	0,054	0,057	0,053	0,053	0,056	0,056	0,055	0,057	0,07	0,075
G	0,041	0,046	0,04	0,055	0,056	0,056	0,072	0,067	0,068	0,09	0,086	0,089
H	0,039	0,038	0,036	0,041	0,037	0,036	0,037	0,036	0,035	0,043	0,04	0,036

b. Tikus betina

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,047	0,048	0,048	0,048	0,049	0,049	0,049	0,049	0,047	0,049		
B	0,049	0,049	0,041	0,041	0,041	0,043	0,048	0,051			0,047	0,049
C	0,041	0,041	0,041	0,04	0,041	0,042			0,045	0,046	0,045	0,046
D	0,047	0,048	0,048	0,05	0,05	0,052	0,053	0,056	0,056	0,058		
E	0,048	0,049	0,054	0,054	0,052	0,053	0,051	0,053	0,059	0,06	0,058	0,059
F	0,05	0,049			0,043	0,044	0,058	0,057			0,053	0,054
G	0,035	0,036	0,051	0,053	0,064	0,066	0,081	0,082				



Gambar 4. Kurva baku MDA setelah perlakuan, pada tikus jantan (kiri) dan betina (kanan)

Rumus penghitungan kadar MDA

$$[\text{TBARS}] = \frac{\text{R}_{\text{Sample}} - \text{R}_{\text{Blank}}}{\text{Slope} (\mu\text{M}-1)} \times n (\mu\text{M MDA equivalents})$$

- Rsample : absorbansi sampel
- Rblank : absorbansi blanko
- Slope : kemiringan kurva baku (standar MDA)
- N : faktor dilusi

Tabel 4. Hasil perhitungan kadar MDA serum sebelum dan setelah perlakuan pada tikus jantan

a. Kadar MDA sebelum perlakuan

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5,45	5,45	19,09	20,45	21,82	23,18	27,27	30,00	21,82	25,91	16,36	16,36
B	21,82	23,18	20,45	21,82	23,18	24,55	10,91	12,27	27,27	27,27	28,64	31,36
C	20,45	19,09	16,36	17,73	16,36	17,73	20,45	21,82	24,55	25,91	25,91	27,27
D	19,09	17,73	20,45	23,18	20,45	24,55	24,55	27,27	23,18	24,55	27,27	27,27
E	5,45	5,45	24,55	31,36	31,36	27,27	27,27	28,64	13,64	13,64	32,73	34,09
F	10,91	10,91	10,91	10,91	15,00	15,00	13,64	15,00	16,36	16,36	13,64	15,00

b. Kadar MDA setelah perlakuan

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	26,0	26,0	22,0	24,0	26,0	30,0	22,0	22,0	30,0	46,0	30,0	38,0
B	28,0	26,0	22,0	30,0	28,0	28,0	22,0	24,0	36,0	30,0	30,0	34,0
C	22,0	22,0	18,0	20,0	22,0	32,0	34,0	38,0	24,0	26,0	26,0	38,0
D	36,0	36,0	32,0	32,0	24,0	28,0	24,0	32,0	32,0	30,0	28,0	30,0
E	34,0	28,0	26,0	26,0	28,0	30,0	32,0	32,0	30,0	34,0	50,0	48,0
F	40,0	26,0	24,0	30,0	22,0	22,0	28,0	28,0	26,0	30,0	56,0	66,0

Keterangan : warna merah menandakan well kosong

c. Kadar MDA rata-rata (μM)

	Kadar MDA		perubahan	%
	Sesudah	Sebelum		
A	29,00	22,23	6,77	23,35
B	29,20	22,77	6,43	22,01
C	26,83	21,14	5,70	21,23
D	30,33	23,30	7,04	23,20
E	29,75	29,66	0,09	0,31
F	33,17	23,18	9,99	30,11

Tabel 5. Hasil perhitungan kadar MDA serum sebelum dan setelah perlakuan pada tikus betina

a. Sebelum perlakuan

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	24,38	26,25	26,25	26,25	28,13	28,13	28,13	28,13	24,38	28,13		
B	28,13	28,13	13,13	13,13	13,13	16,88	26,25	31,88			24,38	28,13
C	11,25	13,13	13,13	11,25	13,13	15,00			20,63	22,50	20,63	22,50
D	24,38	26,25	26,25	30,00	30,00	33,75	35,63	41,25	41,25	45,00		
E	26,25	28,13	37,50	37,50	33,75	35,63	31,88	35,63	46,88	48,75	45,00	46,88
F	21,82	20,45			12,27	13,64	32,73	31,36			25,91	27,27

b. Setelah perlakuan

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	17,5	25,0	25,0	62,5	32,5	40,0	45,0	52,5	55,0	60,0		
B	22,5	25,0	25,0	27,5	37,5	40,0	42,5	50,0			57,5	57,5
C	20,0	22,5	20,0	25,0	0,0	37,5			40,0	37,5	42,5	42,5
D	30,0	32,5	37,5	45,0			60,0	62,5	67,5	67,5	72,5	72,5
E	32,5	40,0	42,5	45,0	52,5	55,0	62,5	65,0	65,0	72,5	67,5	67,5
F	15,0	22,5			35,0	40,0	40,0	37,5			65,0	65,0

c. Kadar MDA rata-rata (μM)

	Kadar MDA		perubahan	%
	Sesudah	sebelum		
A	41,50	26,81	14,69	35,39
B	38,50	22,31	16,19	42,05
C	31,75	16,31	15,44	48,62
D	54,75	33,38	21,38	39,04
E	55,63	37,81	17,81	32,02
F	40,00	15,00	25,00	62,50

Keterangan:

- A : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 1000 mg/kg BB tikus
- B : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 2000 mg/kg BB tikus
- C : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 4000 mg/kg BB tikus
- D : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 8000 mg/kg BB tikus
- E : Kelompok standar silimarin 100 mg/kg BB tikus
- F : Kelompok Kontrol parasetamol

2. Kadar Alkaline Phospatase (ALP)

Kadar ALP ditentukan dengan DALP Quantichrome asssay kit, menggunakan metode spektrofotometri. Serapan dibaca dengan Elisa Reader, serapan dibaca pada panjang gelombang 490 nm. Konversi serapan/absorbansi menjadi kadar ALP dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar ALP (IU/L)} = \frac{(Odt - Od0) \cdot \text{react vol}}{(Od cal - Od H2O) \cdot \text{sample vol.t}} \times 35,3$$

- Odt = serapan pada menit ke 4
- Od0 = serapan pada menit ke 0
- React vol = volume reaksi
- Od cal = serapan kalibrator
- Od H2O = serapan H2O

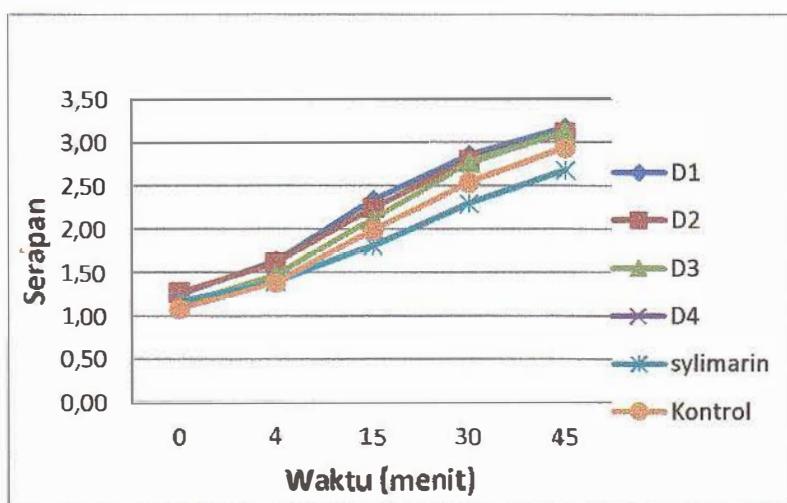
Tabel 6. Kadar Alkaline Phosphatase (ALP IU/L) pada tikus sebelum dan setelah perlakuan

a. Tikus Jantan

	Kadar ALP (IU/L)		Perubahan	%	Kadar ALP (IU/L)		Perubahan	%
	Sebelum	Sesudah			Sebelum	Sesudah		
A	65,25	126,28	61,03	93,54	A	102,96	81,53	(21,43)
B	104,83	149,60	44,77	42,71	B	116,80	117,75	0,95
C	101,03	134,21	33,18	32,84	C	111,00	93,38	(17,62)
D	105,82	138,68	32,86	31,05	D	109,09	114,83	5,74
E	84,26	89,68	5,42	6,44	E	76,95	77,44	0,49
F	74,70	163,48	88,78	118,86	F	54,35	144,42	90,06
								165,69

Kadar ALP tikus jantan mengalami peningkatan pada semua perlakuan, sedangkan pada tikus betina, perlakuan ramuan jamu dosis 1000 dan 4000 mg/kg BB dapat menurunkan kadar ALP.

Gambaran peningkatan kadar ALP berbanding waktu dapat dilihat pada grafik berikut



Gambar 5. Gambaran peningkatan kadar ALP berbanding waktu

Keterangan:

- A : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 1000 mg/kg BB tikus
- B : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 2000 mg/kg BB tikus
- C : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 4000 mg/kg BB tikus
- D : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 8000 mg/kg BB tikus
- E : Kelompok Kontrol Parasetamol
- F : Kelompok standar Silymarin 100 mg/kg BB tikus
- G : Kalibrator
- H : aquadest

3. Kadar SGPT, SGOT dan Bilirubin

Tabel 7. Kadar rata-rata SGOT, SGPT, dan bilirubin sebelum dan setelah perlakuan

a. Tikus jantan

Kelp.	SGOT			SGPT			Bilirubin			%
	Sebelum	Sesudah	% perubahan	Sebelum	Sesudah	% perubahan	Sebelum	Sesudah	% perubahan	
A	182,47	209,42	14,77	59,83	54,92	-8,21	1,74	0,85	-50,99	
B	226,33	210,18	-7,14	55,62	52,74	-5,17	1,43	1,75	22,53	
C	225,70	173,92	-22,94	68,73	57,00	-17,07	1,80	1,60	-11,14	
D	209,92	227,55	8,40	56,42	46,13	-18,23	1,28	1,65	28,83	
E	175,23	197,97	12,97	50,45	48,42	-4,03	1,34	1,54	14,80	
F	160,06	242,10	51,26	49,76	59,62	19,82	1,98	1,30	-34,41	

b. Tikus betina

	SGOT			SGPT			Bilirubin			%
	Sebelum	Sesudah	% perubahan	Sebelum	Sesudah	% perubahan	Sebelum	Sesudah	% perubahan	
A	180,87	165,90	-8,27	47,97	41,64	-13,19	2,39	1,81	-24,24	
B	172,98	209,98	21,39	47,57	52,10	9,53	1,88	1,64	-12,66	
C	206,75	181,88	-12,03	49,57	42,82	-13,62	1,68	1,68	0,10	
D	195,27	187,72	-3,86	54,37	45,88	-15,61	1,80	1,64	-8,52	
E	150,35	190,55	26,74	51,50	39,63	-23,04	1,48	1,91	29,05	
F	183,27	208,58	13,81	52,23	33,92	-35,07	1,57	1,25	-20,09	

Keterangan

- A : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 1000 mg/kg BB tikus
- B : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 2000 mg/kg BB tikus
- C : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 4000 mg/kg BB tikus
- D : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 8000 mg/kg BB tikus
- E : Kelompok standar Silimarin 100 mg/kg BB tikus
- F : Kelompok Kontrol Parasetamol

4. Histopatologi Hepar

Tabel 8. Berat organ hati (gram) setelah 8 hari perlakuan sesuai kelompoknya

a. Jantan

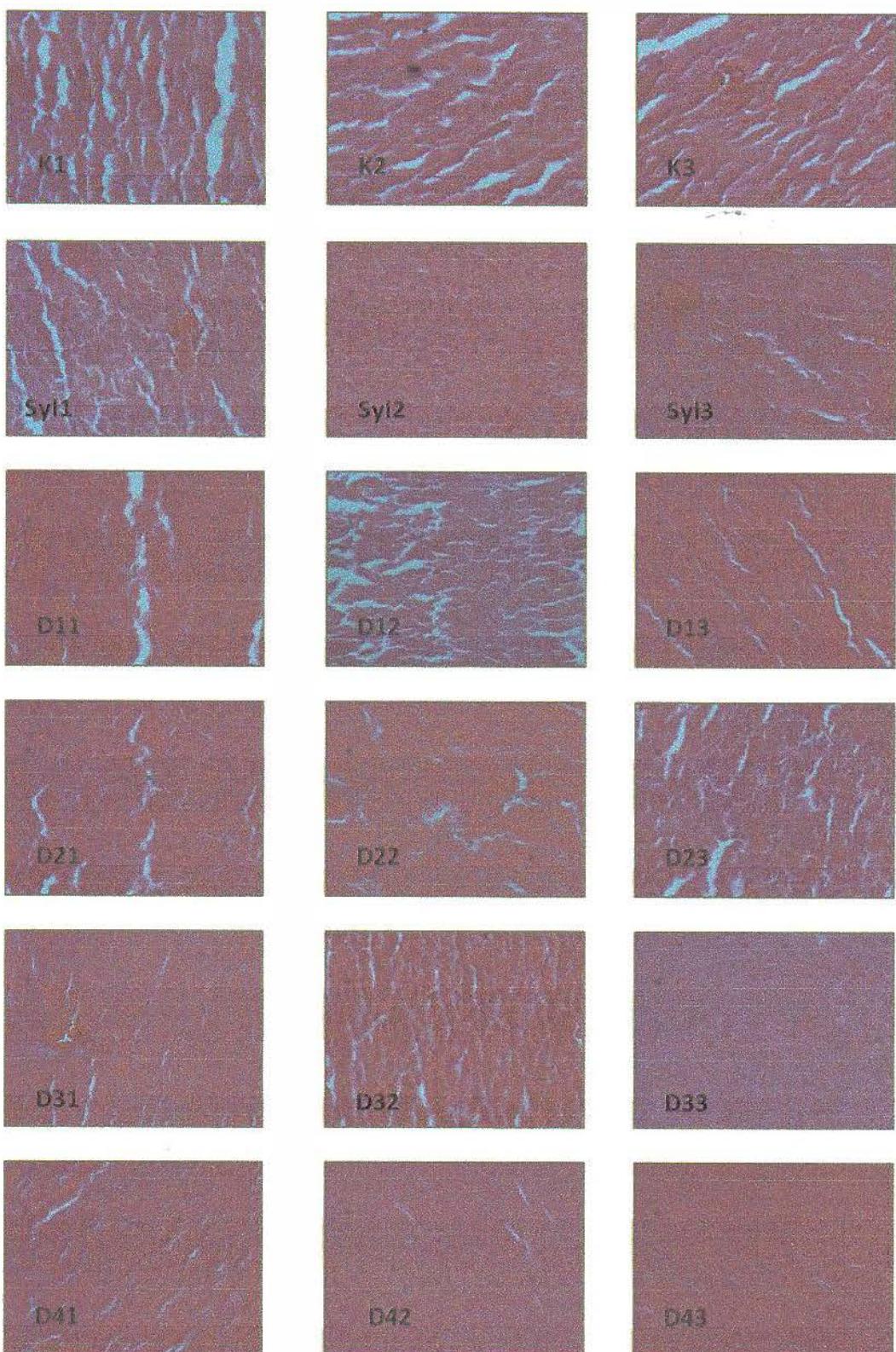
No	Kelp A	Kelp B	kelp C	Kelp D	Kelp E	Kelp. F
1	5,9	6,2	9,1	7,5	6	8,5
2	7,1	10	7,4	7,1	8,4	11,1
3	9,2	8,6	11,2	6,6	7,4	11,1
4	9,9	9	8,9	7,4	7,1	10
5	7,4	9,7	10,4	8,1	8,2	9,3
6	6,7	8,1	8,6	8,2	9	11,8
Purata	7,7	8,6	9,3	7,5	7,7	10,3
SD	1,5	1,4	1,4	0,6	1,1	1,3

b. Betina

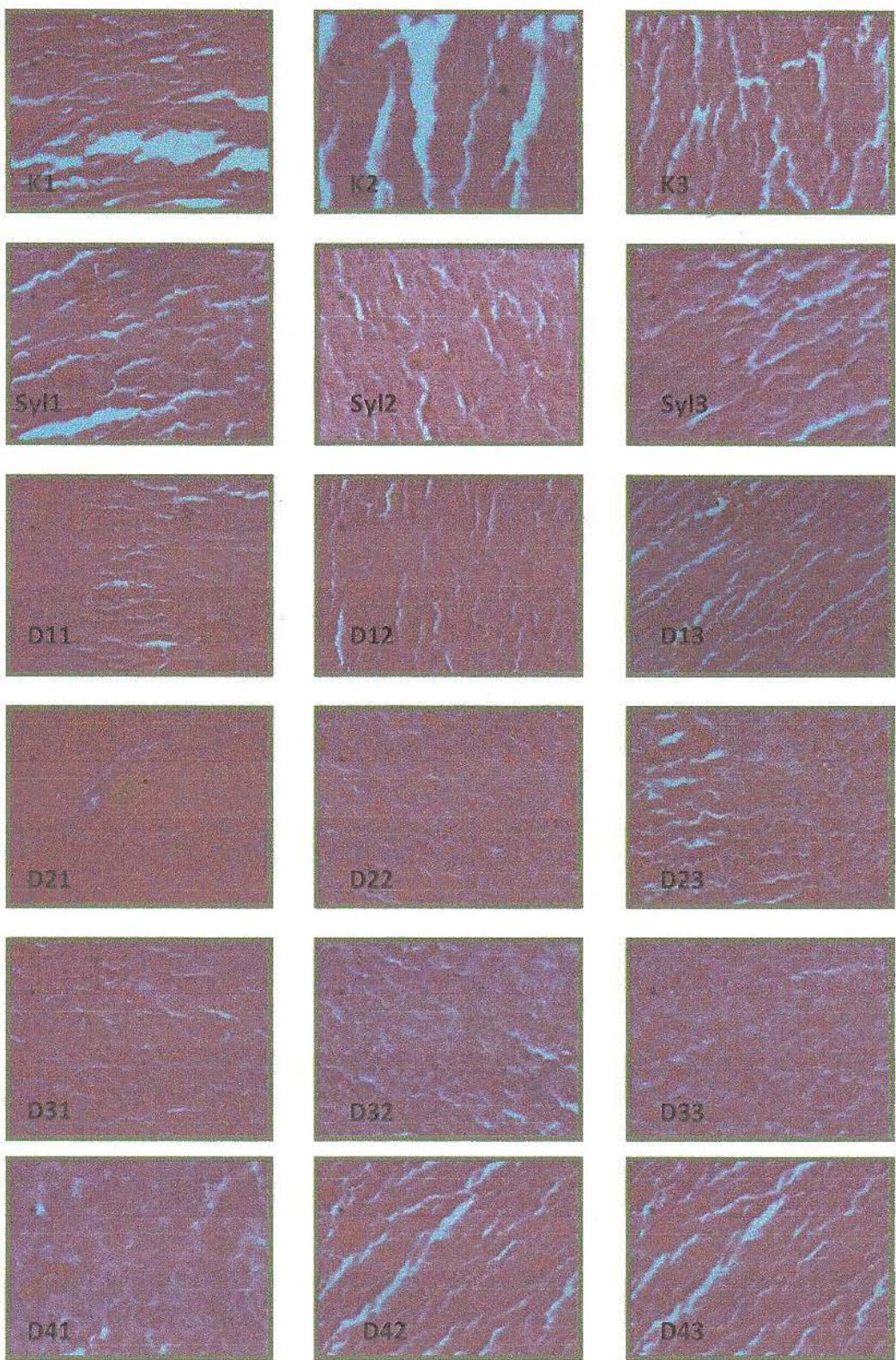
No	Kelp A	Kelp B	kelp C	Kelp D	Kelp E	Kelp. F
1	9,6	6,7	7,3	8,2	7,2	6,3
2	8,2	9,4	7,4	8	8,1	8,5
3	6,4	8,6	8	7,3	7,2	9,2
4	10,1	7,2	9,1	9,6	8,2	8,9
5	6,4	8,8	8,6	11,3	7,4	6,1
6	8,2	8	7,2	8,9	6,9	9,2
Purata	8,2	8,1	7,9	8,9	7,5	8,0
SD	1,6	1,0	0,8	1,4	0,5	1,4

Keterangan

- A : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 1000 mg/kg BB tikus
- B : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 2000 mg/kg BB tikus
- C : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 4000 mg/kg BB tikus
- D : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 8000 mg/kg BB tikus
- E : Kelompok standar Silimarin 100 mg/kg BB tikus
- F : Kelompok Kontrol Parasetamol



Gambar 6. Gambaran histologi hepar tikus jantan dengan pengecatan HE setelah perlakuan sesuai kelompoknya (K: kontrol parasetamol, Syl: sylimarin, D1: dosis 1000 mg/kg BB, D2: dosis 2000 mg/kg BB, D3: dosis 4000 mg/kg BB dan D4: dosis 8000 mg/kg BB)



Gambar 7. Gambaran histologi hepar tikus betina dengan pengecatan HE setelah perlakuan sesuai kelompoknya (K: kontrol parasetamol, Syl: sylimarin, D1: dosis 1000 mg/kg BB, D2: dosis 2000 mg/kg BB, D3: dosis 4000 mg/kg BB dan D4: dosis 8000 mg/kg BB) Ket. perbesaran 400x

B. UJI TOKSISITAS AKUT

Tabel 9. Uji toksisitas akut tidak menyebabkan kematian pada tikus

Dosis	Jumlah tikus		Jumlah kematian		Tingkah Laku yang tidak lazim
	Jantan	betina	jantan	betina	
10 g/kg bb	5	5	-	-	-
50 g/kg bb	5	5	-	-	-
100 g/kg bb	5	5	-	-	-

Tidak ada tikus yang mati hingga dosis 100 g/kg bb, jadi ramuan jamu yang digunakan masuk ke dalam kategori praktis tidak toksik.

Tingkah laku tikus diamati pada 24 jam setelah pemberian ramuan, dilanjutkan delapan hari sesudahnya. Dari hasil pengamatan selama delapan hari, tidak ada perlakuan tikus yang tidak lazim (di luar kebiasaan). Misalnya, reaksi gatal, menggigit kuku, menyerang tikus lain, dll. Kelainan feses juga tidak dijumpai.

C. UJI TOKSISITAS SUBKRONIS

1. Perubahan parameter darah sebelum dan 90 hari sesudah perlakuan

a. Perlakuan ramuan dosis 8000 mg/kg bb

Tabel 10. Perubahan kadar SGOT, SGPT, BUN, ureum dan kreatinin pada hari ke-0 (sebelum perlakuan) dosis 8000 mg/kg bb

1) Jantan

No	sgot	sgpt	BUN (mmol/L)	Ureum	creatinin (umol/L)
1	152,8	-12	-1,96	-11,7	-10,6
2	-114,4	-9,4	-1,35	-8,2	-8,9
3	-60,4	-16,4	-0,18	-1,1	-10,6
4	47,9	-2	-2,74	-16,6	-8,8
5	204,1	0,8	-1,39	-8,5	-8,9
6	36,2	-7,9	-1,79	-10,7	-13,3
7	-21,3	-5,1	-3,25	-19,4	-10,6

2) Betina

No	sgot	sgpt	BUN (mmol/L)	Ureum	creatinin (umol/L)
1	179,7	15,2	-1,14	-6,8	-6,2
2	178	20	2,5	14,9	-6,2
3	16,6	-0,1	0,43	2,5	-11,5
4	-20,1	3,9	0,4	2,5	-9,7
5	5,6	1,9	-3,07	-18,4	-4,5
6	-169,6	-46,7	-1,36	-8,2	-9,8
7	-100,1	-11,7	-2,72	-16,2	-5,3

Ket. Tanda (-) terjadi peningkatan kadar

b. Perlakuan ramuan dosis 4000 mg/kg bb

Tabel 11. Perubahan kadar SGOT, SGPT, BUN, ureum dan kreatinin pada hari ke-0 (sebelum perlakuan) dosis 4000 mg/kg bb

1) Jantan

No	sgot	sgpt	BUN (mmol/L)	Ureum	creatinin (umol/L)
1	40,6	-2,9	-5,86	-35,1	-14,1
2	-61	16,2	-3,36	-20	3,5
3	-2,6	11,1	-2,76	-17,1	-8
4	83,3	-3	-3,21	-19,1	-18,6
5	10,4	-10,8	-6,5	-39	-19,4
6	-56,7	-3,5	-7,25	-43,4	-16,8
7	-74	17,7	-4,53	-27,2	-10,6

Ket. Tanda (-) terjadi peningkatan kadar

2) Betina

No	sgot	sgpt	BUN (mmol/L)	Ureum	creatinin (umol/L)
1	-11	0,4	-0,72	-4,3	-6,2
2	4,9	9,8	-1,29	-7,8	-11,5
3	-72,1	-7,9	-2,29	-13,7	-9,7
4	228,2	11,1	-4,32	-25,8	-8,8
5	55,1	5,3	-2,47	-14,6	-8
6	90,7	21,1	-4,32	-26	-12,4
7	10,8	13,4	-1,29	-7,7	-8

Ket. Tanda (-) terjadi peningkatan kadar

c. Perlakuan ramuan dosis 2000 mg/kg bb

Tabel 12. Perubahan kadar SGOT, SGPT, BUN, ureum dan kreatinin pada hari ke-0 (sebelum perlakuan) dosis 2000 mg/kg bb

1) Jantan

No	sgot	sgpt	BUN (mmol/L)	Ureum	creatinin (umol/L)
1	76,5	12,4	4,39	26,2	9,7
2	29,4	15	4,14	24,7	7,9
3	110,5	1,2	-5,39	-32,3	-8,8
4	20,1	25,5	2,89	17,3	14,2
5	38,3	-8,8	5,29	31,7	7,1
6	78,1	-4,3	-3,86	-23,1	-11,5
7	40,4	10,6	4,82	28,9	9,4

2) Betina

No	sgot	sgpt	BUN (mmol/L)	Ureum	creatinin (umol/L)
1	10,8	19,2	-2,25	-13,5	-7,1
2	75,3	13,9	0,11	0,7	-8,9
3	6	24,6	-2,89	-17,4	-7,1
4	87,9	7,7	-2,03	-12,1	-10,6
5	46,8	18,7	-1,61	-9,6	-3,6
6	145,4	16,9	-2,28	-13,7	0
7	15,6	11,9	-2,83	-16,8	-8,8

Ket. Tanda (-) terjadi peningkatan kadar

d. Kelompok kontrol tanpa perlakuan

Tabel 13. Perubahan kadar SGOT, SGPT, BUN, ureum dan kreatinin pada hari ke-0 (sebelum perlakuan) pada kelompok kontrol tanpa perlakuan

1) Jantan

No	sgot	sgpt	BUN (mmol/L)	Ureum	creatinin (umol/L)
1	-12,7	-1,4	-3,25	-19,5	-13,3
2	-90,6	-0,1	-4,53	-27,2	-12,3
3	-33,4	2,9	-3,86	-23,1	-15,9
4	5,4	-6,8	-5,36	-32,1	-7,9
5	18,8	3,8	-0,39	-2,4	2,6
6	-7,1	3,9	-6,78	-40,7	-14,1
7	43,3	-8,6	-5,64	-33,8	-15,9

2) Betina

No	sgot	sgpt	BUN (mmol/L)	Ureum	creatinin (umol/L)
1	-24,1	-3,7	-6,68	-4	3,5
2	-6,7	49,4	-4,56	-27,5	1,8
3	-64,2	34,5	-4,97	-29,8	-7,1
4	3,6	35,8	-1,71	-10,3	-3,5
5	3,9	14,3	-5,54	-33,3	-14,1
6	-56,6	-16,6	-4,43	-26,7	-8,8
7	4,9	-1,1	30,54	-50,12	15

Ket. Tanda (-) terjadi peningkatan kadar

2. Hasil penimbangan berat badan

Perlakuan ramuan jamu mengakibatkan peningkatan berat badan yang lebih rendah dibandingkan kontrol tanpa perlakuan, dengan perbedaan yang bermakna baik pada tikus jantan maupun betina.

Tabel 14. Perubahan berat badan tikus sebelum dan sesudah perlakuan

a. Tikus jantan

Kelp.	Bulan			Kelp.	Bulan			Kelp.	Bulan			Kelp.	Bulan						
	I	III	selisih		I	III	selisih		I	III	selisih		I	III	selisih				
A	1	60	252	192	B	1	62	253	191	C	1	67	227	160	D	1	70	332	262
	2	69	261	192		2	86	245	159		2	71	214	143		2	71	314	243
	3	66	263	197		3	65	225	160		3	59	256	197		3	89	272	183
	4	70	235	165		4	58	162	104		4	65	186	121		4	82	250	168
	5	52	222	170		5	69	238	169		5	102	276	174		5	83	284	201
	6	85	221	136		6	68	222	154		6	62	205	143		6	63	257	194
	7	80	270	190		7	73	229	156		7	73	203	130		7	75	309	234
Purata		68,9	246,3	177,4	Purata		68,7	224,9	156,1	Purata		71,3	223,9	152,6	Purata		76,1	288,3	212,1
SD		11,2	20,2	22,0	SD		9,1	29,9	26,2	SD		14,4	31,8	26,4	SD		9,0	30,9	34,6

b. Tikus betina

Kelp.	Bulan			Kelp.	Bulan			Kelp.	Bulan			Kelp.	Bulan						
	I	III	selisih		I	III	selisih		I	III	selisih		I	III	selisih				
A	1	90	174	84	B	1	71	187	116	C	1	89	172	83	D	1	62	169	107
	2	72	203	131		2	75	184	109		2	62	168	106		2	61	186	125
	3	68	187	119		3	73	194	121		3	79	191	112		3	57	169	112
	4	76	163	87		4	64	180	116		4	73	190	117		4	63	217	154
	5	61	148	87		5	76	185	109		5	70	164	94		5	70	181	111
	6	96	169	73		6	63	173	110		6	83	162	79		6	80	202	122
	7	74	163	89		7	64	173	109		7	78	160	82		7	96	225	129
Purata		76,7	172,4	95,7	Purata		69,4	182,3	112,9	Purata		76,3	172,4	96,1	Purata		69,9	192,7	122,9
SD		12,3	18,0	21,0	SD		5,6	7,6	4,8	SD		8,9	13,0	15,6	SD		13,8	22,5	15,9

Keterangan

- A : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 8000 mg/kg BB tikus
- B : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 4000 mg/kg BB tikus
- C : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 2000mg/kg BB tikus
- D : kelompok kontrol tanpa perlakuan

3. Hasil penimbangan organ

Tidak ada perbedaan yang bermakna antara berat organ utama tikus jantan dan betina yang diberikan perlakuan ramuan jamu dibandingkan tikus kontrol tanpa perlakuan.

Tabel 13. Berat organ setelah perlakuan ramuan jamu selama 3 bulan

a. Tikus jantan

Kelompok		Berat Organ (gram)					
		Hati	Ginjal	Jantung	Limpa	Lambung	Paru
A	Purata	8,3	1,6	0,8	0,6	1,7	1,8
	SD	1,2	0,2	0,1	0,1	0,3	0,6
B	Purata	7,3	1,6	0,7	0,5	1,9	1,3
	SD	1,3	0,2	0,1	0,1	0,6	0,3
C	Purata	7,6	1,4	0,7	0,5	2,2	1,4
	SD	0,8	0,2	0,1	0,1	0,9	0,2
D	Purata	8,2	2,0	0,9	0,5	2,8	1,4
	SD	1,0	0,2	0,2	0,1	0,4	0,1

b. Tikus betina

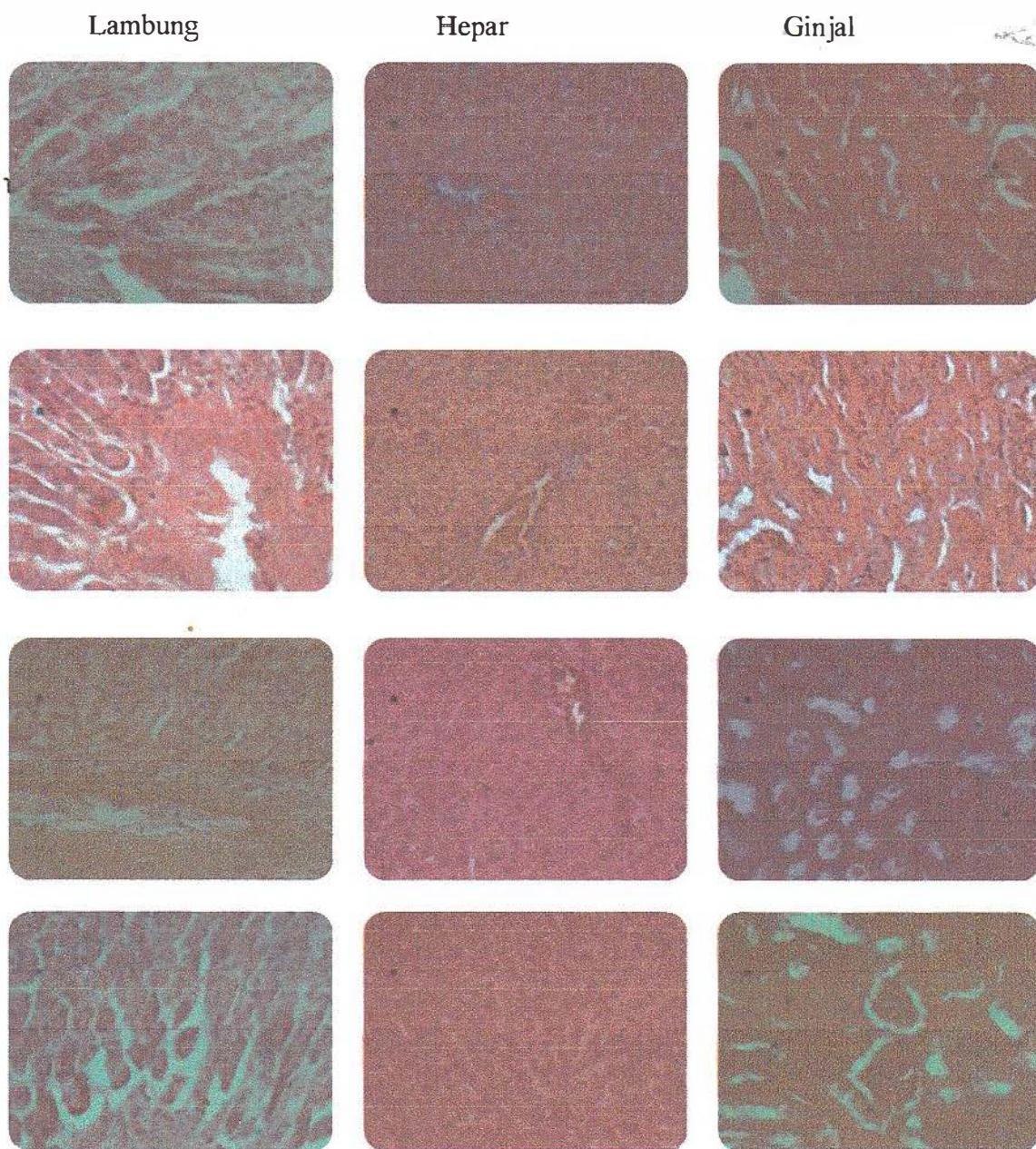
Kelompok		Berat Organ (gram)						
		Hati	Ginjal	Jantung	Uterus	Limpa	Lambung	Paru
A	Purata	8,3	1,6	0,7	0,6	0,7	1,3	1,4
	SD	1,1	0,3	0,1	0,1	0,3	0,4	0,2
B	Purata	8,2	1,4	0,7	0,9	0,6	1,5	1,3
	SD	0,8	0,1	0,1	0,5	0,1	0,3	0,2
C	Purata	7,6	1,4	0,7	0,6	0,5	2,2	1,4
	SD	0,8	0,2	0,1	0,3	0,1	0,9	0,2
D	Purata	7,4	1,7	0,7	1,0	0,5	1,6	1,2
	SD	1,3	0,2	0,1	0,4	0,1	0,2	0,2

Keterangan

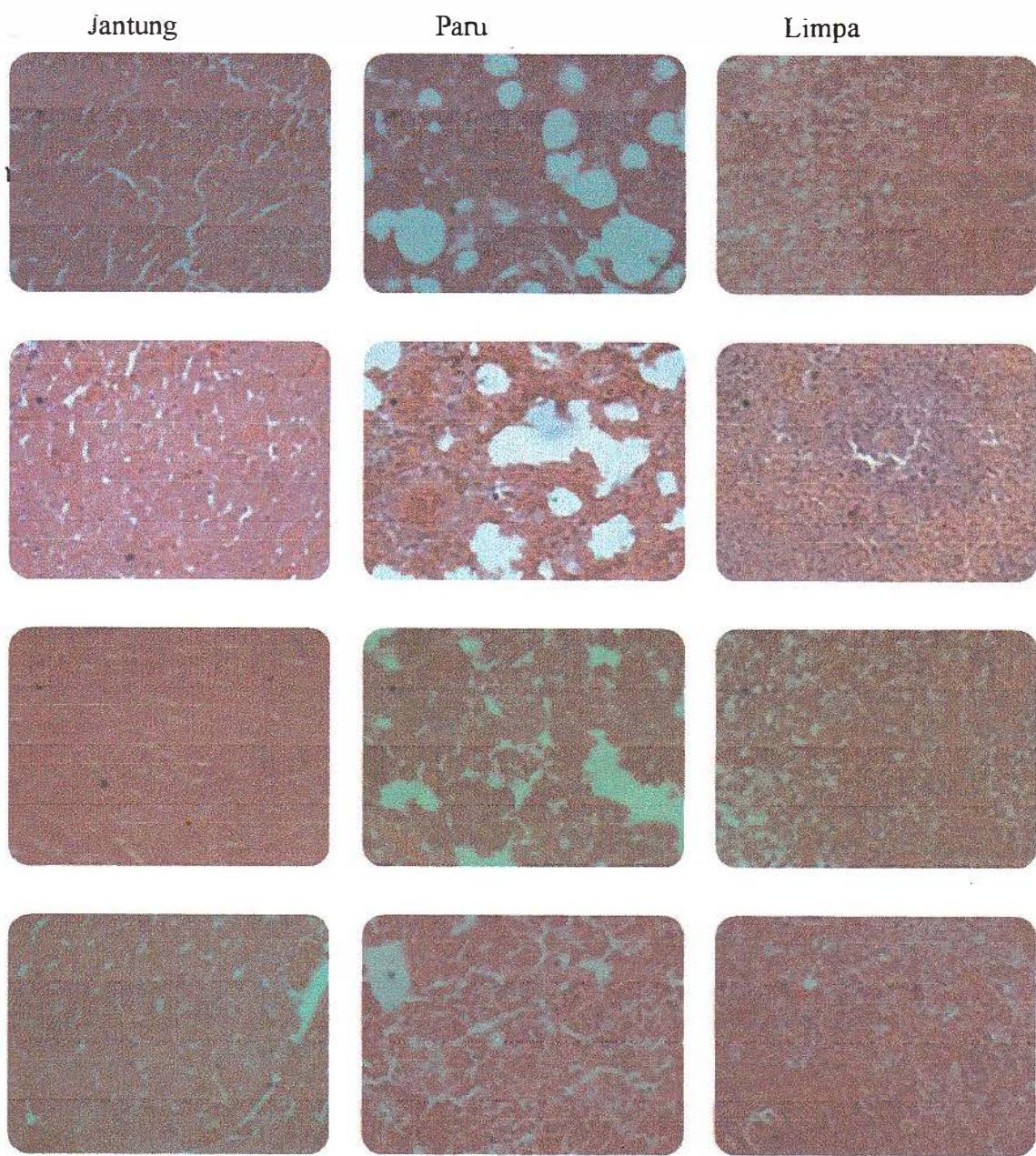
- A : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 8000 mg/kg BB tikus
- B : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 4000 mg/kg BB tikus
- C : kelompok perlakuan ramuan jamu konsentrasi 2000mg/kg BB tikus
- D : kelompok kontrol tanpa perlakuan

4. Hasil pemeriksaan histopatologis

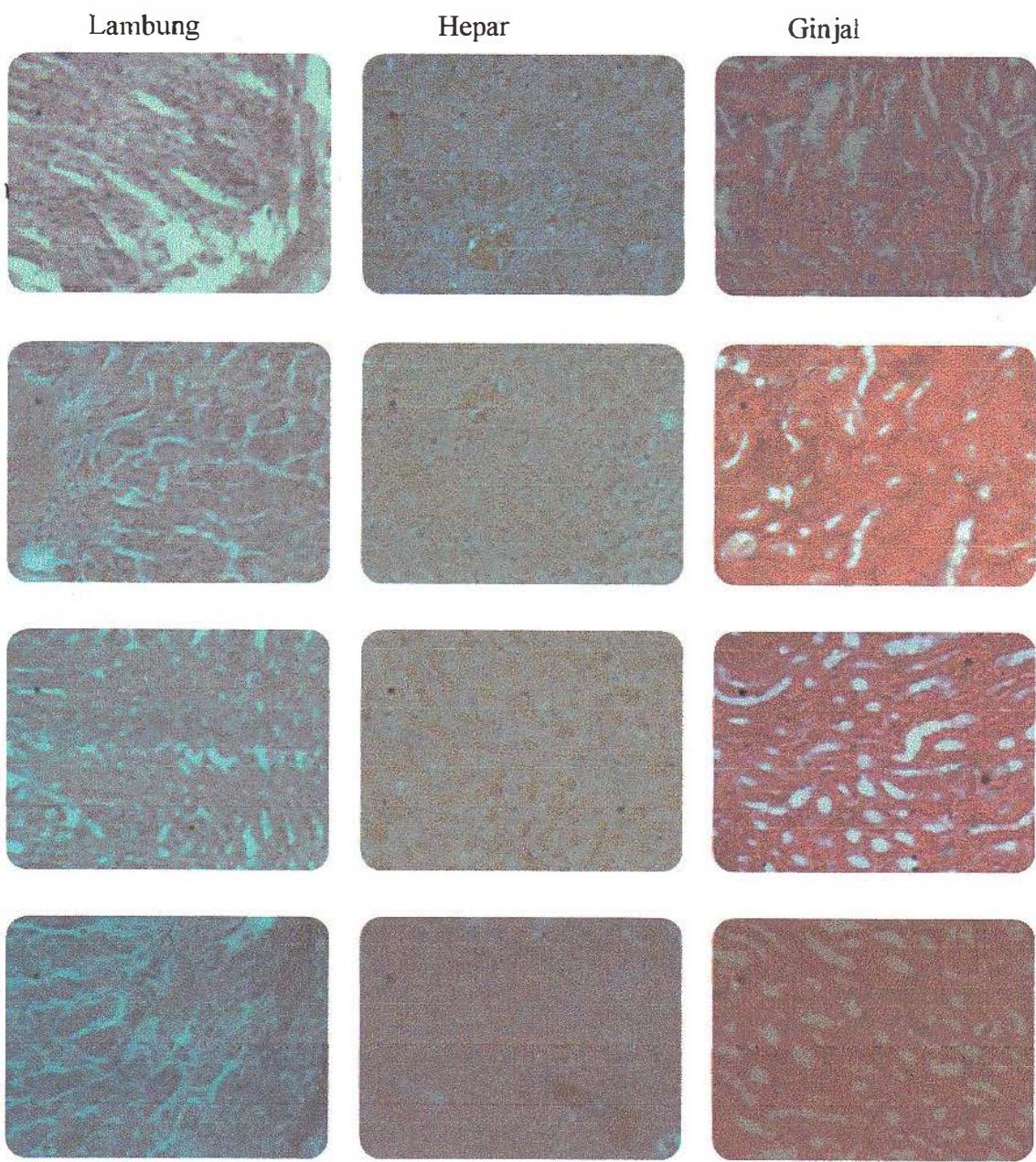
Tidak ada perbedaan gambaran histologi organ utama tikus jantan dan betina yang diberikan ramuan jamu selama 90 hari dibandingkan kontrol tanpa perlakuan



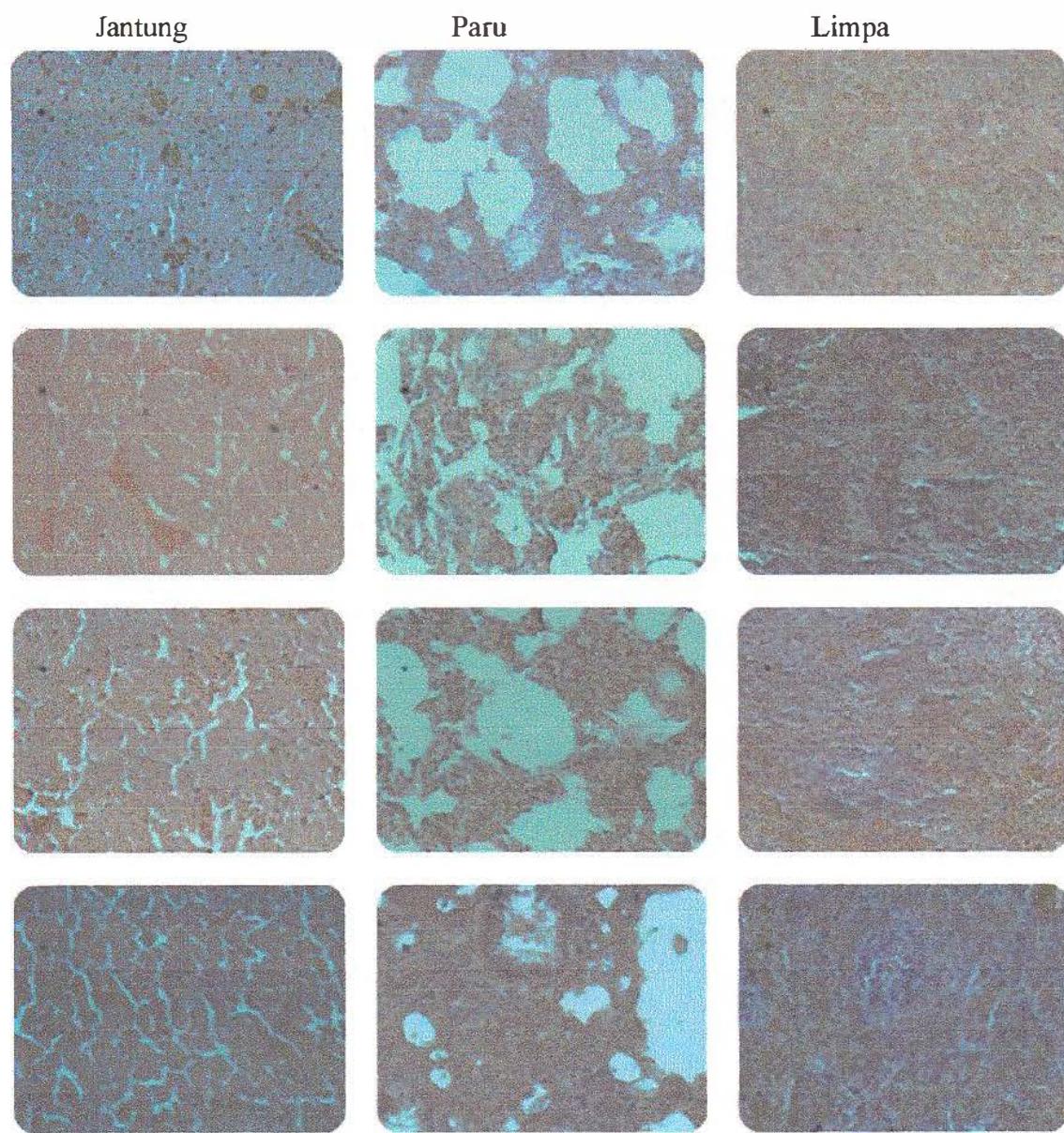
Gambar 8. Gambaran histologi organ lambung, hepar, dan ginjal tikus jantan dengan pengecatan HE setelah perlakuan sesuai kelompoknya, dari atas ke bawah: kontrol tanpa perlakuan, dosis 8000, 4000 dan 2000 mg/kg bb (perbesaran 400x)



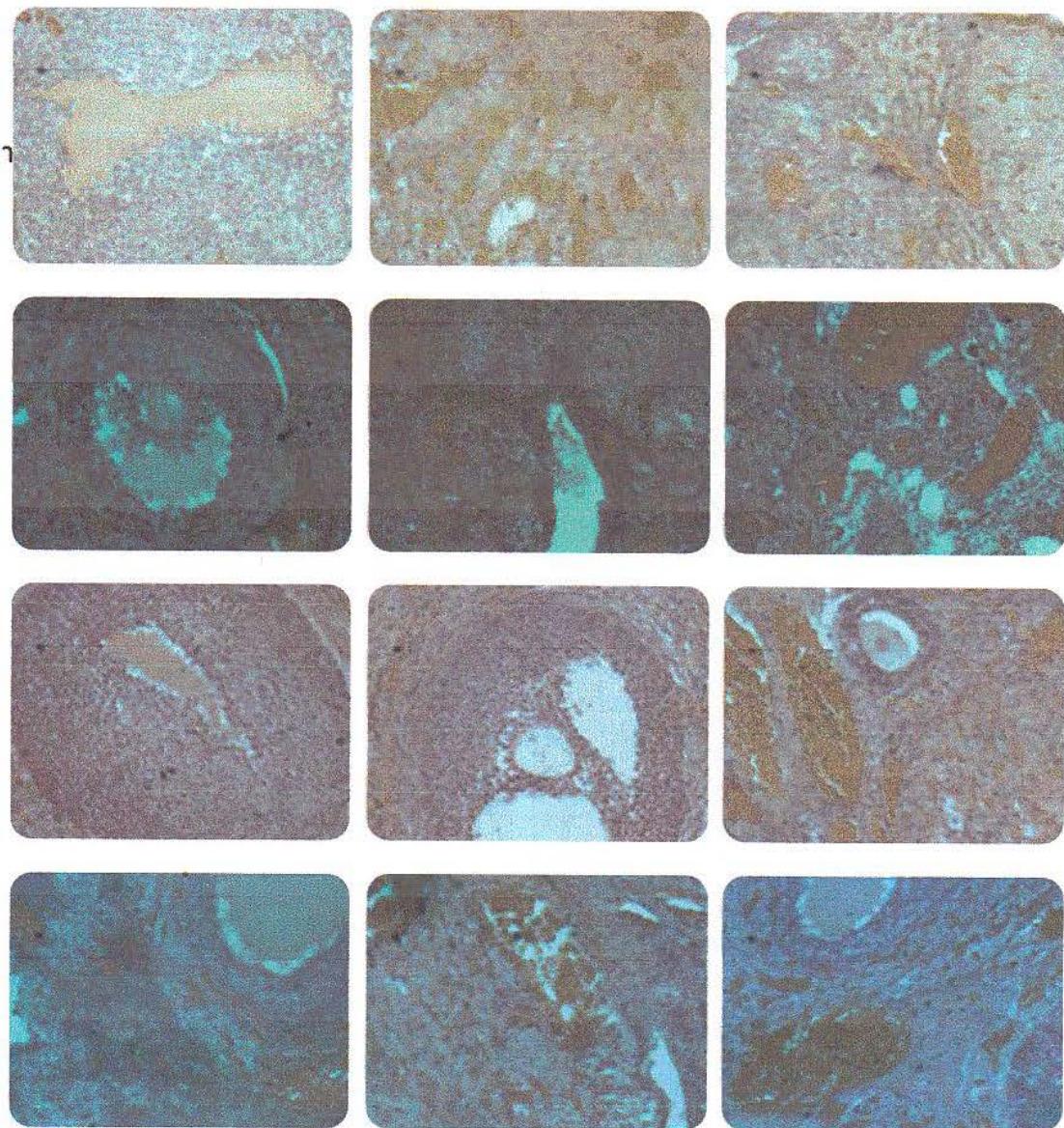
Gambar 9. Gambaran histologi organ jantung, paru, dan limpa tikus jantan dengan pengecatan HE setelah perlakuan sesuai kelompoknya, dari atas ke bawah: kontrol tanpa perlakuan, dosis 8000, 4000 dan 2000 mg/kg bb (perbesaran 400x)



Gambar 10. Gambaran histologi organ lambung, hepar, dan ginjal tikus betina dengan pengecatan HE setelah perlakuan sesuai kelompoknya, dari atas ke bawah: kontrol tanpa perlakuan, dosis 8000, 4000 dan 2000 mg/kg bb (perbesaran 400x)



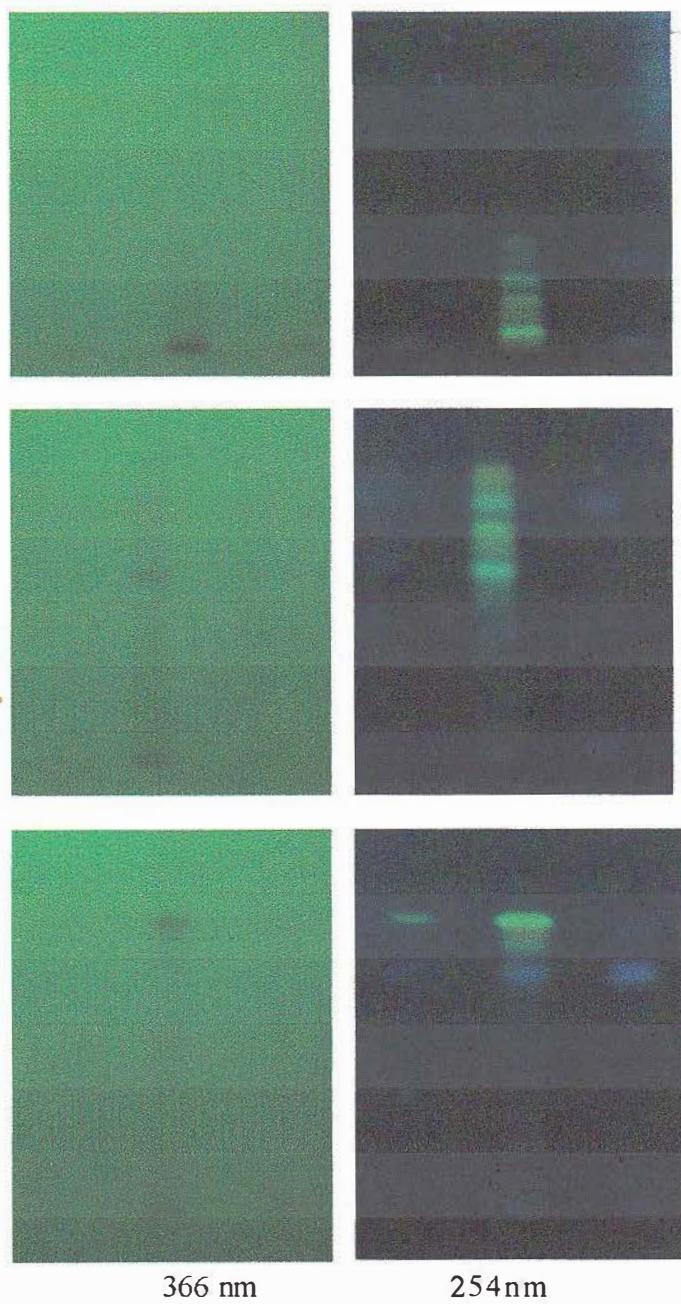
Gambar 11. Gambaran histologi organ jantung, paru, dan limpa tikus betina dengan pengecatan HE setelah perlakuan sesuai kelompoknya, dari atas ke bawah: kontrol tanpa perlakuan, dosis 8000, 4000 dan 2000 mg/kg bb (perbesaran 400x)



Gambar 12. Gambaran histologi organ uterus tikus betina dengan pengecatan HE setelah perlakuan sesuai kelompoknya, dari atas ke bawah: kontrol tanpa perlakuan, dosis 8000, 4000 dan 2000 mg/kg bb (perbesaran 400x)

D. PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS

Berikut adalah profil kromatografi ramuan jamu yang telah dipreparasi dengan tiga metode yang berbeda, dieluasi dengan 3 macam eluen dan divisualisasi di bawah sinar UV panjang gelombang 366 dan 254 nm.



Gambar 13. Profil KLT dengan 3 jenis eluen, dari atas ke bawah: kloroform; toluen:eter (5 : 5); dan kloroform:etanol:asam asetat (94:5:1)

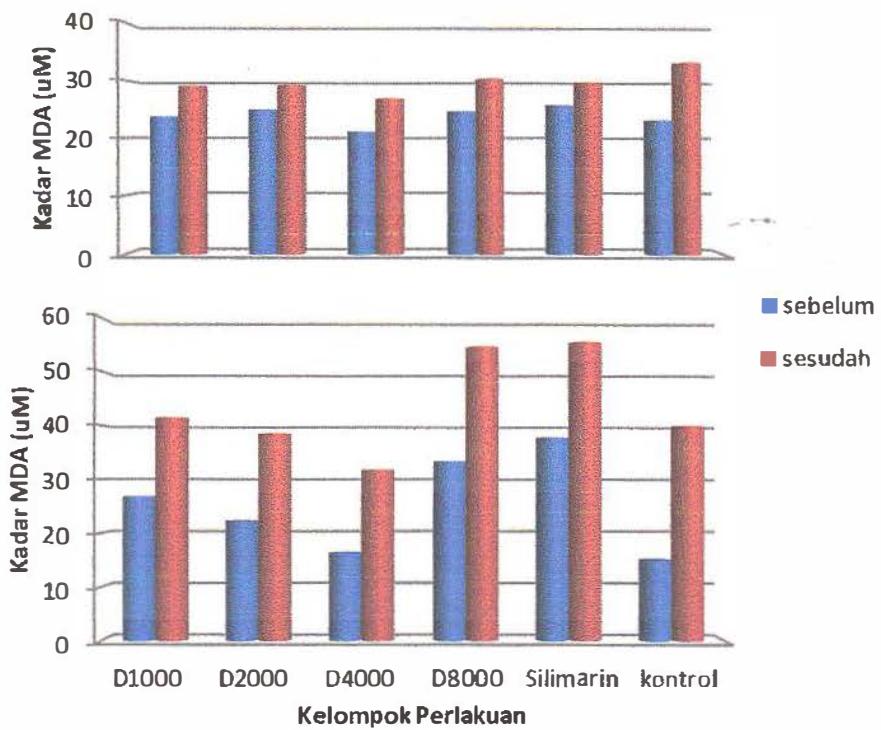
BAB V

PEMBAHASAN

Potensi hepatoprotektif ramuan jamu dalam penelitian ini ditelusuri melalui mekanisme peroksidasi lipid menggunakan parasetamol (acetaminophen) dosis 500 mg/kg bb sebagai induktor kerusakan sel hati. Parasetamol adalah salah satu senyawa analgesik-antipiretik yang umum dan aman digunakan, namun dapat bersifat hepatotoksin jika dikonsumsi melewati ambang dosis terapi. *Over dose* parasetamol berkontribusi sekitar 39% dari total kejadian klinik yang berakibat pada kerusakan sel hati. Adanya relevansi antara besaran dosis dengan tingkat kerusakan sel hati secara praklinik merupakan salah satu alasan penggunaan parasetamol dalam evaluasi penemuan agent hepatoprotektif (Lee, 2003).

Metabolisme parasetamol diaktifasi oleh enzim sitokrom P450 yang menghasilkan metabolit reaktif *N-acetyl-p-benzoquinone imine* (NAPQI). NAPQI berikatan kovalen dengan protein seluler yang mengakibatkan disfungsi protein, peroksidasi lipid, kerusakan DNA, dan *stress oxidative*. Mekanisme kerusakan tersebut melalui peningkatan sintesis *nitric oxide* (NO) menghasilkan superoksida yang menyebabkan kerusakan mitokondria (Holt and Ju, 2006).

Peroksidasi lipid merupakan salah satu mekanisme kerusakan sel yang digunakan sebagai indikator adanya stres oksidatif di sel dan jaringan. Peroksidasi melibatkan lipid tidak jenuh membentuk radikal bebas yang bersifat racun dan merusak sistem organ. Kerusakan tersebut mempengaruhi senyawa poli-lipid tidak jenuh yang kemudian bereaksi membentuk lipid peroksid. Lipid peroksid adalah turunan dari poli asam lemak tidak jenuh, tidak stabil dan terdekomposisi menjadi beberapa produk degradasi. MDA/malondialdehyde adalah produk akhir dari peroksidasi lipid (El Badry, 2006). Semakin tinggi kadar MDA maka semakin berat pula tingkat kerusakan sel. Kuantifikasi MDA dilakukan melalui uji TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*) dengan metode spektrofotometri menggunakan elisa reader. Hasil pengukuran kadar MDA serum darah kelompok perlakuan dan kontrol dapat dilihat pada Gambar 14.



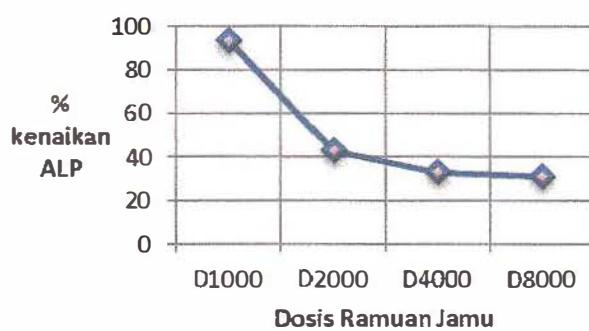
Gambar 14. Pengaruh perlakuan ramuan jamu terhadap kadar MDA pada tikus jantan (atas) dan tikus betina (bawah)

Dari diagram di atas dapat dilihat terdapat perbedaan pada tikus jantan dan betina. Kelompok kontrol perlakuan (hanya diberikan parasetamol) menunjukkan peningkatan kadar MDA, sebesar 30.1% pada tikus jantan dan 65.2% pada tikus betina. Infusa ramuan jamu (temulawak, kunyit dan jombang) yang diberikan pada tikus, dapat mencegah kenaikan kadar MDA sehingga tidak setinggi kelompok kontrol parasetamol. Kenaikan MDA pada tikus jantan berkisar 21-23%, tertinggi pada kelompok dosis 1000 mg/kg bb; sedangkan tikus betina berkisar 35-48%, tertinggi pada dosis 4000 mg/kg bb. Penurunan kadar MDA antar dosis ramuan tidak berbeda bermakna, namun berbeda nyata dibandingkan dengan kelompok kontrol. Silimarin standar mampu menurunkan kadar MDA pada tikus jantan hingga hampir sama dengan kadar awalnya, sedangkan pada tikus betina sebesar 32%, lebih kecil dibandingkan ramuan jamu yang digunakan.

Parameter kedua yang digunakan adalah ALP (alkaline phosphatase). ALP merupakan enzim yang mengkatalis hidrolisis ester fosfat dalam lingkungan basa, menghasilkan formasi radikal fosfat organik dan anorganik. Pada mamalia, enzim ini terutama ditemukan dalam hepar dan tulang. Peningkatan kadar ALP adalah indikator kerusakan seluler karena terjadi penurunan atau kehilangan fungsi integritas membran sel hati.

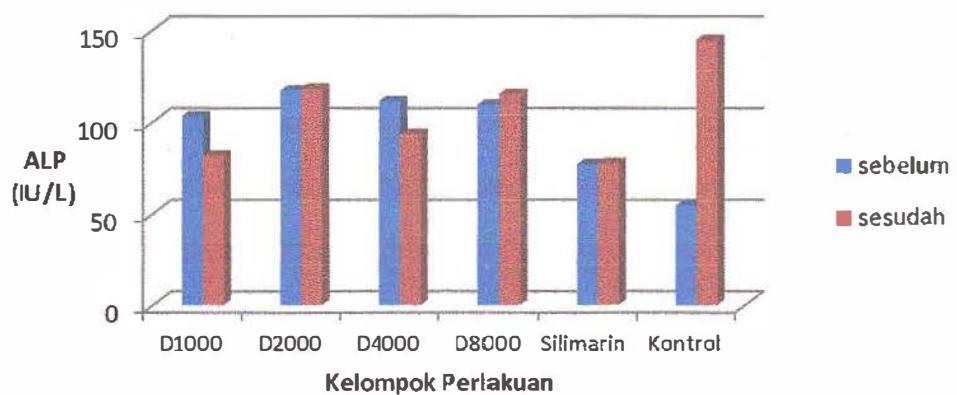
Peristiwa tersebut dinamakan *hyperalkaline phosphatasemia*, dan diasosiasikan dengan beberapa penyakit termasuk hepar sirosis dan *hepatic lymphoma* (Devaraj *et al.*, 2010).

Ramuan jamu yang diberikan pada tikus jantan dapat mencegah terjadinya kenaikan level ALP serum di bawah kontrol parasetamol tanpa perlakuan. Kadar ALP pada tikus kontrol meningkat hingga 118.8% sedangkan tikus yang diberikan ramuan jamu (33.5-32.0%). Tingkat kenaikan level ALP pada tikus jantan dan korelasinya dengan dosis ramuan dapat dilihat pada grafik berikut ini.



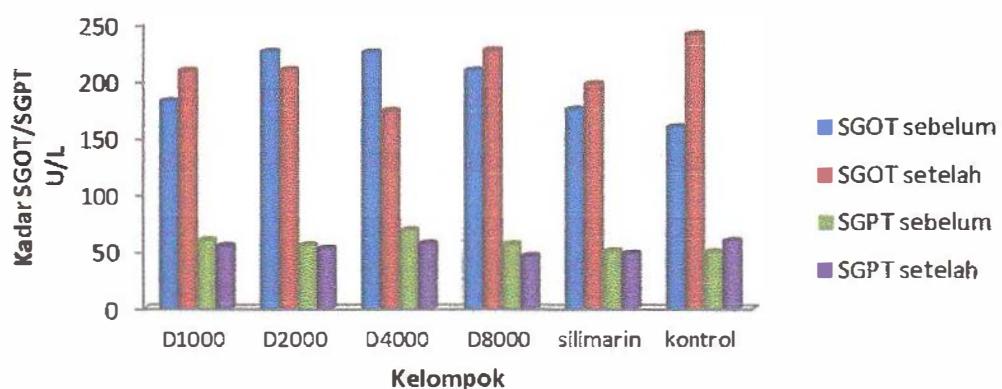
Gambar 15. Korelasi peningkatan level ALP dengan dosis ramuan jamu yang diberikan pada tikus jantan

Pada tikus betina, hambatan kenaikan ALP tidak berkorelasi dengan dosis ramuan jamu. Pada dosis 2000 mg/kg BB, ramuan jamu dapat menekan kenaikan ALP hingga mendekati batas level awalnya, tidak berbeda bermakna dengan silimarin. Pada dosis 1000 dan 4000 mg/kg bb, level ALP bahkan turun di bawah level ALP awal. Gambaran level ALP karena pengaruh ramuan jamu dapat dilihat pada grafik berikut ini.



Gambar 16. Pengaruh perlakuan ramuan jamu dan silimarin terhadap kadar ALP pada tikus betina yang diinduksi parasetamol

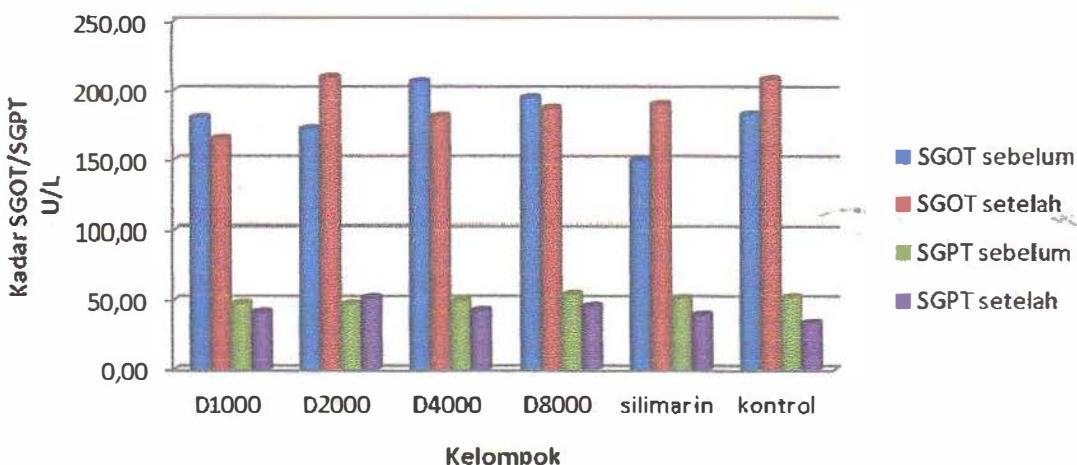
Parameter selanjutnya, yang menggambarkan fungsi hati secara umum adalah kadar enzim SGOT (*serum glutamic-oxaloacetic transaminase*), dan SGPT (*serum glutamic-pyruvic transaminase*). Kadar SGOT dan SGPT akan menunjukkan kenaikan bermakna jika terjadi kerusakan atau radang pada jaringan hati. Parasetamol menyebabkan peningkatan kadar SGOT hingga 51.2% dan SGPT 19.8% pada tikus jantan. Pengaruh perlakuan terhadap induksi parasetamol dapat dilihat pada grafik berikut.



Gambar 17. Perubahan kadar SGPT dan SGOT pada tikus jantan karena induksi parasetamol

Pemberian ramuan jamu dosis 2000 dan 4000 mg/kg bb dapat menurunkan kadar SGPT dan SGOT hingga di bawah kadar awalnya. Sedangkan pada dosis 1000 dan 8000 mg/kg bb, kenaikan SGPT dan SGOT dapat dicegah hingga di bawah kontrol parasetamol, setara dengan efek silimarin.

Pemberian parasetamol pada tikus betina menaikkan kadar SGOT sebesar 13.81%, sedangkan SGPT tidak mengalami perubahan. Perlakuan ramuan jamu dosis 1000, 2000 dan 8000 mg/kg bb dapat menurunkan kadar SGPT dan SGOT tetapi tidak berbeda bermakna dibandingkan kontrol. Sedangkan jamu dosis 4000 mg/kg bb dan silimarin tidak dapat menghambat peningkatan kadar SGPT dan SGOT. Gambaran perubahan kadar SGPT dan SGOT dapat dilihat pada grafik berikut.



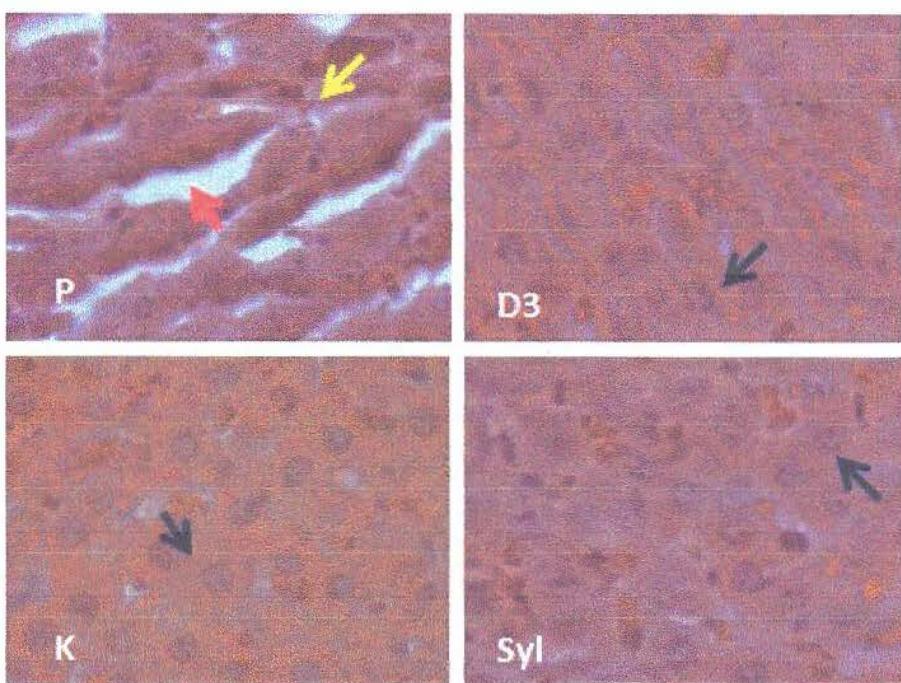
Gambar 18. Perubahan kadar SGPT dan SGOT pada tikus betina karena induksi parasetamol

Bilirubin merupakan pigment empedu yang merupakan produk hasil pemecahan sel-sel darah merah yang sudah tua. Peningkatan level bilirubin merupakan salah satu etiologi kerusakan/gangguan fungsi hati. Umumnya sebagai hasil dari kerusakan sel hati (hepatocytes). Pemberian parasetamol pada penelitian ini belum dapat menaikkan kadar bilirubin secara signifikan.

Hasil pengamatan histologi sel hati dengan pengecatan hematoksilin-eosin (HE) pada kelompok kontrol tanpa perlakuan menunjukkan gambaran sel yang mengalami nekrosis. Nekrosis adalah bentuk kematian sel yang ditandai dengan karyorhexis (disintegrasi nukleus), karyolysis (sel kehilangan nucleus), pembengkakan sel dan disintegrasi membran sel. Nekrosis disebabkan oleh adanya peningkatan volume sel dan berkurang/hilangnya tekanan membran karena pelepasan enzim lisis lisosomal seperti nuklease dan protease sehingga menghasilkan sel lisis disertai respon inflamasi (Cruchten and Broeck, 2002).

Gambaran histologi sel hati pada perlakuan kontrol parasetamol memperlihatkan indeks nekrosis yang sangat luas. Nekrosis teramat pada tahap pengeluaran organel sel serta disintegrasi membran disertai inflamasi dan terjadi pada hampir seluruh bagian preparat. Selain pengamatan histologi, inflamasi ditunjukkan dengan adanya peningkatan berat organ hati hingga 20% pada kelompok kontrol, sedangkan tikus yang diberikan ramuan jamu dan silimarin tidak terdapat kenaikan berat organ hati. Kelompok dengan perlakuan silimarin atau ramuan jamu memberikan indeks nekrosis yang lebih kecil

dibandingkan kontrol. Pengamatan histologi sel hati di bawah mikroskop kelompok kontrol dan perlakuan dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 19. Histologi sel hati pada kelompok kontrol tanpa perlakuan (K); pada kelompok parasetamol (P) terlihat perubahan morfologi sel, organel sel keluar dari sitoplasma (panah kuning) dan terlihat disintegrasi sel (panah merah). D3 adalah kelompok yang diinduksi parasetamol dan diberikan ramuan jamu dosis 4000 mg/kg bb atau silimarin (syl), terlihat sel normal (panah hitam) masih mendominasi

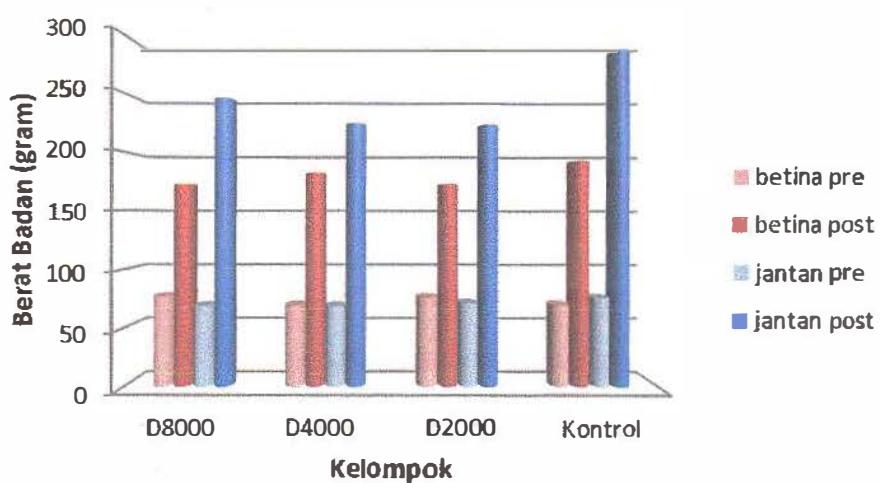
Hasil pengukuran kadar MDA, ALP, SGPT dan SGOT, serta gambaran histologi sel hati menunjukkan bahwa ramuan jamu yang digunakan cukup potensial dikembangkan sebagai agent hepatoprotektif. Keamanan ramuan jamu secara praklinik dikaji dengan uji toksisitas akut dan subkronis. Uji toksisitas menggunakan hewan coba jantan dan betina dengan kontrol tanpa perlakuan.

Uji toksisitas akut hingga dosis 100 g/kg bb tidak menunjukkan kematian atau tanda-tanda perilaku yang menyimpang. Dengan demikian ramuan jamu yang digunakan masuk dalam kategori praktis tidak toksik. Sedangkan keamanan jangka panjang ditetapkan dengan uji toksisitas subkronik, pemberian jamu dosis 8000, 4000, dan 2000 mg/kg bb, diberikan sekali sehari selama 90 hari. Parameter darah yang diukur adalah SGOT, SGPT, BUN, ureum dan kreatinin. Kadar SGOT, SGPT dan BUN merupakan

indikator terhadap fungsi hati, sedangkan ureum dan kreatinin adalah parameter fungsi ginjal.

Kadar kreatinin dalam darah merupakan salah satu parameter yang dapat digunakan untuk mendiagnosis adanya kegagalan ginjal yaitu dengan mengukur laju filtrasi glomerulus (Glomerular filtration rate=GFR). Kreatinin diproduksi dalam jumlah yang sama dan diekresi melalui urin setiap hari. Sedangkan ureum adalah produk nitrogen yang dikeluarkan ginjal yang berasal dari menu makanan dan protein. Pada penderita gagal ginjal, kadar ureum memberikan gambaran yang paling baik untuk timbulnya ureum toksik dan merupakan gejala yang dapat dideteksi dibandingkan kreatinin (Nissl *et al.*, 2004). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada dosis yang digunakan, perubahan parameter darah yang diukur tidak berbeda secara bermakna dengan kontrol tanpa perlakuan.

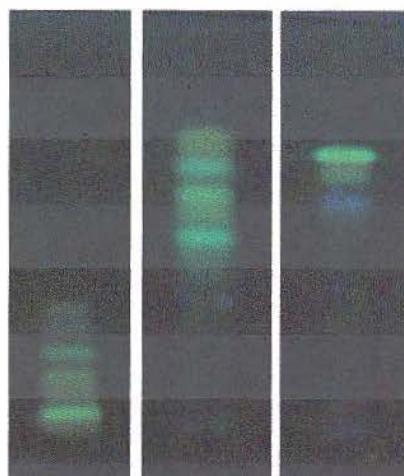
Pengamatan selanjutnya adalah berat badan tikus sebelum dan sesudah perlakuan. Berat badan terakhir diperoleh pada hari ke-90 setelah perlakuan, sesaat sebelum nekropsi. Kelompok perlakuan ramuan jamu mengalami kenaikan berat badan yang lebih kecil dibandingkan kelompok kontrol, namun masih berada dalam kisaran normal (Gambar 20). Hal tersebut karena rimpang temulawak dan kunyit dalam ramuan jamu yang digunakan juga memiliki efek anti kolesterol sehingga dapat menghambat kenaikan berat badan.



Gambar 20. Peningkatan berat badan tikus selama 90 hari perlakuan

Parameter selanjutnya adalah spektrum ketoksikan terhadap organ utama (jantung, paru, hati, ginjal, lambung dan limpa serta uterus pada tikus betina). Pemberian ramuan jamu selama 90 hari tidak berpengaruh terhadap gambaran makroskopis dan mikroskopis. Gambaran makroskopis diamati segera setelah nekropsi, melalui pengamatan visual dan penimbangan. Gambaran histopatologi menggunakan metode pengecatan preparat dengan hematoksilin-eosin. Secara mikroskopis, preparat organ memperlihatkan susunan dan morfologi sel pembentuk jaringan yang tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol tanpa perlakuan.

Salah satu parameter mutu yang digunakan untuk mengetahui profil senyawa kimia yang ada dalam ramuan jamu adalah dengan kromatografi lapis tipis (KLT).



Cambar 21. Profil KLT ramuan jamu dengan 3 jenis eluen, dari kiri ke kanan: kloroform, toluen:eter (5 : 5), dan kloroform:etanol:asam asetat (94:5:1)

Berdasarkan hasil optimasi menggunakan 3 metode preparasi dan 3 jenis eluen, profil ramuan jamu paling baik menggunakan metode kombinasi ekstraksi dilanjutkan infusa, dapat dilihat pada gambar berikut. Profil KLT paling optimal dengan menggunakan eluen toluen:eter (5:5) dengan parameter spot yang dihasilkan dapat terpisah baik.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

I. KESIMPULAN

Kesimpulan hasil penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Parasetamol dosis 500 mg/kg bb yang diberikan sekali sehari pada tikus selama 7 hari dapat meningkatkan kadar serum SGPT, SGOT, MDA dan ALP sebagai indikator terjadinya kerusakan sel hati.
2. Infusa ramuan jamu yang terdiri dari rimpang temulawak, rimpang kunyit dan herba jombang (5:2:1) dosis 1000, 2000, 4000 dan 8000 mg/kg bb yang diberikan pada tikus bersama dengan parasetamol memberikan efek hepatoprotektif, berupa penghambatan kenaikan kadar SGPT, SGOT, MDA dan ALP, serta gambaran sel hati yang lebih baik dibandingkan kontrol.
3. Hasil uji toksitas akut menunjukkan bahwa ramuan jamu tersebut termasuk ke dalam kategori praktis tidak toksik. Dosis tertinggi yang masih dapat diberikan adalah 100 g/kg bb
4. Hasil uji toksitas subkronis menunjukkan bahwa ramuan jamu yang digunakan memberikan perubahan yang tidak berbeda nyata dengan kontrol tanpa perlakuan, terhadap parameter yang diukur yaitu SGPT, SGOT, BUN, ureum dan kreatinin serta gambaran histopatologi.

II. SARAN

1. Perlu dilakukan penetapan kualitas bahan baku lebih lanjut menggunakan KLT
2. Hasil penelitian ini dapat dijadikan sebagai salah satu data dasar untuk penelitian uji klinik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah menganugerahkan limpahan rahmat dan karunia yang tiada akhirnya, serta shalawat kepada Rasulullah Muhammad SAW sehingga Laporan Penelitian berjudul “Potensi Hepatoprotektif Ramuan Jamu” dapat diselesaikan. Selesainya laporan ini tidak terlepas dari dukungan serta bimbingan berbagai pihak dalam proses penelitian dan penyusunan laporannya , untuk itu penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Indah Yuning Prapti, SKM., M.Kes. selaku Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT)
2. Ketua PPI dan pejabat struktural B2P2TO-OT
3. Seluruh anggota tim penelitian
4. Seluruh rekan kerja di B2P2TO-OT atas segala bantuan dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis.

DAFTAR PUSTAKA

- Adewusi, EA. and Afolayan, A.J. 2010. A Review of Natural Products with Hepatoprotective activity. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(13), pp. 1318-1334.
- Cruchten SV. and Broeck WV. Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. *Anat. Histol. Embryol.* 31, 214-223
- Deshwal N., Sharma AK., and Sharma P. 2011. Review on Hepatoprotective Plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences review and Research*. Vol 7. Issue 1
- Devaraj S., Ismail S., Ramanathan S., Marimuthu S., and Mun Y. 2010. Evaluation of the hepatoprotective activity of standardized ethanolic extract of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *J. Med. Plant. Res.* Vol 4(23) p. 2512-2517
- El Badry AAM. 2006. Serum Malondialdehyde Levels as a Biomarker of Cellular InjuryIn Human Fascioliasis. *J T U Med Sc;* 1(1)
- Fu Y., Zheng S., Lin J., Ryerse J., And Chen A. 2008. Curcumin Protects The Rat Liver From Ccl4-Caused Injury Andfibrogenesis By Attenuating Oxidative Stress and Suppressing Inflammation *Mol Pharmacol* 73:399-409
- Holt MP. and Ju C. 2006. Mechanisms of drug-induced liver injury. *The AAPS Journal*; 8 (1) Article 6. P. 48-54
- Itokawa H., Shi Q., Akiyama T., Morris-Natschke SL. and Lee KH. 2008. Review: Recent advances in the investigation of curcuminoids. *Chinese Medicine* 3:11
- Kanchana N. and Sadiq M. 2011. Hepatoprotective effect of *Plumbago zeylanica* on paracetamol induced liver toxicity in rats. *Int J Pharm Sci.* Vol 3 p. 151-154
- Kanter M., Coskun O., and Budancamanak M. 2005. Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* L and *Urtica dioica* L on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. *World J gastroenterol* 11 (42): 6684-6688
- Lee WM., 2003. Review article: Medical Progress, Drug induced hepatotoxicity. *N Engl J Med*; 349:474-85.
- Levey, AS., Bosch, JP., Lewis, JB., Greene, T., Rogers, N., and Roth, D., 1999, A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation modification of diet in renal diseases study group. *Ann Intern Med.*, 130(6):461-470.
- M. Akram, Shahab-Uddin, Ahmed A., Usmanghani K, Hannan A, E. Mohiuddin, M. Asif. 2010. *Curcuma Longa* And Curcumin: A Review Article. *Rom. J. Biol. – Plant Biol.*, Volume 55, No. 2, P. 65–70
- Negi AS., J.K. Kumar, Luqman S., Shanker K., M.M. Gupta and S.P.S. Khanuja. 2008. Recent Advances in Plantheapatoprotectives: a chemical and Biological Profile of Some Important Leads. *Medicinal Research Reviews*, Vol. 28, No. 5, p. 746-772

Nissl, J.R.N., Van Houten, S., Landaner, T., Burgess, P., and Mendelsohn, D.J, 2004, Creatinine and clearance. *Nephrology* 20

Park C., Zhou Y. and Song Y. 2007. Hepatoprotective effect of dandelion (*Taraxacum officinale*) against acute liver injury induced by Carbon tetrachloride in Sprague-Dawley rats. *The FASEB Journal* 21:862.8

Pradhan S.C. and Girish C Review Article: Hepatoprotective Herbal Drug, Silymarin From Experimental Pharmacology To Clinical Medicine. *Indian J Med Res* 124, 491-504

Radko L. and Cybulski W. 2007. Application of Silymarin in Human and Animal Medicine. *Journal Of Pre-Clinical and Clinical Research*. Vol 1, No 1, 022-026

R Khabiya and A Joshi. 2010. A Review On Hepatotprotective Medicinal Plants. *Inter J Curr Trends Sci Tech*, 1(1): 16–27

Schütz K., Carle R., and Schieber A. 2006. Taraxacum—A Review on it's Phytochemical and Pharmacological Profile. *Journal of Ethnopharmacology*. Volume 107, Issue 3 P.313-323

Sharma RA., Gescher AJ., and Steward WP. 2005. Curcumin: The story so far. *European journal of Cancer* . 41 p. 1955-1968.

Singh A., Malhotra S. and Subban R. 2008. Plant Review: Dandelion (*Taraxacum officinale*) - Hepatoprotective Herb with Therapeutic Potential. *Phcog Rev*. Vol 2, Issue 3

Somchit M.N., Zuraini A, Bustamam AA, Somchit N., Sulaiman M.R., And Noratunlina R. 2005. Protective Activity Of Turmeric (*Curcuma longa*) in Paracetamol-Induced Hepatotoxicity In Rats. *International Journal of Pharmacology* I (3): 252-256

Yarnell E. and Abascal K. 2009. Review Article: Dandelion (*Taraxacum officinale* and *T. mongolicum*) *Integrative Medicine*. Vol. 8, No. 2.

LEMBAR PENGESAHAN

Penelitian dengan judul "**Studi Praktik Potensi Hepatoprotektif Jamu (Ramuan Temulawak, Kunyit dan Jombang)**", dinyatakan telah selesai dan telah dibahas Panitia Pembina Ilmiah (PPI) Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Badan Litbang Kesehatan.

Tawangmangu, Januari 2012

Menyetujui
Ketua PPI



Ir. Yuli Widiyastuti, M.P
NIP.197607171993032002

Ketua Pelaksana



Sari Haryanti, M.Sc., Apt
NIP. 197612242002122001



LAMPIRAN

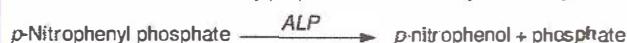
QuantiChrom™ Alkaline Phosphatase Assay Kit (DALP-250)

Colorimetric Kinetic Determination of Serum Alkaline Phosphatase Activity

DESCRIPTION

Alkaline phosphatase (ALP) catalyzes the hydrolysis of phosphate esters in an alkaline environment, resulting in the formation of an organic radical and inorganic phosphate. In mammals, this enzyme is found mainly in the liver and bones. Marked increase in serum ALP levels, a disease known as hyperalkalinephosphatasemia, has been associated with malignant biliary obstruction, primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, hepatic lymphoma and sarcoidosis.

Simple, direct and automation-ready procedures for measuring ALP activity in serum are becoming popular in Research and Drug Discovery. BioAssay Systems' QuantiChrom™ Alkaline Phosphatase Assay Kit is designed to measure ALP activity directly in biological samples without pretreatment. The improved method utilizes *p*-nitrophenyl phosphate that is hydrolyzed by ALP into a yellow colored product (maximal absorbance at 405nm). The rate of the reaction is directly proportional to the enzyme activity.



KEY FEATURES

High sensitivity and wide linear range. Use 5 µL serum or plasma sample. The detection limit is 2 U/L, linear up to 800 U/L

Homogeneous and simple procedure. Simple "mix-and-measure" procedure allows reliable quantitation of ALP activity within 5 minutes.

Robust and amenable to HTS. All reagents are compatible with high-throughput liquid handling instruments.

APPLICATIONS

Direct Assays: ALP activity in serum, plasma and other sources.

Characterization and Quality Control for ALP production.

Drug Discovery: high-throughput screen for ALP inhibitors and evaluation of ALP inhibitors.

KIT CONTENTS (250 tests in 96-well plates)

Assay Buffer: 50 mL, pH 10.5 Mg Acetate: 1.5 mL 0.2 M
pNPP Liquid: 600 µL 1 M Calibrator: 10 mL Tartrazine

Storage conditions. The kit is shipped at room temperature. Store pNPP Liquid at -20°C and other components at 4°C. Shelf life of 12 months.

Precautions: reagents are for research use only. Normal precautions for laboratory reagents should be exercised while using the reagents. Please refer to Material Safety Data Sheet for detailed information.

PROCEDURES. This assay is based on a kinetic reaction. Use of a multi-channel pipetor is recommended. Addition of Working Reagent to samples should be quick and mixing should be brief but thorough. Assays can be executed at room temperature or 37°C.

Reagent preparation: equilibrate reagents to room temperature. The Working Solution is prepared by mixing for each 96-well assay, 200 µL Assay Buffer, 5 µL Mg Acetate (final 5 mM) and 2 µL pNPP liquid substrate (10 mM). Fresh reconstitution is recommended, although the Working Solution is stable for at least one day at room temperature.

Sample preparation: ALP is stable for 48 hours at 4°C and 2 months at -20°C. EDTA, oxalate, fluoride, citrate are known inhibitors of ALP and should be avoided in sample preparation. Serum, plasma (no EDTA/citrate, ideally unhemolyzed) and cell culture media can be assayed directly. To measure intracellular ALP, cell lysate can be prepared as follows: 10⁶ cells are washed with PBS and lysed in 0.5 mL 0.2% Triton X-100 in distilled water by shaking for 20 min at room temperature.

Procedure using 96-well plate:

- Transfer 200 µL distilled water (H₂O) and 200 µL Calibrator into separate wells of a clear bottom 96-well plate.
- Carefully transfer 5 to 50 µL samples into other wells.
- Pipet 150 to 195 µL Working Solution to sample wells. The final reaction volume in the sample wells should be 200 µL. Tap plate briefly to mix.
- Read OD_{405nm} (*t* = 0), and again after 4 min (*t* = 4 min) on a plate reader.

5. Calculation: ALP activity of the sample (IU/L = µmol/(L·min)) is

$$= \frac{(OD_{SAMPLE\ t} - OD_{SAMPLE\ 0}) \cdot 1000 \cdot \text{Reaction Vol}}{t \cdot \epsilon \cdot 1 \cdot \text{Sample Vol}}$$

$$= \frac{(OD_{SAMPLE\ t} - OD_{SAMPLE\ 0}) \cdot \text{Reaction Vol}}{(OD_{CALIBRATOR} - OD_{H2O}) \cdot \text{Sample Vol} \cdot t} \times 35.3$$

OD_{SAMPLE_t} and OD_{SAMPLE₀} are OD_{405nm} values of sample at time *t* (e.g. 4) and 0 min. The factor 1000 converts mmol/L to µmol/L. *t* is the incubation time (min). For *p*-nitrophenol, ε = 18.75 mM⁻¹cm⁻¹. *l* (light path, cm) is 1 cm for cuvette, and calculated for 96-well assay from the Calibrator, *l* = (OD_{CALIBRATOR} - OD_{H2O})/(ε · c).

Procedure using Cuvette:

- Transfer 50 µL samples into 1-cm cuvettes.
- Pipet 950 µL Working Solution to samples. Mix briefly.
- Read OD_{405nm} shortly after the mixing, and again after 4 min.

4. Calculation: ALP activity of the sample (IU/L) is

$$= \frac{(OD_{SAMPLE\ t} - OD_{SAMPLE\ 0}) \cdot 1000 \cdot \text{Reaction Vol}}{t \cdot \epsilon \cdot 1 \cdot \text{Sample Vol}}$$

$$= 266.7 \times (OD_{SAMPLE\ t} - OD_{SAMPLE\ 0})$$

Note: (1) if sample ALP activity exceeds 800 IU/L, dilute samples in saline and repeat the assay, multiply the result by the dilution factor. (2) incubation can be prolonged for samples with low ALP activity.

MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

Pipeting devices and accessories (e.g. multi-channel pipettor).

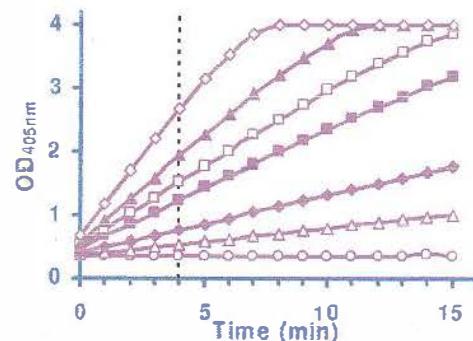
Procedure using 96-well plate:

Clear bottom 96-well plates (e.g. Corning Costar) and plate reader.

Procedure using cuvette:

Spectrophotometer and cuvets for measuring OD 405nm.

EXAMPLES. Samples were assayed in duplicate (*n* = 2) using the 96-well plate protocol. The ALP activity (U/L) was 13.4 ± 0.4 for a human serum, 190.4 ± 1.6 for rat serum and 202.8 ± 4.3 for goat serum.



Kinetics of ALP reaction in 96-well plate assay with increasing ALP concentration

PUBLICATIONS

- Kim, H.J. et al (2006) Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast. *J. Clin. Invest.* 116:2152-2160.
- Bhattacharya, A. et al (2006). Effect of fish oil on bone mineral density in aging C57BL/6 female mice. *J. Nutr. Biochem* 18(6):372-379.
- Wan, Y., Chong, L-W., & Evans, R.M. (2007). PPAR-γ regulates osteoclastogenesis in mice. *Nature Med.* 13(12): 1496-1503.

QuantiChrom™ TBARS Assay Kit (DTBA-100)

Quantitative Determination of Thiobarbituric Acid Reactive Substances

DESCRIPTION

Oxidative attack of essential cell components by reactive oxygen species has been associated with several human diseases, such as atherosclerosis, cardiovascular diseases, diabetes, liver disorders, and inflammatory rheumatic diseases. THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES (TBARS) are low-molecular-weight end products (mainly malondialdehyde, MDA) that are formed during the decomposition of lipid peroxidation products. Increased levels of TBARS have been demonstrated in these diseases. Simple, direct and accurate assays for TBARS find wide applications in research and drug discovery. BioAssay Systems' TBARS assay is based on the reaction of TBARS with thiobarbituric acid (TBA) to form a pink colored product. The color intensity at 535nm or fluorescence intensity at ($\lambda_{ex/em} = 560nm/585nm$) is directly proportional to TBARS concentration in the sample.

KEY FEATURES

Sensitive and accurate. Linear detection range: colorimetric assay 1 - 30 μM , fluorometric assay 0.1 - 1.5 μM MDA.

APPLICATIONS

Direct Assays: serum, plasma, urine, saliva and other biological samples.

Drug Discovery/Pharmacology: effects of drugs on TBARS.

KIT CONTENTS

TBA Reagent: 25 mL **Standard:** 50 μL 15 mM MDA
10% Trichloroacetic acid (TCA): 25 mL

Storage conditions. The kit is shipped at room temperature. Store all components at -20°C. Shelf life of six months after receipt.

Precautions: reagents are for research use only. Normal precautions for laboratory reagents should be exercised while using the reagents. Please refer to Material Safety Data Sheet for detailed information.

SAMPLE PREPARATION

Samples can be kept frozen at -80°C (stable for one month) if not assayed immediately. Urine and saliva samples can be assayed directly ($n = 1$). The following samples need to be deproteinized prior to assay:

- For serum and plasma, transfer 100 μL of each sample into a labeled 1.5-mL tube. For tissue samples, weigh ~20 mg into 200 μL ice-cold phosphate buffered saline (PBS). Homogenize tissue by brief sonication (e.g. 20 seconds) on ice. If desired, remove 20 μL aliquot for protein analysis. Place 100 μL tissue lysate into a labeled 1.5 mL micro-centrifuge tube. For cells, harvest 5×10^6 cells in 200 μL ice-cold PBS and sonicate to disrupt cells. If desired, remove 20 μL aliquot for protein analysis. Place 100 μL cell lysate into a labeled 1.5mL micro-centrifuge tube.

- Add 200 μL ice cold 10% TCA to the 100 μL of each sample. Incubate for 5 minutes on ice.

- Centrifuge 5 min at 14,000 rpm in an Eppendorf Centrifuge. Transfer 200 μL of each clear supernatant into a new labeled tube. Dilution factor for these pretreated samples is $n = 3$.

COLORIMETRIC ASSAY PROCEDURE

Set up water bath or heat block and adjust the temperature to 100°C. Equilibrate all components to room temperature. Add 450 μL dH₂O to the 15 mM Standard tube and mix (final 1.5 mM MDA). Store unused Standard at -20°C for future use.

- Standards.** Mix 15 μL of the 1.5 mM MDA with 735 μL dH₂O (final 30 μM MDA). Dilute standards as shown in the Table. Transfer 200 μL standards into labeled 1.5-mL screw cap tubes.

No	30 μM MDA + H ₂ O	Vol (μL)	MDA (μM)
1	300 μL + 0 μL	300	30.0
2	180 μL + 120 μL	300	18.0
3	90 μL + 210 μL	300	9.0
4	0 μL + 300 μL	300	0.0

Samples. Transfer 200 μL of each sample into separate tubes.

- Color reaction.** To each of the standards and samples, add 200 μL TBA Reagent. Vortex tubes to mix and incubate at 100°C for 60 min. Cool down tubes to room temperature. Vortex and briefly centrifuge tubes.

- Load 100 μL in duplicate from each tube to wells of a clear flat-bottom 96-well plate. Read OD at 535nm (525 to 545nm).

FLUORIMETRIC ASSAY PROCEDURE

The fluorescence assay is 20 times more sensitive than the colorimetric assay.

- Prepare the standards as described in the Colorimetric Assay Procedure. Transfer 10 μL of each Standard into labeled tubes. Add 190 μL dH₂O (final concentrations 0, 0.45, 0.90, 1.50 μM MDA).

Samples. In separate tubes, add 200 μL of treated samples.

- For color reaction, add 200 μL TBA Reagent. Vortex tubes to mix and incubate at 100°C for 60 min. Cool down tubes to room temperature. Vortex and briefly centrifuge tubes.

- Load 100 μL in duplicate from each tube to wells of a black flat-bottom 96-well plate. Read fluorescence intensity ($\lambda_{ex/em} = 560nm/585nm$) on a plate reader.

CALCULATION

Subtract blank OD or fluorescence intensity value (#4) from all standard and sample values. Plot the $\Delta\text{OD}_{535\text{nm}}$ or ΔF against standard concentrations and determine the slope of the standard curve. Calculate the TBARS concentration of Sample,

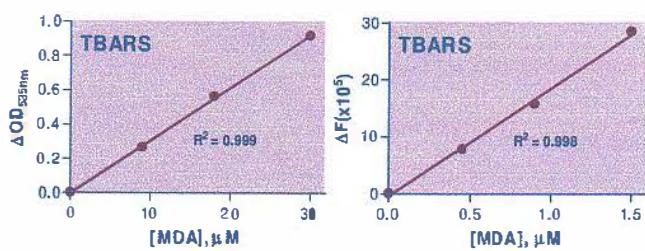
$$[\text{TBARS}] = \frac{R_{\text{Sample}} - R_{\text{Blank}}}{\text{Slope } (\mu\text{M}^{-1})} \times n \quad (\mu\text{M MDA equivalents})$$

R_{SAMPLE} and R_{BLANK} are the $\text{OD}_{535\text{nm}}$ or fluorescence intensity values of the sample and H₂O blank (standard #4). n is the sample dilution factor ($n = 3$ for deproteinized samples).

Note: if calculated TBARS concentration is higher than 30 μM MDA (colorimetric assay) or 1.5 μM MDA (fluorometric assay), dilute sample in dH₂O and repeat assay. Multiply the results by the dilution factor.

MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

Pipetting devices, centrifuge tubes, centrifuge, clear flat-bottom uncoated 96-well plates, optical density or fluorescence plate readers, sonicator, water-bath or heat block.



LITERATURE

- Yagi, K. (1976). A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Res.* 15:212-216.
- Satoh, K. (1978). Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorder determined by a new colorimetric method. *Clin. Chim. Acta* 90:37-43.
- Okawa H. et al (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95:351-358.