



Efek *Andrographolide* terhadap Gambaran Histopatologi Sel Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Jantan Galur Wistar yang Diinduksi Karbon Tetraklorida (CCl_4)

Vincent Sanjaya,¹ Andriani,² Muhammad In'am Ilmiawan²

¹Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, ²Departemen Biokimia, Program Studi Pendidikan Dokter, ³Departemen Biologi dan Patobiologi, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak, Kalimantan Barat, Indonesia

ABSTRAK

Pendahuluan: Tanaman *Andrographis paniculata* mengandung senyawa *andrographolide* (golongan senyawa diterpene lakton) dengan efek hepatoprotektor. *Andrographolide* mendonorkan ion hidrogen bebas kepada elektron bebas dari radikal bebas, sehingga menjadi senyawa yang lebih stabil dan mengurangi kerusakan hepar. **Metode:** Desain penelitian ini adalah desain *post-test only with control group*. Sampel penelitian ini menggunakan organ hati tikus (*Rattus norvegicus*). Sebanyak 24 ekor tikus dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu kelompok normal, kelompok kurkumin sebagai kontrol positif, kelompok tetraklorida sebagai kontrol negatif, dan kelompok perlakuan dengan dosis *andrographolide* 50 mg/kgBB, *andrographolide* 100 mg/kgBB, dan *andrographolide* 200 mg/kgBB dengan jumlah 4 ekor tikus di masing-masing kelompok. Karbon tetraklorida diberikan pada hari ke-1, kemudian kurkumin dan *andrographolide* diberikan selama 7 hari. Organ hepar diambil pada hari ke-9 untuk pembuatan preparat untuk menilai kerusakan hepatosit (nekrosis dan degenerasi hidropik). **Hasil:** *Andrographolide* menunjukkan efek hepatoprotektor terhadap kerusakan hepatosit setelah diinduksi CCl_4 . Nilai kerusakan pada kelompok normal 16,84; kontrol negatif 34,36; kontrol positif 11,48; dosis 1 24,92; dosis 2 19,96; dan dosis 3 19,52. Pada uji LSD, kelompok dosis *andrographolide* 50 mg/kgBB dan *andrographolide* 100 mg/kgBB memiliki perbedaan bermakna kerusakan hepatosit dibandingkan kelompok normal. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok dosis *andrographolide* 200 mg/kgBB dengan kelompok normal (ANOVA, $p > 0,05$). **Simpulan:** Efek hepatoprotektor terbaik di antara dosis *andrographolide* pada penelitian ini adalah 200 mg/kgBB, karena derajat kerusakannya mirip dengan pada kelompok normal.

Kata kunci: *Andrographolide*, hepatoprotektor, hepatosit.

ABSTRACT

Introduction: *Andrographolide* is a group of diterpene lactone isolates from the *Andrographis paniculata* plant with hepatoprotective properties. *Andrographolide* gives a hydrogen ion to pair with a free electron from a free radical to form a stable chemical compound and thus decrease liver damage. **Methods:** This experimental research used a post-test only with a control group design. The samples were mouse's liver (*Rattus norvegicus*). Twenty-four mice (*Rattus norvegicus*) were divided into 6 groups: a normal group, a curcumin-treated group as a positive control, a carbon tetrachloride-only group as a negative control, and the treatment group with the dose an *andrographolide* 50 mg/kgBW group, an *andrographolide* 100 mg/kgBW group, and an *andrographolide* 200 mg/kgBW group with 4 mice in each group. Mice were induced with carbon tetrachloride on the first day, then treated with curcumin and *andrographolide* for 7 days. Liver organs were dissected on day 9 to prepare a specimen for assessing hepatocyte damage (necrosis and hydropic degeneration). **Results:** *Andrographolide* showed a hepatoprotective effect on hepatocyte damage after induction by CCl_4 . The injury score in the normal group is 16.84; the negative control group is 34.36; the positive control group is 11.48; the dose 1 group is 24.92; the dose 2 group is 19.96; and dose 3 is 19.52. In the LSD test, the 50 mg/kgBW and 100 mg/kgBW *andrographolide* dose groups showed significant differences in hepatocyte damage compared to the normal group. There was no significant difference in liver histopathologic injury score between the normal group and the *andrographolide* 200 mg/kgBW group (ANOVA, $p > 0.05$). **Conclusion:** The best hepatoprotective effect was provided by *andrographolide* 200 mg/kgBW because the degree of damage is similar to that in the normal group. **Vincent Sanjaya, Andriani, Muhammad In'am Ilmiawan. Effect of Andrographolide on Histopathology of White Rat Liver Cells (*Rattus norvegicus*) Induced by Carbon Tetrachloride (CCl_4).**

Keywords: *Andrographolide*, hepatoprotection, hepatocyte.



Mermin Dunia Kedokteran is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

Alamat Korespondensi email: sanjayavincent56@gmail.com



PENDAHULUAN

Dengan massa 1,4 kg, hepar merupakan organ metabolisme tubuh terbesar dengan fungsi yang beragam, kerusakannya menyebabkan gagal hati. Penyebab kerusakan hati pada manusia, antara lain virus, bakteri, jamur, polusi, obat-obatan, dan kebiasaan gaya hidup.¹ Pengobatan penyakit hepar dengan tanaman herbal dengan efek melindungi hepar menarik perhatian para peneliti.^{2,3}

Karbon tetraklorida adalah senyawa penginduksi yang biasa digunakan dalam penelitian hepar. Hasil metabolisme karbon tetraklorida di hepar menghasilkan radikal bebas yang dapat mengganggu homeostasis ion dalam sel, yang jika berkepanjangan dapat menyebabkan degenerasi hidropik karena penumpukan cairan di dalam intrasel dan nekrosis.⁴⁻⁶

Andrographolide merupakan senyawa aktif tanaman *Andrographis paniculata*, yang memiliki efek mengurangi kerusakan sel hepar yang diinduksi dosis toksik *paracetamol* ditandai dengan penurunan indikator kimia kerusakan hepar, juga memiliki efek protektor atas hepatosit yang diinduksi karbon tetraklorida.⁷ Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui dosis hepatoproteksi efektif senyawa *andrographolide*; efek hepatoprotektor *andrographolide* akan dibandingkan dengan senyawa yang telah diakui memiliki efek hepatoprotektor, yaitu kurkumin dan dosis efektif hepatoprotektor kurkumin sudah diketahui.^{8,9}

METODE

Penelitian eksperimen menggunakan desain *post-test only with control group*. Sampel penelitian menggunakan organ hepar tikus yang sudah diberi perlakuan berbeda sesuai kelompok. Sebanyak 24 ekor tikus dibagi rata ke dalam 6 kelompok, yaitu kelompok normal, kelompok kurkumin sebagai kontrol positif, kelompok karbon tetraklorida sebagai kontrol negatif, kelompok dosis *andrographolide* 1 (50 mg/kgBB), kelompok dosis *andrographolide* 2 (100 mg/kgBB), dan kelompok dosis *andrographolide* 3 (200 mg/kgBB).

Penelitian dimulai dari fase adaptasi hewan coba selama 7 hari, kemudian induksi karbon tetraklorida 1 hari setelahnya, setelah itu selama 8 hari berikutnya diberi kurkumin

atau *andrographolide* sesuai dosis masing-masing. Setelah hari ke-8, semua hewan coba dieuthanasia dengan cara dislokasi servikal kemudian dinekropsi untuk mengambil jaringan heparnya. Jaringan disimpan dalam pot berisi formalin dan ditutup rapat.

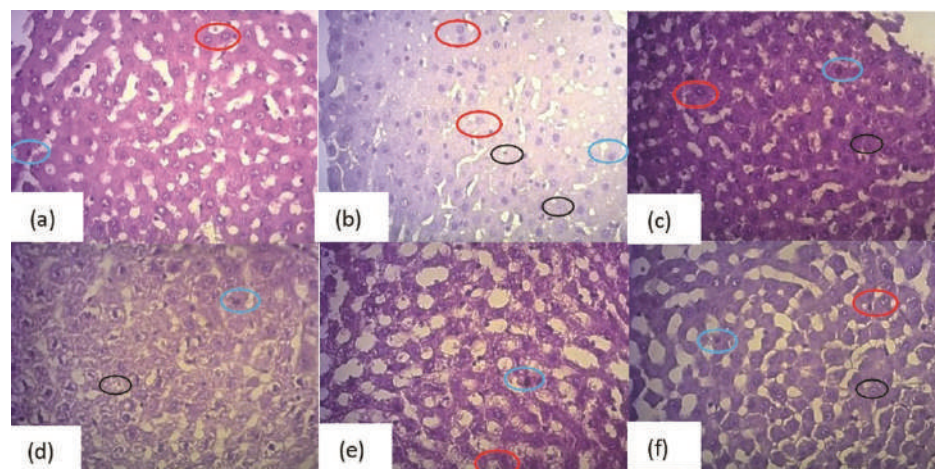
Setelah itu, jaringan hepar diproses untuk dijadikan preparat pemeriksaan mikroskopik. Pertama organ dicuci dengan garam fisiologis, selanjutnya organ dimasukkan ke dalam larutan formalin *buffer* 10% untuk proses fiksasi selama 18 jam. Kemudian jaringan dimasukkan ke dalam larutan akuades selama 1 jam untuk menghilangkan larutan fiksasi. Selanjutnya potongan organ dimasukkan ke dalam alkohol untuk menjalani proses dehidrasi menggunakan alkohol konsentrasi bertingkat, yaitu alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol 96% I, alkohol 96% II, dan alkohol 96% III. Kemudian organ dimasukkan ke dalam larutan *xylol* I, *xylol* II, dan *xylol* III agar jaringan menjadi lebih transparan dan jernih serta menggantikan larutan alkohol dalam jaringan. Selanjutnya organ dimasukkan ke dalam parafin cair selama 2 jam dengan suhu 58°-60°C, kemudian dimasukkan lagi ke dalam parafin cair yang baru dengan suhu yang sama. Organ dalam parafin kemudian dipotong setebal 2 mikron dengan mikrotom. Potongan yang dihasilkan diangkat dengan kaca objek yang telah diberi gliserin sebagai perekat dan dikeringkan di *hotplate*; selanjutnya dimasukkan ke dalam *water bath*. Kemudian organ pada kaca objek diwarnai

dengan *hematoxylin-eosin* (HE) dengan cara kaca objek dimasukkan ke dalam larutan secara berurutan: 1) *Xylol* I; 2) *Xylol* II; 3) *Xylol* III; 4) Alkohol 96% I; 5) Alkohol 96% II; 6) Alkohol 80%; 7) *Mayer's hematoxyllin*; 8) Air; 9) Eosin 1%; 10) Alkohol 80%; 11) Alkohol 96% I; 12) Alkohol 96% II; 13) *Xylol* I; 14) *Xylol* II; 15) *Xylol* III.

Selanjutnya kaca objek setiap kelompok diamati sebanyak 5 lapang pandang, pada setiap lapang pandang akan digambar garis imajiner membentuk kotak-kotak untuk menghitung skor kerusakan. Setiap kotak dengan gambaran degenerasi hidropik mendapat skor 1 dengan maksimal skor 48. Setiap kotak dengan gambaran nekrosis sel diberi skor 2 dengan maksimal skor 96; kemudian skor nekrosis dijumlahkan dengan jumlah skor degenerasi hidropik. Data dianalisis menggunakan uji *one-way ANOVA* dan uji *post-hoc LSD*.

HASIL

Penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus yang dibagi rata menjadi 6 kelompok, setiap kelompok terdiri dari 4 tikus yang dihitung menggunakan rumus Federer dan 1 tikus sebagai angka *drop out*. Pada penelitian ini tidak didapati tikus yang mati atau *drop out*. Hasil pengamatan histopatologi (**Gambar 1**) kelompok normal menunjukkan kerusakan berupa gambaran degenerasi hidropik pada hepatosit dan nekrosis inti sel hepatosit, namun tidak sebanyak pada kelompok perlakuan karbon tetraklorida sebagai kontrol



Gambar 1. Pengamatan kerusakan hepatosit tikus: (a) Kelompok pakan standar, (b) Kelompok pakan standar + CCl_4 sebagai kontrol negatif, (c) Kelompok pakan standar + CCl_4 + kurkumin 500 mg/kgBB, (d) Kelompok 1 (dosis *andrographolide* 50 mg/kgBB), (e) Kelompok dosis 2 (*andrographolide* 100 mg/kgBB), dan (f) Kelompok 3 (dosis *andrographolide* 200 mg/kgBB). O = sel normal, O = sel degenerasi hidropik, dan O = nekrosis sel. HE, objektif 40x.

HASIL PENELITIAN



negatif, kelompok 1 dosis *andrographolide* 50 mg/kgBB, kelompok 2 dosis *andrographolide* 100 mg/kgBB, dan kelompok 3 dosis *andrographolide* 200 mg/kgBB. Seluruh kelompok perlakuan *andrographolide* 1, 2, dan 3 mengalami kerusakan tidak seluas kelompok kontrol negatif.

Uji statistik menunjukkan data kerusakan hepatosit berdistribusi normal (Shapiro Wilk $p > 0,05$), data memiliki varians yang seragam (uji homogenitas varians $p > 0,05$), Uji *one-way* ANOVA ($p < 0,05$) mendapatkan perbedaan bermakna rata-rata skor kerusakan sel hepatosit beberapa kelompok, selanjutnya dilakukan uji *post-hoc* menggunakan analisis Fisher's LSD (*least significant difference*) untuk mengidentifikasi perbedaan bermakna antara 2 kelompok. Hasil rata-rata nilai kerusakan hepatosit tikus untuk masing-masing kelompok ditampilkan dalam bentuk grafik batang (Gambar 2).

Kelompok pakan standar + CCl_4 sebagai kontrol negatif memiliki skor kerusakan hepatosit $34,35 \pm 2,26$, tertinggi dibandingkan kelompok lain. Ada perbedaan signifikan rata-rata skor kerusakan hepatosit pada kelompok pakan standar + CCl_4 jika dibandingkan dengan seluruh kelompok lainnya (*post-hoc*

test LSD perbandingan dengan kelompok kontrol negatif, $p < 0,05$).

Rerata kerusakan hepatosit kelompok kontrol positif lebih kecil dibandingkan dengan kelompok normal, kontrol (-), *andrographolide* dosis 1, *andrographolide* dosis 2, dan *andrographolide* dosis 3. Terdapat perbedaan signifikan antara kelompok pakan standar + kurkumin sebagai kontrol positif dengan kelompok pakan standar, kontrol negatif, dosis 1, dosis 2, dan dosis 3 (*post-hoc test* LSD, $p < 0,05$). Kelompok dosis 1, dosis 2, dan dosis 3 menunjukkan skor rata-rata kerusakan sel hepatosit yang lebih sedikit dibandingkan kelompok kontrol negatif, dan kelompok dosis 3 tidak berbeda signifikan dengan kelompok normal (*post-hoc test* LSD, $p = 0,052$).

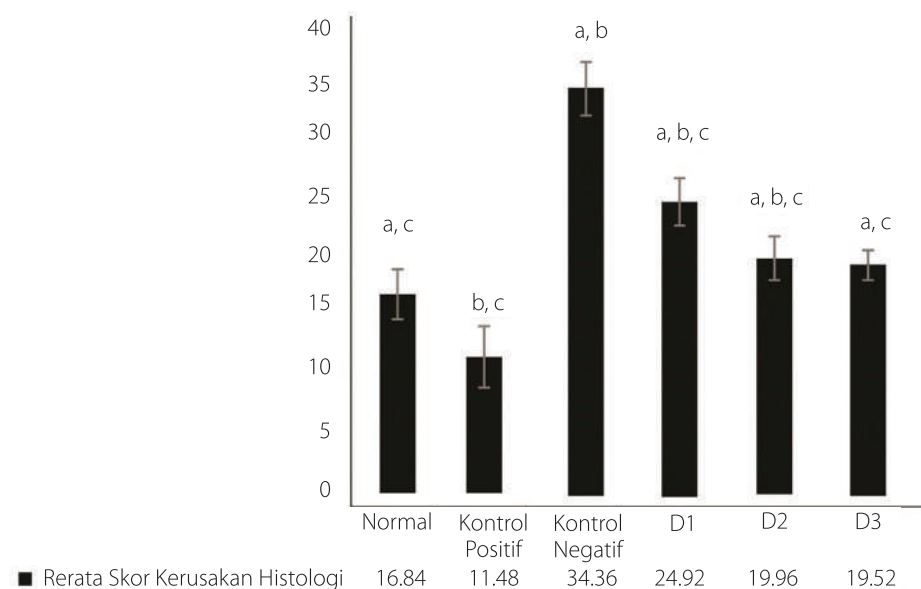
PEMBAHASAN

Kelompok kontrol negatif ($34,36 \pm 2,26$) memiliki skor kerusakan hepatosit signifikan lebih besar daripada kelompok normal ($16,84 \pm 2,13$). Hasil ini serupa dengan laporan Panjaitan, *et al.*, yang mendapatkan perbedaan signifikan hasil kelompok pakan standar + CCl_4 dibandingkan dengan kelompok pakan standar.⁵ Pemberian karbon tetraklorida (CCl_4) secara intraperitoneal bertujuan untuk memicu kerusakan hepar dengan stres

oksidatif yang memicu proses peroksidasi lipid. Proses peroksidasi lipid dapat merusak hepatosit secara reversibel (degenerasi hidropik) ataupun ireversibel (nekrosis sel). Peningkatan kerusakan hepatosit (degenerasi hidropik dan/atau nekrosis sel) pada masing-masing kelompok yang mendapat induksi CCl_4 menunjukkan CCl_4 bersifat hepatotoksik. Tikus diinduksi dengan injeksi CCl_4 intraperitoneal tunggal dengan dosis toksik 1 mL/kgBB berat badan.¹⁰

Kelompok yang memiliki rerata kerusakan hepatosit paling rendah adalah kelompok kontrol positif ($11,48 \pm 2,63$). Rerata kerusakan hepatosit kelompok pakan standar + CCl_4 + kurkumin sebagai kontrol positif dan kelompok pakan standar + CCl_4 sebagai kontrol negatif berbeda signifikan, menunjukkan bahwa kurkumin memiliki efek hepatoprotektor. Kurkumin memiliki efek antioksidan, antiinflamasi, dan antiproliferasi. Kurkumin dapat meningkatkan aktivitas antioksidan alami dan mengurangi radikal bebas.¹¹ Kurkumin sebagai antioksidan dapat memutus rantai antar ion superoksida (O_2^-), sehingga mencegah proses peroksidasi lipid yang berpotensi merusak permeabilitas membran retikulum endoplasma, sehingga keseimbangan ion Ca^{2+} tidak terganggu dan mencegah kerusakan reversibel ataupun kerusakan ireversibel pada hepar.¹²

Kelompok dosis *andrographolide* 1, dosis *andrographolide* 2, dan dosis *andrographolide* 3 memiliki rerata skor kerusakan hepatosit yang signifikan lebih kecil dibandingkan kelompok pakan standar + CCl_4 sebagai kontrol negatif. Rerata kerusakan hepatosit pada kelompok dosis meningkat berurutan, kelompok dosis 3 - $19,52 \pm 1,24$, kelompok dosis 2 - $19,96 \pm 1,88$, dan kelompok dosis 1 - $24,92 \pm 2,02$. Hal ini serupa dengan hasil penelitian Dewabratha, ekstrak etanol 200 mg/kgBB mampu menurunkan kerusakan hepatosit yang diinduksi karbon tetraklorida (CCl_4).⁸ Pada penelitian ini kerusakan sel hepatosit pada kelompok dosis 3 (200 mg/kgBB) mendekati rerata skor kerusakan hepatosit pada kelompok pakan standar dan pakan standar + CCl_4 sebagai kontrol positif; hasil di kelompok *andrographolide* dosis 3 (200 mg/kgBB) tidak berbeda bermakna dengan di kelompok normal. Dapat disimpulkan efek hepatoprotektor terbaik adalah pada *andrographolide* dosis 200 mg/kgBB.



Gambar 2. Normal= pakan standar, kontrol positif= kurkumin dosis 500 mg/kgBB, kontrol negatif= CCl_4 , D1: *andrographolide* dosis 50 mg/kgBB, D2: *andrographolide* dosis 100 mg/kgBB, D3: *andrographolide* dosis 200 mg/kgBB. (*one way* ANOVA, $p = 0,000$); a = *post-hoc test* LSD ($p < 0,05$ perbandingan dengan kelompok pakan standar + CCl_4 + kurkumin); b = *post-hoc test* LSD ($p < 0,05$ perbandingan dengan kelompok pakan standar); c = *post-hoc test* LSD ($p < 0,05$ perbandingan dengan kelompok pakan standar + CCl_4).

HASIL PENELITIAN



SIMPULAN

Andrographolide memiliki efek hepatoprotektor pada dosis 1 (50 mg/kgBB), dosis 2 (100 mg/kgbb.), dan dosis 3 (200 mg/kgBB). Rerata skor kerusakan sel hepatosit tikus putih secara

berurutan menurun: kelompok kontrol negatif ($34,36 \pm 2,26$), kelompok dosis *andrographolide* 50 mg/kgBB ($24,92 \pm 2,02$), kelompok dosis *andrographolide* 100 mg/kgBB ($19,96 \pm 1,88$), kelompok dosis *andrographolide* 200 mg/kgBB

($19,52 \pm 1,24$), kelompok normal ($16,84 \pm 2,13$), dan kelompok kurkumin dosis 500 mg/kgBB ($11,48 \pm 2,63$). Efek paling baik pada penelitian ini adalah pada dosis *andrographolide* 200 mg/kgBB.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Robbins SL, editors. Robbins basic pathology. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2013.
2. Prabowo Y. Efek hepatoprotektor ekstrak *Andrographis paniculata* nees (sambiloto) terhadap aktivitas alanin amino transferase dalam plasma *Rattus norvegicus* jantan galur wistar yang diinduksi parasetamol [Skripsi]. Pontianak: Tanjungpura; 2014.
3. Ye JF, Zhu H, Zhou ZF, Xiong RB, Wang XW, Su LX, et al. Protective mechanism of andrographolide against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(11):1666–70. doi: 10.1248/bpb.34.1666.
4. Panjaitan RGP, Handharyani E, Zakiah Z, Manalu W. Pengaruh pemberian karbon tetraklorida terhadap fungsi hati dan ginjal tikus. *Makara Kesehatan* 2007;11(1):6.
5. Krisnansari D, Sulisty H, Ati VRB. Efek propolis terhadap fungsi dan perlemakan hati tikus puti (*Rattus norvegicus*) model hiperkolesterolemia. *Penelit Gizi Makan*. 2014;37(1):77–85. <https://doi.org/10.22435/pgm.v37i1.4011.77-85>.
6. Sumadiono BG. Stres dan sistem imun tubuh: suatu pendekatan psikoneuroimunologi. *Cermin Dunia Kedokt*. 2010;154: 13–16.
7. Dewabratha B, Mahendra AN, Dewi NWS, Sumadi IWJ. Pengaruh ekstrak etanol daun sambiloto terhadap periportal necrosis dan bridging necrosis hepar pada mencit jantan yang diinduksi karbon tetraklorida. 2012;1–7.
8. Samuhasaneto S, Tong ND. Curcumin decreased oxidative stres, inhibited NF- κ B activation, and improved liver pathology in ethanol-induced liver injury in rats. *J Biomed Biotechnol*. 2009;1:1-8. doi: 10.1155/2009/981963.
9. Buonomo AR, Scotto R, Nappa S, Arcopinto M, Salzano A, Marra AM, et al. The role of curcumin in liver diseases. *Arch Med Sci*. 2019;15(6):1608-20. doi: 10.5114/aoms.2018.73596.
10. Chen HW, Huang CS, Li CC, Lin AH, Huang YJ, Wang TS, et al. Bioavailability of andrographolide and protection against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;280(1):1–9. doi: 10.1016/j.taap.2014.07.024.
11. Khedr NF, Khedr EG. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcumin on CCl₄ induced liver fibrosis in rats. *Am J Biomed Sci*. 2014;6(3):191–200. doi: 10.5099/aj140300191.
12. Rivera-Espinoza Y, Muriel P. Pharmacological actions of curcumin in liver diseases or damage. *Liver Int*. 2009;29(10):1457–66. doi: 10.1111/j.1478-3231.2009.02086.x.