

PENGARUH EKSTRAK DAUN SUKUN (*ARTOCARPUS ALTILIS*) TERHADAP GAMBARAN FIBROSIS HEPAR TIKUS WISTAR YANG DIINDUKSI DIETILNITROSAMIN

Nursa Audina Frizani¹, Ika Pawitra Miranti²

¹ Mahasiswa Program S-1 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

² Staf Pengajar Ilmu Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro
JL. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang-Semarang 50275, Telp. 02476928010

ABSTRAK

Latar belakang: Fibrosis hepar merupakan salah satu bentuk degenerasi hepar, dan apabila dibiarkan dapat berkembang menjadi sirosis. Salah satu stimulus yang dapat menyebabkan fibrosis adalah dietilnitrosamin, yang dimetabolisme menjadi radikal bebas seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS), yang dapat dicegah dengan kandungan antioksidan. Daun sukun (*Artocarpus altilis*) memiliki kandungan antioksidan yang diharapkan dapat menghambat proses fibrogenesis.

Tujuan: Mengetahui pengaruh ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) terhadap gambaran fibrosis hepar tikus wistar setelah diinduksi dietilnitrosamin.

Metode: Penelitian ini menggunakan *post-test only control group design*. Sampel terdiri dari 18 ekor tikus wistar jantan yang dibagi menjadi 3 kelompok. Kelompok K(-) tanpa perlakuan, kelompok K(+) diinjeksi dietilnitrosamin 50mg/kgBB satu kali seminggu, kelompok perlakuan diinjeksi dietilnitrosamin 50mg/kgBB satu kali seminggu dan diberi ekstrak daun sukun 200mg/kgBB setiap hari. Penelitian dilaksanakan selama 8 minggu dan tikus diterminasi serta diambil heparnya untuk dilakukan pemeriksaan secara mikroskopis.

Hasil: Rerata skor fibrosis hepar kelompok K(-) 0,00; kelompok K(+) 1,60; kelompok perlakuan 0,60. Uji Kruskal-Wallis didapatkan $p < 0,05$ yang berarti paling tidak terdapat perbedaan skor fibrosis hepar antar dua kelompok. Uji post-hoc Mann-Whitney kelompok K(-) dan kelompok K(+) didapatkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$); kelompok K(-) dan kelompok perlakuan dengan $p = 0,05$ yang berarti ditemukan perbedaan yang tidak bermakna antar dua kelompok; kelompok K(+) dan kelompok perlakuan dengan $p = 0,059$ yang berarti ditemukan perbedaan yang tidak bermakna antar dua kelompok.

Simpulan: Tikus yang diinduksi dietilnitrosamin akan mengalami fibrosis pada hepar dengan derajat yang bervariasi, dan kelompok yang diberi ekstrak daun sukun memiliki derajat fibrosis hepar yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok yang diinduksi dietilnitrosamin.

Kata kunci: fibrosis, dietilnitrosamin, daun sukun

ABSTRACT

THE EFFECT OF BREADFRUIT LEAVES (*ARTOCARPUS ALTILIS*) ON DIETHYLNITROSAMINE-INDUCED LIVER FIBROSIS IN WISTAR RATS

Background: Fibrosis is one of the liver degenerations which, if left untreated, could become cirrhosis. Fibrosis could be triggered by diethylnitrosamine, which metabolized into free radicals, e.g. reactive oxygen species, which could be prevented by antioxidant. Breadfruit leaves (*Artocarpus altilis*) contains antioxidant which could be used to prevent fibrogenesis process.

Aim: To analyze the effect of breadfruit leaves (*Artocarpus altilis*) in diethylnitrosamine-induced liver fibrosis in Wistar rats.

Method: This research design is post-test only control group design. 18 male Wistar rats were divided into 3 groups, K(-) group was given no treatment, K(+) was given weekly diethylnitrosamine injection 50mg/kgBW, treatment group was given weekly diethylnitrosamine injection 50mg/kgBW and breadfruit leaves extract 200mg/kgBW orally everyday for 8 weeks. At the end of experiment, the rats were terminated and the liver was taken for histological examination.

Result: Fibrosis score mean of K(-) 0,00; K(+) 1,60; treatment group 0,60. Kruskal-Wallis test showed significant difference with p value <0,05. Mann-Whitney test for K(-) and K(+) showed a significant difference (p<0,05); K(-) and treatment group yielded p value of 0,050 which means there were no significant difference between the groups; K(+) and treatment group yield p value of 0,059 which means there were no significant difference between two groups.

Conclusion: Rats induced with diethylnitrosamine would undergo liver fibrosis with different severity, and group that consumed breadfruit leaves extract had a lower fibrosis score than the group that solely induced with diethylnitrosamine.

Keywords: fibrosis, diethylnitrosamine, breadfruit leaves

PENDAHULUAN

Fibrosis hepar merupakan salah satu bentuk degenerasi hepar, dan apabila dibiarkan dapat berkembang menjadi sirosis. Angka kematian akibat sirosis sebesar 1,5 juta tiap tahunnya. Fibrosis sendiri terjadi karena adanya stimulus yang menyebabkan terjadinya deposisi ekstraselular matriks, seperti kolagen yang disertai dengan remodelling yang tidak seimbang. Salah satu stimulus yang dapat menyebabkan fibrosis adalah paparan zat kimia kronis, seperti dietilnitrosamin.^{1,2}

Senyawa dietilnitrosamin termasuk dalam golongan nitrosamin. Nitrosamin dapat masuk ke tubuh melalui makanan. Diperkirakan rata-rata manusia

mengonsumsi 0.1µg nitrosamin melalui makanan setiap harinya.³

Nitrosamin dapat ditemukan di berbagai produk seperti minuman beralkohol, daging olahan, rokok, dan produk kosmetik. Selain itu, pada air tanah juga ditemukan kandungan nitrat yang tinggi.⁴

Nitrosamin merupakan zat yang hepatotoksik. Pada dosis akut, nitrosamin menyebabkan nekrosis dan perdarahan pada hepar, sedangkan pada paparan kronis, nitrosamin menyebabkan kanker pada hepar dan ginjal.³

Senyawa dietilnitrosamin adalah zat karsinogenik yang dapat menyebabkan kerusakan hepatosit pada hewan coba, salah satunya fibrosis, dapat menyebabkan terbentuknya lesi neoplastik,⁵ dan dapat

dimetabolisme menjadi radikal bebas, salah satunya adalah Reactive Oxygen Species (ROS) dimana pada jumlah yang berlebih dapat menyebabkan timbulnya stres oksidatif dan kerusakan jaringan.⁶

Hepar memiliki mekanisme untuk menonaktifkan ROS, namun apabila jumlah ROS berlebihan, maka terjadilah stres oksidatif yang akan merusak biomolekul penting seperti lipid, protein, dan DNA.⁵ Akibatnya, fungsi hepar akan terganggu sehingga membutuhkan antioksidan eksogen.⁷

Antioksidan eksogen dapat ditemukan dalam bentuk sintetis atau berasal dari bahan alami. Antioksidan sintetis yang dapat ditemukan di suplemen makanan memiliki umur simpan yang pendek.⁸ Maka dari itu dibutuhkan antioksidan alami yang bahannya dapat dengan mudah ditemukan, salah satunya adalah daun sukun.

Sukun (*Artocarpus altilis*) adalah tanaman yang termasuk dalam family Moraceae. Buah sukun banyak dimanfaatkan sebagai makanan. Kandungan dari buah sukun yaitu protein, vitamin, kalsium, magnesium, kalium, tembaga, zat besi, thiamin, dan senyawa fenolik. Buah sukun dapat digunakan sebagai sumber makanan alternatif,

sementara itu, daun sukun juga banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional untuk penyakit hipertensi dan jantung.⁹

Hasil penelitian Fakhrudin, et al. (2015) menyatakan daun sukun memiliki banyak kandungan antioksidan seperti flavonoid, xanthone, triterpenoid, dan stilbene. Dari beberapa antioksidan diatas, antioksidan yang paling banyak diteliti adalah flavonoid yang mempunyai aktivitas anti inflamasi.¹⁰ Selain aktivitas anti inflamasi, efek lain yang ditemukan yaitu efek antikanker, antiplatelet, dan antisklerotik.¹¹

Penelitian mengenai manfaat daun sukun sudah banyak dilakukan, namun penelitian mengenai manfaat daun sukun masih jarang dilakukan. Banyaknya makanan yang mengandung dietilnitrosamin yang merupakan salah satu hepatokarsinogen, ditambah potensi daun sukun sebagai sumber antioksidan alami yang dapat mencegah efek buruk tersebut, sehingga penelitian tentang pengaruh ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) terhadap gambaran fibrosis hepar tikus wistar yang diinduksi oleh dietilnitrosamin perlu dilakukan.

METODE

Penelitian ini berjenis eksperimental dengan rancangan *post-test only control group design*, dilaksanakan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, pada bulan April hingga Juni 2017. Sampel merupakan tikus wistar jantan, dengan kriteria inklusi yaitu tikus berjenis kelamin jantan, usia 2-3 bulan, berat 150-200 gram, sehat dan aktif. Kriteria ekslusinya adalah tikus mati selama masa penelitian. Sampel diambil secara acak dan dibagi menjadi 3 kelompok. Kelompok kontrol negatif hanya diberi pakan dan minum ad libitum selama 8 minggu. Kelompok kontrol positif diberi pakan dan minum ad libitum serta diinjeksi dietilnitrosamin intraperitoneal 1x seminggu dengan dosis 50mg/kgbb, kelompok perlakuan diberi pakan ad libitum, injeksi dietilnitrosamin intraperitoneal 1x seminggu dengan dosis 50mg/kgbb, dan ekstrak daun sukun 200mg/kgbb peroral setiap hari selama 8 minggu. Tikus diterminasi dan organ hepar diambil untuk dibuat preparat setelah minggu ke-8.

Analisis data menggunakan uji Saphiro-Wilk, dimana hasilnya data terdistribusi tidak normal. Analisis selanjutnya digunakan uji Kruskal-Wallis

dilanjutkan *posthoc* uji Mann-Whitney, dengan nilai derajat kemaknaan $p < 0,05$. Etika penelitian sudah didapatkan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP dr. Kariadi.

HASIL PENELITIAN

Tabel 1. Skor Fibrosis Hepar

Kelompok	Rerata±S	Media	Minimu	Maksimu
	D	n	m	m
Kontrol Negatif	0,00±0,0	0	0	0
Kontrol Positif	1,60±0,8	1	1	3
Perlakuan	0,60±0,5	1	0	1
n	5			

Berdasarkan tabel 1 dapat dilihat bahwa kelompok kontrol negatif memiliki rerata skor fibrosis hepar yang paling rendah yaitu nol (0), sedangkan rerata skor fibrosis hepar tertinggi dimiliki oleh kelompok kontrol positif (1,60). Nilai median skor fibrosis hepar terendah terdapat pada kelompok kontrol negatif (0), dan nilai median pada kelompok kontrol positif dan perlakuan adalah sama, yaitu satu (1).

Tabel 2. Distribusi frekuensi fibrosis hepar tiap kelompok

Derajat	Kelompok		
	Kontrol Negatif	Kontrol Positif	Perlakuan
Tidak ada fibrosis	5 (100%)	0	2 (40%)
Fibrosis minimal	0	3 (60%)	3 (60%)
Fibrosis ringan	0	1 (20%)	0
Fibrosis sedang	0	1 (20%)	0
Sirosis, <i>mild definite</i>	0	0	0
Total	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)

Pada uji normalitas didapatkan $p < 0,05$, yang berarti data terdistribusi tidak normal. Oleh karena data terdistribusi tidak normal maka dilanjutkan dengan uji Kruskal-Wallis pada seluruh kelompok penelitian. Hasil uji Kruskal-Wallis didapatkan nilai $p = 0,007$ ($p < 0,050$), yang berarti paling tidak terdapat perbedaan skor fibrosis hepar antar dua kelompok. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda, maka dilakukan Post Hoc dari uji Kruskal-Wallis, yaitu uji Mann-Whitney.

Tabel 3 Hasil Analisis Mann-Whitney

Kelompok	K(-)	K(+)	Perlakuan
K(-)	-	0,005*	0,050
K(+)		-	0,059
Perlakuan			-

Berdasarkan hasil uji Mann-Whitney kelompok kontrol negatif (K(-)) dengan kelompok kontrol positif (K(+)) didapatkan nilai $p = 0,005$ ($p < 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara kelompok K(-) dan kelompok K(+). Hasil uji kelompok K(-) dan kelompok perlakuan diperoleh nilai $p = 0,050$, yang dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang tidak bermakna antara kelompok K(-) dan kelompok perlakuan. Hasil uji kelompok K(+) dengan kelompok perlakuan diperoleh nilai $p = 0,059$, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang tidak bermakna antara kelompok K(+) dan kelompok perlakuan.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan dietilnitrosamin menyebabkan fibrosis dengan derajat yang bervariasi pada hepatosit, dari fibrosis minimal, fibrosis ringan, fibrosis sedang, hingga sirosis minimal. Derajat fibrosis

yang paling ringan ditunjukkan dengan tidak adanya septa atau adanya septa tipis, mungkin didapatkan sedikit ekspansi portal atau fibrosis sinusoidal ringan. Fibrosis ringan ditunjukkan dengan terbentuknya beberapa septa tipis, serta ditemukannya ekspansi portal dan fibrosis sinusoidal ringan. Fibrosis sedang ditandai dengan adanya septa tipis moderat hingga sirosis inkomplit. Derajat berikutnya yaitu sirosis, *mild definite* dengan gambaran septa yang tampak jelas dengan kontur melingkar atau nodul yang tampak jelas. Ditemukan sebagian besar septa berukuran tipis dan diperbolehkan terdapat satu septa yang berukuran luas.

Hasil pembacaan mikroskopis menunjukkan pada kelompok kontrol positif ditemukan derajat fibrosis minimal hingga fibrosis sedang, tetapi juga ditemukan sirosis *mild definite* pada salah satu lapangan pandang. Hasil uji analitik menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif. Hal ini sesuai dengan penelitian Mormone, et. al., (2011) yang menyatakan bahwa proses fibrogenesis hepar dapat dipicu oleh paparan zat karsinogenik secara kronik, dimana dalam penelitian ini zat

karsinogenik yang digunakan adalah dietilnitrosamin dengan dosis 50 mg/kgBB.

Penelitian Sun Q. (2015) menyatakan saat terpapar zat karsinogenik, maka *Quiescent Hepatic Stellate Cell* akan kehilangan simpanan vitamin A mereka, meningkatkan ekspresi dari α -smooth muscle actin (α -SMA), bentuk sel berubah, menjadi motil dan kontraktil, serta tampak banyak retikulum endoplasma.^{2, 13}

Perubahan-perubahan pada hepar fibrotik terjadi pada komposisi dari matriks ekstraselular, yaitu dapat ditemukannya peningkatan jumlah kolagen fibrilar dan proteoglikan hingga enam kali dari jumlah normal. Jaringan yang mengalami fibrosis hingga terjadi sirosis tersusun dari kolagen fibrilar tipe I dan III, proteoglikan, fibronektin, dan asam hialuronat. Perubahan komposisi jaringan ini akan menyebabkan perubahan struktur hepar, terutama di matriks ekstraselular spasiuum Disse. Banyaknya jaringan yang diganti oleh kolagen dan fibronektin menyebabkan hilangnya endotel fenestrata, sehingga terjadi gangguan perpindahan *solute* antar sel, yang akan menurunkan fungsi hepatosit dan pada akhirnya akan menyebabkan kerusakan pada jaringan.¹

Salah satu lapangan pandang kelompok kontrol positif ditemukan

adanya sirosis ringan. Sirosis merupakan akhir dari proses fibrogenesis yang disebabkan karena penyakit hepar kronis, dan komplikasi yang disebabkan oleh sirosis masih merupakan penyebab mortalitas terbanyak pada pasien dengan penyakit hati kronis. Menurut penelitian Bona S. (2015) , selain ditemukannya ekspresi α -SMA yang meningkat, juga dapat ditemukan menurunnya ekspresi heat-shock protein 70 (HSP70). HSP70 memiliki sifat protektif terhadap hepatosit, dan berperan dalam proses *folding*, transpor, dan degradasi dari protein. Selain peran tersebut, ternyata HSP70 juga memiliki kemampuan untuk menghambat apoptosis. Penurunan ekspresi HSP70 menyebabkan sel mudah terpapar stress, yang dapat menyebabkan terjadinya *misfolding* pada protein, dan akhirnya terjadi kerusakan pada sel maupun kematian sel.¹³

Hasil pembacaan mikroskopis pada jaringan hepar kelompok perlakuan menunjukkan adanya penurunan yang tidak bermakna pada skor fibrosis hepar dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Pada kelompok perlakuan, dapat ditemukan hepatosit yang normal hingga hepatosit yang mengalami fibrosis minimal. Penurunan derajat fibrosis ini

dikarenakan adanya efek antioksidan yang terdapat pada ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*). Pada penelitian ini, penurunan derajat fibrosis yang tidak bermakna dapat disebabkan karena dosis ekstrak yang kurang dan juga karena hanya satu dosis yang digunakan, sehingga belum diketahui dosis ekstrak yang dapat memberikan hasil maksimal.

Penelitian oleh Suryanto (2008) menyatakan bahwa antioksidan yang terdapat pada ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis*) diantaranya yaitu flavonoid, saponin, alkaloid, dan polifenol. Antioksidan ini bekerja dengan cara menghambat pembentukan radikal bebas seperti ROS yang dapat menyebabkan fibrosis hepar. Cara kerja dari flavonoid yaitu dengan memindahkan elektron dari kelompok hidroksi bebas, yang akan membentuk senyawa yang tidak reaktif seperti *flavonoid phenoxy radical*.¹⁴

Ekstrak daun sukun juga ditemukan dapat mencegah proses pembentukan lipid peroksidase, yang dapat merusak membran sel yang mengandung *polyunsaturated fatty acid*. Ekstrak daun sukun juga memiliki aktivitas penangkap radikal OH yang memiliki efek yang berbahaya bagi sel, yang memiliki efek karsinogenesis, mutagenesis, dan sitoksisitas.³

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Simpulan pada penelitian ini adalah tikus yang diinduksi dietilnitrosamin akan mengalami fibrosis pada hepar, kelompok yang diberi ekstrak daun sukun memiliki derajat fibrosis hepar yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok yang diinduksi dietilnitrosamin, serta kelompok yang diberi ekstrak daun sukun memiliki perbedaan derajat fibrosis yang lebih rendah dibandingkan kelompok yang diinduksi dietilnitrosamin.

Saran

Penelitian ini disarankan untuk perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek dietilnitrosamin dengan dosis bertingkat, perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek dietilnitrosamin terhadap parameter hepar lainnya seperti HSP70, serta perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan ekstrak daun sukun dengan dosis bertingkat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Poynard T, Lebray P, Ingiliz P, Varaut A, Varsat B, Ngo Y, et al. Prevalence of liver fibrosis and risk factors in a general population using non-invasive biomarkers (FibroTest). *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2009;10(40):40.
2. Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2011;193 (3):225–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2011.07.001>
3. Robles H. Nitrosamine [Internet]. *Encyclopedia of Toxicology*. 2014. 584-585 p. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864543001913>
4. Pradeep K, Mohan CVR, Gobianand K, Karthikeyan S. Effect of *Cassia fistula* Linn. leaf extract on diethylnitrosamine induced hepatic injury in rats. *Chem Biol Interact*. 2007;167(1):12–8.
5. Velu P, Vijayalakshmi A, Iyappan P, Indumathi D. Evaluation of antioxidant and stabilizing lipid peroxidation nature of *Solanum xanthocarpum* leaves in experimentally diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinogenesis. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2016;84:430–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332216308265>
6. Bingül İ, Başaran-Küçükgergin C, Tekkeşin MS, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Effect of blueberry pretreatment on diethylnitrosamine-induced oxidative stress and liver injury in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013;36(2):52938.
7. Hidayah RR, Amarwati S, Istiadi H. Pengaruh Madu Terhadap Gambaran Mikroskopis Hepar Pada Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Monosodium Glutamat. 2015;

8. Akanni OO, Owumi SE, Adaramoye OA. In vitro studies to assess the antioxidative, radical scavenging and arginase inhibitory potentials of extracts from *Artocarpus altilis*, *Ficus exasperate* and *Kigelia africana*. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2014;4(Suppl 1):S492-9. Available from:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169115303166>
9. Suryanto E, Wehantouw F. Aktivitas Penangkap Radikal Bebas Dari Ekstrak Fenolik. *J Bahan Alam Indones*. 2008;6(5):185–8.
10. Lan WC, Tzeng CW, Lin CC, Yen FL, Ko HH. Prenylated flavonoids from *Artocarpus altilis*: Antioxidant activities and inhibitory effects on melanin production. *Phytochemistry* [Internet]. 2013;89:78–88. Available from:<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.01.011>
11. Fakhrudin N, Hastuti S, Andriani A, Widyarini S, Nurrochmad A. Study on the antiinflammatory activity of *Artocarpus altilis* leaves extract in mice. *Int J Pharmacogn Phytochem Res*. 2015;7(6):1080–5.
12. Sun Q, Long Z, Wu H, Liu Y, Wang L, Zhang X, et al. Effect of alcohol on diethylnitrosamine-induced hepatic toxicity: Critical role of ROS, lipid accumulation, and mitochondrial dysfunction. *Exp Toxicol Pathol* [Internet]. 2015;67(10):491–8. Available from:<http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2015.07.003>
13. Bona S, Moreira AJ, Rodrigues GR, Cerski CT, da Silveira TR, Marroni CA, et al. Diethylnitrosamine-induced cirrhosis in Wistar rats: an experimental feasibility study. *Protoplasma*. 2015;252(3):825–33.
14. Sairam S, Urooj A, Sreenivas N. Hepatoprotective effect of *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosb . leaf and bark extracts against CCl 4 induced hepatic damage in albino rats. 2016;5(1):80–4.