

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KOSAMBI
TERHAD APOPTOSIS SEL EPITEL MUKOSA USUS HALUS
YANG DIINDUKSI CCL4 PADA TIKUS MODEL FIBROSIS
HEPAR**

SKRIPSI

Oleh:

MOHAMMAD REZA RIANDINATA
NIM. 16910021



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK
IBRAHIM MALANG**

2020

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KOSAMBI
TERHADAP APOPTOSIS SEL EPITEL MUKOSA USUS
HALUS YANG DIINDUKSI CCL4 PADA TIKUS MODEL
FIBROSIS HEPAR**

SKRIPSI

Diajukan Kepada:

Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam Memperoleh Gelar Sarjana

Kedokteran (S. Ked)

Oleh:

MOHAMMAD REZA RIANDINATA

NIM. 16910021

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KOSAMBI
TERHADAP APOPTOSIS SEL EPITEL MUKOSA USUS
HALUS YANG DIINDUKSI CCL4 PADA TIKUS MODEL
FIBROSIS HEPAR**

SKRIPSI

Oleh:
MOHAMMAD REZA RIANDINATA
NIM. 16910021

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 27 Juni 2020

Pembimbing I,

Pembimbing II,

dr. Tias Pramesti Griana, M. Biomed.

NIP. 19810518 201101 2 011

drg. Anik Listivana, M. Biomed.

NIP. 19800805 200912 2 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



Dr. Nurul Huda Susanti, M. Biomed

NIP. 19831024 201101 2 007

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KOSAMBI
TERHADAP APOPTOSIS SEL EPITEL MUKOSA USUS
HALUS YANG DIINDUKSI CCL4 PADA TIKUS MODEL
FIBROSIS HEPAR**

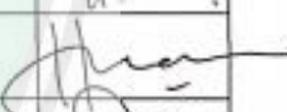
SKRIPSI

Oleh:

Mohammad Reza Riandinata
NIM. 16910021

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan Dinyatakan
Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh Gelar
Sarjana Kedokteran (S.Ked)

Tanggal: 27 Juni 2020

Penguji Utama	<u>dr. Iwal Reza Ahdi, Sp.Pd</u> NIP. 19860720 201801 1 002	
Ketua Penguji	<u>drg. Risma Aprinda Kristanti, M.Si</u> NIP. 19821005 200912 2 001	
Sekretaris Penguji	<u>drg. Anik Listiyana, M. Biomed</u> NIP. 19800805 200912 2 001	
Penguji Integrasi Keislaman	<u>dr. Nurlaili Susanti, M.Biomed</u> NIP. 19831024 201101 2 007	

Mengesahkan,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Nurlaili Susanti, M.Biomed
NIP. 19831024 201101 2 007

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb

Syukur Alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi di Fakultas Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sekaligus menyelesaikan proposal ini dengan baik.

Selanjutnya penulis haturkan ucapan terima kasih seiring do'a dan harapan jazakumullah ahsanal jaza' kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya proposal ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Prof. DR. H. Abd. Haris, M.Ag, selaku rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, yang telah memimpin dan mengayomi seluruh civitas akademika.
2. Prof. Dr. dr. H. Bambang Pardjianto, Sp.B, Sp.BP-RE (K) dan dilanjutkan oleh Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati Prabowowati Wadjib, M. Kes, Sp.Rad (K), di selaku Dekan FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. dr. Nurlaili Susanti, M.Biomed, selaku ketua Program Studi Pendidikan Dokter FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. dr. Tias Pramesti Griana, M. Biomed dan dilanjutkan oleh drg. Anik Listiyana, M.Biomed, selaku dosen pembimbing skripsi yang telah banyak memberikan pengarahan tentang pengarahan konsep pengetahuan dan cara berpikir menulis.
5. drg. Risma Aprinda Kristanti, M.Si, selaku pembimbing skripsi yang telah memberikan pengarahan tentang penulisan skripsi.

6. dr. Iwal Reza Ahdi, M.Biomed, selaku penguji utama skripsi yang selalu mengingatkan kesalahan-kesalahan penulis baik dalam konsep maupun tulisan.
7. Segenap sivitas akademik Program Studi Pendidikan Dokter, terutama seluruh dosen, terima kasih atas segenap ilmu dan bimbingannya.
8. Mama (Prastiwi Dianawati) dan Papa (M. Ridwan Amin), serta semua keluarga yang senantiasa memberikan do'a dan restunya kepada penulis dalam menuntut ilmu.
9. Vicki Andrean dan Aathifah selaku teman satu penelitian yang telah menemani dan membantu selama penelitian.
10. Ferdiana Tsalitsa Rafikasari, selaku teman skripsi yang sering menemani hingga larut malam.
11. Teman-teman NEONATUS 2016, sebagai angkatan pertama yang selalu menemani dalam suka dan duka selama menuntut ilmu di FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
12. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan proposal baik berupa materil maupun moril.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan proposal ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya bagi penulis secara pribadi. *Amin Ya Rabbal Alamin*

Wassalamu'alaikum Wr. Wb

Batu, 27 Juni 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
BAB I.....	1
1.1. Latar belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	6
1.3. Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1. Tujuan umum	6
1.3.2. Tujuan khusus	6
1.4. Manfaat penelitian	7
1.4.1. Manfaat Akademik	7
1.4.2. Manfaat Aplikatif.....	7
BAB II	8
2.1. Usus Halus.....	8
2.1.1. Histologi Lapisan Penyusun Dinding.....	8
2.1.2. Induksi CCL4 Pada Usus Halus.....	12
2.1.3. Histopatologi induksi CCL4 pada usus halus	15
2.2. Fibrosis Hepar	17
2.2.1 Definisi Fibrosis Hepar	17
2.2.2 Patogenesis Fibrosis Hepar.....	17
2.2.2.1. Induksi CCL4 dan Fibrosis Hepar	17
2.2.2.2. Kerusakan Epitel Usus Halus dan Fibrosis Hepar	19
2.3. Kosambi.....	20

2.1.1. Taksonomi Kosambi.....	20
2.1.2. Deskripsi Tanaman Kosambi	21
2.1.3. Kandungan Tanaman Kosambi	23
BAB III.....	27
3.1 Kerangka Konsep	27
3.2 Hipotesis Penelitian.....	29
BAB IV	30
4.1. Desain Penelitian	30
4.2. Waktu dan Tempat Penelitian	30
4.2.1 Waktu Penelitian.....	30
4.2.2 Tempat Penelitian	30
4.3. Populasi Penelitian	31
4.4. Sampel Penelitian	31
4.5. Kriteria Inklusi dan Eksklusi	32
4.5.1. Kriteria Inklusi	32
4.5.2. Kriteria Eksklusi	33
4.6. Alat dan Bahan Penelitian	33
4.6.1. Alat Penelitian	33
4.6.2. Bahan Penelitian	34
4.7. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional	35
4.7.1. Identifikasi Variabel	35
4.7.2. Definisi Operasional.....	35
4.8. Prosedur Penelitian.....	36
4.8.1. Persiapan Hewan Coba	36
4.8.2. Pembuatan Ekstrak Daun Kosambi.....	36
4.8.3. Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Kosambi untuk Sonde	37
4.8.4. Pembuatan Hewan Coba Model Fibrosis Hepar dengan Metode Injeksi CCL4 Secara Intraperitoneal	38
4.8.5. Pengambilan Organ Usus	40
4.8.6. Pewarnaan immunohistokimia.....	40
4.9. Analisis Data	41
4.9.1. Cara Analisis Ekspresi <i>Caspase-3</i>	41
4.9.2. Analisis Data di SPSS	41

BAB V.....	44
5.1. Hasil penelitian.....	44
5.1.1. Berat tikus selama perlakuan.....	44
5.1.2. Gambaran histologi <i>caspase-3</i> pada sel epitel mukosa usus halus tikus model fibrosis hepar	45
5.1.3. Hasil analisis data dengan SPSS	49
5.1.2.1. Analisa deskriptif pengaruh pemberian ekstrak daun kosambi terhadap ekspresi <i>caspase 3</i>	49
5.1.2.2. Uji normalitas pengaruh pemberian ekstrak daun kosambi terhadap ekspresi <i>caspase-3</i>	50
5.1.2.3. Uji homogenitas pengaruh pemberian ekstrak daun kosambi terhadap ekspresi <i>caspase-3</i>	50
5.1.2.4. Uji <i>One-Way</i> ANOVA pengaruh pemberian ekstrak daun kosambi terhadap ekspresi <i>caspase-3</i>	51
5.1.2.5. Uji <i>Post Hoc LSD</i> pengaruh pemberian ekstrak daun kosambi terhadap ekspresi <i>caspase-3</i>	51
5.2. Pembahasan	52
5.2.1. Berat Tikus.....	52
5.2.2. Pengaruh pemberian CCL4 pada usus halus tikus model fibrosis hepar 54	
5.2.3. Pengaruh pemberian ekstrak daun kosambi terhadap ekspresi <i>caspase-3</i> pada sel epitel mukosa usus halus tikus model fibrosis hepar.....	56
5.2.4. Integrasi Islam	62
BAB VI.....	67
6.1. Kesimpulan.....	67
6.2. Saran	67
DAFTAR PUSTAKA	68
LAMPIRAN.....	72

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Gambaran histologi lapisan mukosa usus halus	9
Gambar 2.2 Gambaran sel enterosis (E) dan sel goblet (G)	10
Gambar 2.3 Gambaran histopatologi mukosa usus halus dengan pewarnaan HE	16
Gambar 2.4 Gambaran histopatologi mukosa usus halus dengan pewarnaan imunohistokimia dengan marker <i>caspase-3</i>	17
Gambar 2.5 Pohon Kosambi	22
Gambar 2.6 Daun dan buah kosambi.....	23
Gambar 5.1 Grafik Rata-rata Berat tikus selama perlakuan	45
Gambar 5.2 Gambaran Histopatologi sel mukosa epitel usus halus dengan pewarnaan pewarnaan imunohistokimia <i>caspase-3</i> pada perbesaran 400x	46
Gambar 5.3 Histogram Hasil Uji Post Hoc LSD.....	58

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Rata-rata Jumlah Sel Epitel Yang Mengekspresikan <i>Caspase-3</i> ...	49
Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas <i>Saphiro Wilk</i>	50
Tabel 5.3 Hasil Uji Homogenitas <i>Levene</i>	50
Tabel 5.4 Hasil Uji <i>One Way ANOVA</i>	51
Tabel 5.5 Hasil Uji <i>Post Hoc LSD</i>	51



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>Ethical Clearance</i> dari KEPK FKIK UIN Maliki Malang	72
Lampiran 2. Hasil Determinasi Daun Kosambi (<i>Schleichera Oleosa</i>)	73
Lampiran 3. Hasil Perhitungan Sel Epitel Mukosa Usus Halus Yang Mengekspresikan CCL4	74
Lampiran 4. Hasil Analisis Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kosambi Terhadap Ekspresi <i>Caspase-3</i> Pada Sel Epitel Mukosa Usus Halus.....	75
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian	77



ABSTRAK

Riandinata, Mohammad Reza. 2020. PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN KOSAMBI TERHADAP APOPTOSIS SEL EPITEL MUKOSA USUS HALUS YANG DIINDUKSI CCL4 PADA TIKUS MODEL FIBROSIS HEPAR Skripsi. Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
Pembimbing: (I) drg. Anik Listiyana, M. Biomed (II) drg. Risma Aprinda K., M. Si

Carbon Tetrachloride (CCL4) biasa digunakan sebagai agen penginduksi fibrosis hepar. Pada beberapa penelitian pemberian CCL4 secara intraperitoneum ditemukan dapat menyebabkan apoptosis pada sel epitel mukosa usus halus. Apoptosis sel epitel disebabkan karena induksi dari radikal bebas hasil metabolisme CCL4 dalam sel epitel mukosa usus halus. Apoptosis pada sel epitel mukosa usus halus menyebabkan bakteri pada lumen usus halus dapat masuk kedalam pembuluh darah dan bertranslokasi menuju hepar. Pada beberapa penelitian kosambi terbukti memiliki metabolit sekunder yang mampu mendonorkan satu atom H pada molekul radikal bebas. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium untuk mengamati ekspresi *caspase-3* pada sel epitel mukosa usus halus. Total hewan percobaan sebanyak 25 ekor tikus terbagi kedalam kelompok kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan ekstrak daun kosambi dosis 200mg/KgBB, dosis 400mg/KgBB, dan dosis 600mg/KgBB. Pada kelompok kontrol positif dan perlakuan ekstrak daun kosambi diinjeksikan zat CCL4 secara intraperitoneal. Data ekspresi *caspase-3* pada sel epitel mukosa usus halus dianalisis dengan uji *One-Way ANOVA* ($p < 0,05$) dan didapatkan hasil $p = 0,000$ yang berarti signifikan. Data ekspresi *caspase-3* pada sel epitel mukosa usus halus selanjutnya dianalisis dengan uji *Post Hoc LSD* ($p < 0,05$). Hasil yang diperoleh dari penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun kosambi dapat menurunkan ekspresi *caspase-3* pada sel epitel mukosa usus halus. Perlakuan ekstrak daun kosambi dengan dosis 600mg/KgBB menunjukkan kemampuan menurunkan ekspresi *caspase-3* sel epitel mukosa usus halus paling optimal.

Kata kunci: *Caspase-3*, CCL4, ekstrak daun kosambi, usus halus

ABSTRACT

Riandinata, Mohammad Reza. 2020. THE INFLUENCE OF COSAMBI LEAF EXTRACT ON APOPTOSIS OF FINE Mucosal EPITEL CELLS INDUCED BY CCL4 IN THE HYPER FIBROSIS MODEL RAT Thesis. Medical Education Study Program Faculty of Medicine and Health Sciences Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang.

Advisor: (I) drg. Anik Listiyana, M. Biomed (II) drg. Risma Aprinda K., M. Si

Carbon Tetrachloride (CCL4) is commonly used as an agent for inducing liver fibrosis. In some studies, the administration of CCL4 has been found to cause apoptosis in intestinal mucosa epithelial cells. Apoptosis of epithelial cells caused by free radicals from CCL4 metabolism in intestinal mucosa epithelial cells. Apoptosis in the intestinal mucosa epithelial cells causes bacteria in the intestinal lumen to enter the blood vessels and translocate to the liver. In some studies, kosambi has been shown to have secondary metabolites that capable to donate one H atom to free radical molecules. This research is an experimental laboratory study to observe the expression of caspase-3 in intestinal mucosa epithelial cells. A total of 25 experimental rats were divided into negative control groups, positive controls, the treatment of kosambi leaf extract at a dose of 200mg / KgBB, a dose of 400mg / KgBB, and a dose of 600mg / KgBB. In positive control and kosambi leaf extracts groups, CCL4 is injected intraperitoneally. Data on caspase-3 expression in intestinal mucosa epithelial cells were analyzed with One-Way ANOVA test ($p < 0.05$) and the results obtained $p = 0,000$, which means significant. Data on caspase-3 expression in intestinal mucosal epithelial cells were further analyzed by the Post Hoc LSD test ($p < 0.05$). The results obtained from this study indicate that the administration of kosambi leaf extract can reduce caspase-3 expression in intestinal mucosa epithelial cells. The treatment of kosambi leaf extract at a dose of 600mg / KgBB showed the ability to decrease the expression of caspase-3 in intestinal mucosa epithelial cells optimally.

Keywords: *Caspase-3, CCL4, kosambi leaf extract, small intestine*

BAB I PENDAHULUAN

1.1.Latar belakang

Fibrosis hepar merupakan suatu respon penyembuhan jaringan hepar berlebihan akibat adanya lesi kronik pada jaringan hepar (Hernandez-Gea & Friedman, 2011). Fibrosis hepar terjadi karena produksi matriks ekstraseluler yang berlebih dan diikuti ketidakmampuan degradasi dan remodeling jaringan (Mormone, George, & Nieto, 2011). Fibrosis yang terjadi di hepar dapat mengubah susunan jaringan hepar yang akan berdampak fungsi dari sel-sel hepar. Jika tidak segera ditangani, fibrosis hepar dapat berkembang menjadi sirosis hepar yang memiliki prognosis buruk (Ebrahimi, Naderian, & Sohrabpour, 2016).

Fibrosis hepar dapat disebabkan oleh konsumsi alkohol, infeksi virus hepatitis, kelainan metabolisme (*Wilson's Disease*), autoimun, dan kelainan lainnya. Paparan agen racun seperti *Carbon Tetrachloride* (CCL4) dalam jangka waktu yang lama dapat mengakibatkan kerusakan dan apoptosis pada hepatosit (Bottcher & Pinzani, 2017). Kerusakan pada hepatosit akan mengaktivasi sel kuppfer. Aktivasi sel kuppfer menyebabkan pelepasan sitokin fibrogenetik seperti *transforming growth hormone- β* (TGF- β) dan *Platelets-derived Growth Factors* (PDGF) yang akan mengaktivasi dari *Hepatic Stellate Cells* (HSC). HSC merupakan sel di jaringan hepar yang nantinya akan berdiferensiasi menjadi *Myofibroblas* (MFB). MFB merupakan sel yang bertanggung jawab dalam produksi matriks ekstraseluler. Hal ini akan menyebabkan peningkatan produksi dari matriks ekstraseluler pada jaringan yang rusak (Mormone, George, & Nieto, 2011).

CCL4 yang diinjeksikan melalui intraperitoneal akan masuk kedalam pembuluh darah yang ada di peritoneum. Secara anatomis pembuluh darah yang ada di peritoneum merupakan pembuluh darah yang juga menyuplai darah untuk organ usus halus dan usus besar (Paulsen & Waschke, 2011). Sehingga CCL4 juga dapat terdistribusi pada usus halus. Hal ini dibuktikan oleh Ma, *et al.*, (2017) bahwa terdapat efek CCL4 pada usus halus utamanya pada lapisan mukosa. Lapisan mukosa usus halus merupakan pertahanan yang penting terhadap mikroorganisme dan bakteri yang ada pada lumen usus halus (Ma, et al., 2017).

Pada lapisan mukosa usus halus yang diinduksi oleh CCL4 ditemukan adanya kerusakan berupa apoptosis dari sel-sel epitel kolumnar, disfungsi barrier dan respon inflamasi. Akibatnya mikroorganisme dan bakteri dapat melewati lapisan enterosit dan masuk kedalam pembuluh darah (Ma, et al., 2017)

CCL4 awalnya akan dimetabolisme oleh sel epitel mukosa usus halus. metabolisme ini dilakukan oleh enzim p450 yang akan mengubah CCL4 menjadi CCL3 dan CCL3O2 (Pergel, et al., 2019). CCL3O2 merupakan salah satu produk superperoksidatif yang mampu menyebabkan peroksidasi membran lipid (Scholten, Trebicka, Liedtke, & Weiskirchen, 2015). CCL3O2 memperoksidasi lipid dengan cara mengambil satu atom H dari gugus lemak jenuh pada membran lipid. Proses tersebut dapat menghasilkan salah satu senyawa radikal bebas yaitu senyawa OH (Knockaert, et al., 2012). Membran fosfolipid merupakan salah satu bentuk membran yang dapat ditemui pada sel. Membran ini dapat ditemukan pada bagian membran sel dan membran mitokondria.

Berdasarkan penelitian Ma, *et al.*, (2014) kerusakan pada membran mitokondria dapat menyebabkan induksi apoptosis sel melalui jalur intrinsik.

CCL3O2 yang dihasilkan saat metabolisme CCL4 dapat menyebabkan stres oksidatif pada sel. Stres oksidatif pada sel dapat menyebabkan peningkatan ekspresi dari protein Bax (*Bcl2-associated X protein*) dan penurunan ekspresi protein Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) (Ma, Ding, Zhang, & Liu, 2014). Protein Bax merupakan protein proapoptosis yang bekerja dengan cara melubangi membran fosfolipid mitokondria. Akibatnya, protein sitokrom c yang ada pada mitokondria keluar menuju sitoplasma (Sinha, Das, Pal, & Sil, 2013). Sitokrom c nantinya akan menginduksi kaskade caspase 9 dan caspase 3. Caspase merupakan protein yang berfungsi dalam apoptosis sel. Protein Bcl-2 merupakan protein antiapoptosis yang mekanisme kerjanya menghambat dari kerja protein Bax (Ma, Ding, Zhang, & Liu, 2014).

Berdasarkan penelitian Na, *et al*, (2019) sel epitel mukosa usus halus yang mengalami apoptosis akan dideteksi oleh sistem imun melalui *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) yang menyebabkan infiltrasi sel-sel neutrofil. Infiltrasi sel-sel neutrofil akan menyebabkan aktivasi dari sel makrofag untuk mensekresikan sitokin proinflamasi seperti *interleukin-12* (IL-12), *interleukin-23* (IL-23), *interleukin-1 β* (IL-1 β) yang akan mengaktifasi sel Th1 dan Th17 (Na, Stakenborg, Seok, & Matteoli, 2019). Sel Th1 dan Th17 akan berperan dalam melawan invasi mikroorganisme dan bakteri yang akan masuk. Pada fase ini lapisan mukosa akan mengalami keadaan inflamasi.

Inflamasi merupakan keadaan yang terjadi akibat pelepasan sitokin-sitokin proinflamasi oleh sel imun. Sitokin proinflamasi ini dilepaskan ketika sel imun mendeteksi adanya gangguan pada tubuh seperti adanya infeksi patogen atau kerusakan pada jaringan. Pada akhir fase inflamasi, sel-sel neutrofil akan

mengalami apoptosis sel yang ditandai dengan keluarnya cairan intraseluler matriks. Apoptosis sel neutrofil juga diikuti dengan apoptosis dari sel-sel epitel akibat dari induksi inflamasi. Makrofag, selain memiliki fungsi sebagai sel penginduksi inflamasi juga memiliki fungsi sebagai sel penghambat inflamasi (Na, Stakenborg, Seok, & Matteoli, 2019). Makrofag menghambat inflamasi dengan cara menghambat sel Th1 dan Th17. Akibatnya akan terjadi penurunan produksi sitokin proinflamasi. Makrofag juga dapat menginduksi proliferasi sel epitel dengan mengeluarkan protein WNT dan sitokin IL-10. Protein WNT akan mengaktifasi stem cell yang ada pada kriptas Lieberkhun untuk berproliferasi dan berdeferensiasi menjadi sel epitel mukosa yang baru (Karin & Clevers, 2016).

Proliferasi stem sel yang terjadi merupakan hasil akhir dari proses inflamasi yang terjadi pada mukosa usus halus. Proses inflamasi bermula ketika CCL4, yang diinjeksi melalui intraperitoneum, dimetabolisme oleh sel enterosit menjadi *reactive oxygen species* (ROS) yang nantinya dapat menginisiasi proses apoptosis sel. ROS dapat dihambat dengan senyawa antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang bisa dihasilkan di dalam tubuh atau didapatkan dari luar tubuh. Kerusakan yang diakibatkan oleh ROS merupakan dampak dari ketidakmampuan antioksidan tubuh untuk menghambat kerja dari ROS. Sehingga dibutuhkan antioksidan yang lebih banyak, salah satu sumber antioksidan selain dari yang diproduksi oleh tubuh yakni berasal dari tumbuhan (Romero, Hernandez, Ceron, & Chavez, 2013).

Kosambi (*Schleichera Oleosa*) merupakan tanaman yang masuk dalam family Sapindaceae (Kundu & Schmidt, 2011). Kosambi dipercaya memiliki beberapa efek dalam kesehatan dan berpotensi menjadi salah satu obat alternatif

untuk berbagai macam penyakit (Muthukrishnan & Sivakkumar, 2017). Pada beberapa daerah di Jawa Timur, kosambi telah digunakan sebagai obat untuk penyakit-penyakit kulit seperti kudis, eksem dan radang telinga (Situmeang, Nuraeni, Ibrahim, & Silaban, 2016). Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa kosambi memiliki efek anti inflammasi dan anti rematik yang baik (Santha, *et al*, 2017). Penelitian yang dilakukan Tiwari, *et al*, (2017) menemukan bahwa daun dari kosambi mengandung banyak metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, saponin, tannin, glikosida, phytosterol, terpenoid dan coumarin. Serafini, *et al*, (2010) menyatakan bahwa flavonoid juga memiliki metabolit sekunder seperti *quercetin* dan *kaempferol* yang memiliki efek antioksidan. Quercetin dan Kaempferol dapat meninaktivasi dan memecah ROS yang dihasilkan secara endogen maupun eksogen (Panche, Diwan, & Chandra, 2016). Tannin dan saponin juga telah terbukti memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan dari kedua senyawa ini telah banyak diteliti dan terbukti mampu untuk mendonorkan atom H ke ROS. Hal ini akan mengurangi terjadinya stres oksidatif pada sel dan tubuh.

Disebutkan dalam hadits shahih riwayat Imam Bukhari, bahwa Rasulullah *shallallahu 'alaihi wa sallam* bersabda: “*Tidaklah Allah menurunkan penyakit kecuali Dia juga menurunkan penawarnya*”. Berdasarkan hadits tersebut, Rasulullah menjelaskan bahwa ketika Allah SWT menurunkan sebuah penyakit, maka Allah SWT juga menurunkan obatnya. Namun, Allah memerintahkan manusia untuk mencari dan meneliti obat yang tepat untuk mengatasi suatu penyakit. Allah juga berfirman dalam Qur'an Surat Asy-Syura ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَيْفَ أَبْنَيْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya “*Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?*”.

Pada Qur'an Surat Asy-Syura ayat 7 tersebut mengandung perintah bagi manusia untuk mengamati tumbuh-tumbuhan yang telah Allah SWT ciptakan. Berdasarkan buku Tafsir Jalalain Allah SWT telah menumbuhkan berbagai macam jenis tumbuhan di dunia. Dan masing-masing tumbuhan tersebut pasti memiliki manfaat yang terkandung di dalamnya. Berdasarkan ayat ini, peneliti ingin mencari tahu tentang manfaat daun kosambi, yang telah dipercaya memiliki khasiat obat, terhadap kejadian inflamasi pada usus halus yang diinduksi CCL4 dengan melihat ekspresi caspase 3 pada mukosa usus halus.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah pemberian ekstrak daun kosambi mampu menurunkan ekspresi *caspase-3* pada sel epitel mukosa usus halus pada tikus model fibrosis hepar?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kosambi terhadap apoptosis sel epitel mukosa usus halus yang diinduksi CCL4 pada tikus model fibrosis hepar

1.3.2. Tujuan khusus

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun kosambi terhadap ekspresi *caspase-3* pada sel epitel mukosa usus halus yang diinduksi CCL4 pada tikus model fibrosis hepar.

1.4. Manfaat penelitian

1.4.1. Manfaat Akademik

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi masukan untuk ilmu pengetahuan terhadap pengembangan kosambi sebagai suplemen alternatif baru untuk mencegah perkembangan fibrosis hepar.

1.4.2. Manfaat Aplikatif

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar ditemukan suplemen alternatif untuk pencegahan fibrosis hepar yang murah untuk masyarakat dan suplemen alternatif untuk menghambat kerusakan sel epitel pada usus halus sebagai efek samping fibrosis hepar.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Usus Halus

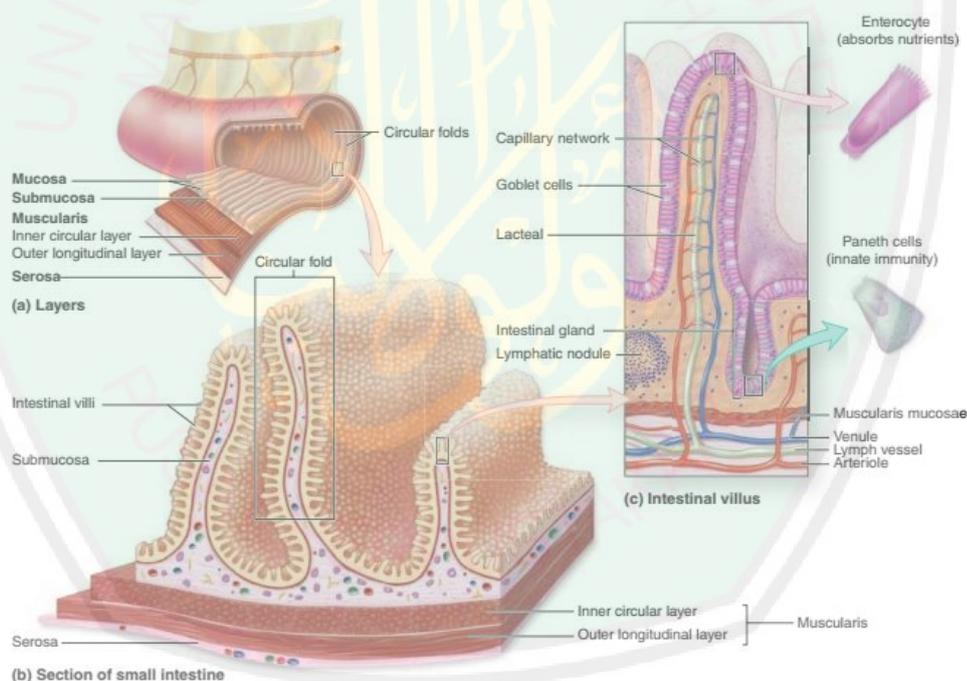
Usus halus merupakan organ dalam sistem pencernaan yang berfungsi untuk melakukan penyerapan nutrisi-nutrisi makanan. Usus halus terletak dalam rongga peritoneum. Usus halus mengolah makanan yang telah diterima dari lambung, yang nantinya akan diteruskan ke usus besar. Usus halus terdiri dari 4 lapisan yakni lapisan mukosa, lapisan submukosa, lapisan muskularis dan lapisan serosa pada bagian terluar (Mescher, 2013).

2.1.1. Histologi Lapisan Penyusun Dinding

a. Lapisan Mukosa

Gambaran makroskopis usus halus banyak ditemui lapisan yang bergelombang kedalam lumen yang disebut plika sirkularis. Plika sirkularis ini terbentuk atas lapisan mukosa dan submukosa. Pada lapisan mukosa akan banyak tonjolan-tonjolan kecil yang disebut vili. Bagian permukaan vili terdiri atas sel kolumnar selapis yang terbagi menjadi dua tipe yaitu sel enterosit dan sel goblet. Sel enterosit merupakan sel yang mendominasi pada lapisan mukosa. Pada vili, sel enterosit bertugas untuk menyerap nutrisi makanan yang ada dilumen usus dan diteruskan menuju pembuluh darah. Sel enterosit adalah sel kolumnar yang memiliki inti sel berbentuk oval yang biasanya terletak pada bagian basal sel. Bagian terluar sel enterosit terdapat struktur yang disebut *brush border* atau mikrovili. Mikrovili adalah tonjolan sitoplasma sel yang tersusun atas filamen aktin dan dilindungi oleh membran sel. Mikrovili memiliki panjang kurang lebih 1 μm dan diameter 1 μm . Setiap enterosit memiliki kurang lebih 3000 mikrovili dan

setiap 1 mm² lapisan mukosa memiliki sekitar 200 juta mikrovili. Mikrovili, vili, dan plika sirkularis memiliki fungsi yang sama yakni memperluas permukaan kontak absorpsi dengan lumen usus. Tujuannya agar lebih banyak nutrisi makanan yang dapat diserap oleh usus. Selain untuk penyerapan nutrisi, sel enterosit juga memiliki fungsi sekresi enzim pencernaan. Enzim-enzim yang disekresikan nantinya akan membantu untuk memecah nutrisi-nutrisi makan menjadi molekul yang lebih kecil sehingga mampu diserap oleh sel enterosit (Guyton et al, 2012). Sel goblet juga merupakan sel kolumnar yang terdapat pada lapisan mukosa usus halus. sel goblet memiliki peran untuk mensekresi mukus untuk melindungi dan melumasi dinding lumen usus halus. (Mescher, 2013)



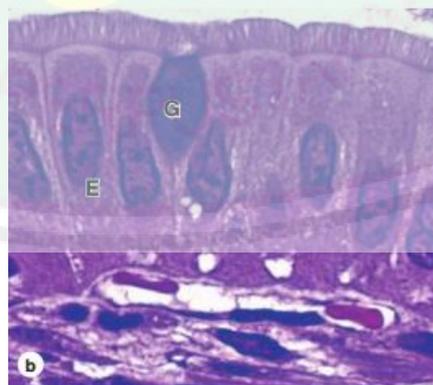
Gambar 2.1. Gambaran histologi lapisan mukosa usus halus.

Keterangan a) Gambaran lapisan-lapisan pada usus halus dan gambaran deretan plika sirkular. b) Gambaran lapisan mukosa, submukosa, muskularis dan serosa pada usus halus, gambaran plika sirkularis dan vili usus halus. c) Gambaran vili usus halus dan kripta Lieberkhun.

Sumber: Mescher, 2013

Diantara deretan vili pada lapisan mukosa terdapat celah yang berasal dari saluran kelenjar-kelenjar usus. Celah ini juga disebut sebagai kriptas Lieberkhun. Kriptas Lieberkhun tersusun juga atas deretan sel enterosit dan sel paneth. Sel paneth merupakan bagian sistem imunitas yang menekskresikan enzim-enzim seperti lisozim dan fosfolipase. Enzim lisozim dan fosfolipase merupakan enzim yang berfungsi untuk merusak membran sel mikroorganisme dan bakteri (Mescher, 2013).

Dibawah deretan sel enterosit dan sel goblet, terdapat lamina propria subepitel yang terdiri atas jaringan ikat. Jaringan ikat ini menghubungkan antara lapisan enterosit dengan pembuluh darah yang ada didalam vili. pembuluh darah yang ada dalam vili nantinya akan membawa nutrisi makanan yang telah diserap oleh sel enterosit vili dari lumen usus. Diantara pembuluh darah tersebut juga bercabang saluran limfe dari lapisan submukosa. Saluran limfe pada vili biasa disebut *lacteal*. Pada lapisan lamina propria subepitel dapat ditemukan sel makrofak usus halus yang berperan dalam mencegah masuknya bakteri atau toxin bakteri yang berhasil melewati lapisan sel enterosit (Wang, Ye, Zeng, & Qiao, 2019).



Sumber: Mescher, 2013

Gambar 2.2. Gambaran sel enterosis (E) dan sel goblet (G)

Sel-sel yang tidak berdiferensiasi menunjukkan aktivitas mitosis dan terletak di dasar kelenjar usus. Pada penelitian yang dilakukan Okamoto (2011),

menemukan bahwa sel ini merupakan sel yang selalu berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel-sel epitel yang lain. Sel ini diberi nama *Intestinal Stem Cell* (ISC). ISC ini dapat aktif berproliferasi ketika sel-sel pada mukosa usus halus mengalami kerusakan dan dibutuhkan penggantian dengan sel baru (Okamoto, 2011).

b. Lapisan Submukosa

Lapisan submukosa terdiri atas jaringan ikat halus, pembuluh darah, dan saluran limfe. Pada lapisan submukosa juga terdapat pleksus saraf meissner yang mengatur fungsi absorpsi, sekresi, dan kontraksi otot submukosa yang menyebabkan pelipatan pada lapisan mukosa. Khusus lapisan submukosa pada duodenum terdapat kelenjar khas yakni kelenjar Brunner. Kelenjar Brunner merupakan kelenjar yang mensekresikan mukus yang bersifat basa. Tujuan dari sekresi mukus ini adalah untuk menetralkan makanan yang telah diolah di lambung. Makanan saat diolah dilambung akan tercampur dengan cairan HCL yang bersifat asam (Gartner & Hiatt, 2007).

c. Lapisan Muskularis

Menurut Gartner, *et al*, (2007) lapisan muskularis dari usus halus terdiri dari jaringan otot polos sirkularis dan jaringan otot polos longitudinal. Jaringan otot polos sirkularis terletak pada bagian dalam dan jaringan otot polos longitudinal pada bagian luar dari lapisan muskularis. Pleksus mienterikus (Auerbach), yang terletak di antara dua lapisan otot sirkularis dan longitudinal. Pleksus mienterikus bertanggung jawab atas aktivitas peristaltik usus halus (Gartner & Hiatt, 2007).

d. Lapisan Serosa

Khusus pada bagian kedua dan ketiga dari duodenum, yang memiliki adventitia, seluruh usus halus dilapisi oleh lapisan serosa (Gartner & Hiatt, 2007).

2.1.2. Induksi CCL4 Pada Usus Halus

CCL4 telah diketahui secara luas memiliki efek hepatotoksik. Efek hepatotoksik ini sering digunakan untuk penginduksian fibrosis hepar pada hewan coba. Untuk penginduksian fibrosis hepar CCL4 diinjeksikan pada hewan coba melalui injeksi peritoneal. CCL 4 yang diinjeksikan secara peritoneal nantinya akan diserap oleh peritoneum dan dibawa melalui pembuluh darah menuju hepar. Secara anatomis seluruh pembuluh darah yang terdapat pada dinding peritoneum merupakan pembuluh darah yang memperdarahi saluran pencernaan utamanya usus halus dan susu besar (Paulsen & Waschke, 2011). CCL 4 yang masuk kedalam pembuluh darah usus tadi nantinya akan dibawa ke hepar. Semua nutrisi dan toksin yang diserap oleh saluran pencernaan akan dibawa oleh pembuluh darah ke hepar melalui pembuluh darah portal (Konturek, et al., 2018).

Pemberian CCL4 secara peritoneal tidak hanya menimbulkan kerusakan pada hepar saja. Penelitian sebelumnya menemukan bahwa CCL4 juga menimbulkan kerusakan pada jaringan epitel usus halus (Ma, et al., 2017). CCL4 yang diinjeksikan secara intraperitoneal nantinya akan diserap oleh peritoneum dan masuk kedalam pembuluh darah yang ada diperitoneum. Secara anatomis pembuluh darah yang memperdarahi usus halus menempel pada dinding-dinding peritoneum. Pembuluh darah yang dimaksud adalah arteri jejunaes, arteri small intestinees dan arteri ileocolica yang merupakan percabangan dari arteri mesenterika superior (Paulsen & Waschke, 2011) Hal ini memungkinkan untuk CCL4 juga terdistribusi di usus halus.

CCL4 yang terdistribusi pada akan masuk kedalam enterosit dan diolah oleh enzim sitokrom P450 menjadi *trichloromethyl* (CCL3) dan *trichloromethyl peroxyde* (CCL3O2) yang merupakan radikal bebas yang dapat merusak jaringan (Scholten, Trebicka, Liedtke, & Weiskerchen, 2015). CCL3O2 merupakan salah satu radikal bebas yang mampu menyebabkan peroksidasi membran lipid (Scholten, Trebicka, Liedtke, & Weiskerchen, 2015). Pada penelitian yang dilakukan oleh Pergel, *et al*, (2019) ditemukan bahwa adanya peningkatan konsentrasi *Malondialdehyde* (MDA) dan penurunan konsentrasi *superoxyde dimutase* (SOD) pada jaringan hepar. MDA merupakan produk hasil peroksidasi lipid, sedangkan SOD adalah enzim yang bertugas untuk memecah superoksida. Konsentrasi MDA dan SOD yang tinggi dalam suatu jaringan dapat mengindikasikan adanya kerusakan pada jaringan tersebut. Hal yang sama juga ditemukan pada sel enterosit, bahwa terjadi peningkatan konsentrasi MDA namun juga terjadi peningkatan konsentrasi dari SOD. Artinya hal ini menandakan adanya kerusakan yang terjadi kerusakan pada lapisan mukosa yang diakibatkan oleh superperoksida (Pergel, *et al.*, 2019). Membran fosfolipid dapat ditemukan salah satunya di membran mitokondria (Kuhlbrandt, 2015).

CCL4 yang masuk kedalam enterosit akan dimetabolisme oleh enzim p450 menjadi CCL3. CCL3 yang bebas pada sitoplasma akan berikatan dengan molekul O₂ yang bebas terdapat pada sitoplasma membentuk CCL3O₂ (Pergel, *et al.*, 2019). CCL3O₂ memiliki kemampuan untuk memperoksidasi membran lipid yang terdapat pada sel. Membran lipid pada sel dapat ditemukan salah satunya pada membran mitokondria. Mitokondria merupakan organel sel yang memiliki peran penting dalam proses respirasi sel. CCL3O₂ memperoksidasi membran lipid

dengan cara menarik satu atom H yang terdapat pada molekul lemak jenuh yang ada pada membran lipid (Knockaert, et al., 2012). Akibatnya akan terbentuk gugus OH yang merupakan salah satu dari *reactive oxygen species* (ROS). Ketika jumlah gugus OH dalam mitokondria meningkat, protein JNK dapat teraktivasi. Protein JNK nantinya akan memfosforilasi sitokrom p53 yang merupakan protein yang berperan dalam transkripsi gen DNA apoptosis. Transkripsi yang dilakukan p53 akan menghasilkan protein Bax (*Bcl2-associated X protein*) dan p53-upregulated-modulator-of-apoptosis (PUMA) (Sinha, Das, Pal, & Sil, 2013). Protein Bax merupakan protein proapoptosis yang bekerja dengan cara melubangi membran fosfolipid mitokondria (Ma, Ding, Zhang, & Liu, 2014). PUMA bekerja untuk menghambat akitvasi dari Bcl-2 yang merupakan protein antiapoptosis yang mekanisme kerjanya menghambat dari kerja protein Bax (Sinha, Das, Pal, & Sil, 2013). ROS juga akan menyebabkan pelepasan ikatan antara sitokrom c dengan cardiolipin (Sinha, Das, Pal, & Sil, 2013). Sitokrom c merupakan protein yang terdapat pada ruang intramembran mitokondria. Ketika membran lipid lubang sitokrom c yang bebas dalam ruang intramembran akan keluar menuju sitoplasma. Nantinya sitokrom c ini akan berikatan dengan *apoptosis-activating-factor* yang nantinya ikatan antara keduanya akan mengaktifkan kaskade caspase 9 dan caspase 3. Caspase merupakan protein yang berfungsi dalam apoptosis sel (Ma, Ding, Zhang, & Liu, 2014).

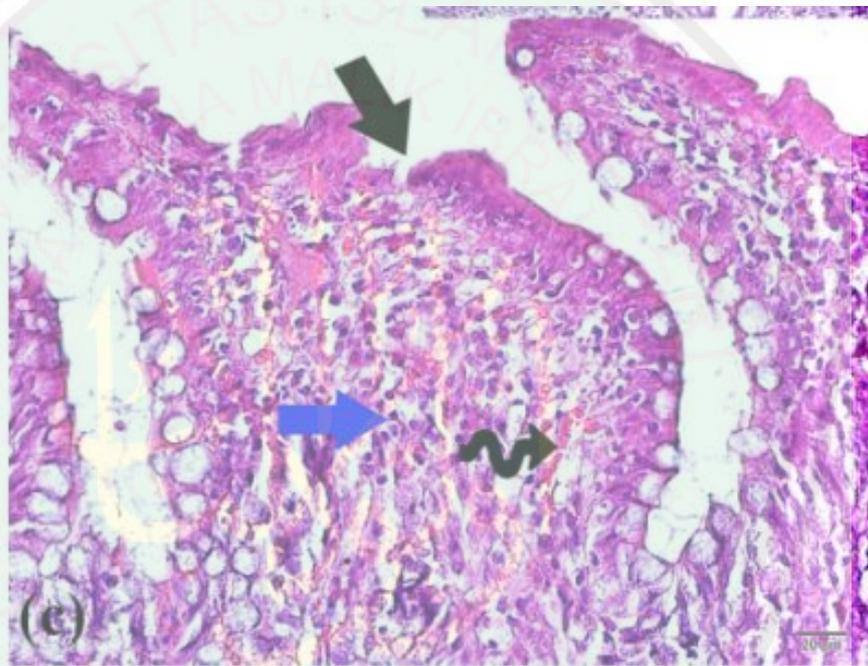
Pada akhir fase inflamasi, sel-sel neutrofil akan mengalami apoptosis sel yang ditandai dengan keluarnya cairan intraseluler matriks. Apoptosis sel neutrofil juga diikuti dengan apoptosis dari sel-sel epitel akibat dari induksi inflamasi. Sel-sel neutrofil dan epitel yang mengalami apoptosis akan di bersihkan oleh makrofag.

Pembersihan sel apoptosis oleh makrofag akan menyebabkan makrofag berubah menjadi sel penghambat inflamasi (Na, Stakenborg, Seok, & Matteoli, 2019). Makrofag menghambat inflamasi dengan cara mengeluarkan sitokin bernama Lipoxin A4 (LXA4). Produksi sitokin LXA4 akan menghentikan infiltrasi sel-sel neutrofil dan menghambat produksi sitokin-sitokin proinflamasi. Akibatnya akan terjadi penurunan produksi sitokin proinflamasi. Makrofag juga dapat menginduksi proliferasi sel epitel dengan mengeluarkan sitokin WNT. Sitokin WNT akan mengaktifasi stem cell yang ada pada kriptas Lieberkhun untuk berproliferasi dan berdeferensiasi menjadi sel epitel mukosa yang baru (Karin & Clevers, 2016).

Sitokin WNT merupakan salah satu sitokin yang mampu mengaktifasi proliferasi dari *Intestinal Stem Cells* (ISC) yang terdapat pada kriptas Lieberkhun (Perochon, Carroll, & Cordero, 2018). ISC merupakan sel pluripotent yang memiliki daya proliferasi dan mampu berdiferensiasi menjadi sel-sel epitel pada mukosa usus halus. ISC mampu berdiferensiasi menjadi sel enterosit, sel goblet dan sel paneth. Sitokin WNT yang dikeluarkan oleh makrofag akan ditangkap oleh reseptor Frizzled (Fz) yang terdapat pada permukaan membran ISC (Mah, *et al*, 2016). Sitokin WNT yang berikatan dengan reseptor Fz akan mengaktifasi protein β -catenin untuk mentranskripsikan DNA pro-onkogenik yakni *c-Myc*. Transkripsi *c-Myc* akan menginduksi proliferasi ISC melalui jalur Fak dan Akt/mTOR (Perochon, Carroll, & Cordero, 2018).

2.1.3. Histopatologi induksi CCL4 pada usus halus

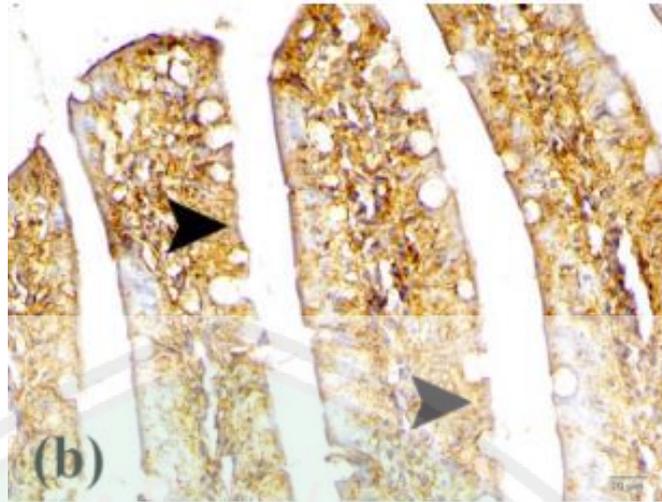
Efek induksi CCL4 pada usus halus biasanya ditemukan adanya kerusakan pada lapisan mukosa. Pada penelitian yang dilakukan oleh Pergel, *et al*, (2019) ditemukan adanya kerusakan masif pada mukosa usus. Hal ini ditandai dengan adanya perubahan pada vili usus halus. Vili pada mukosa usus halus mengalami atrofi, pemendekan serta diskontinuitas pada vilis mukosa. Pada gambaran histopatologi vili juga ditemukan infiltrasi sel-sel inflamasi kedalam lamina propria dan lapisan otot pada mukosa vili.



Gambar 2.3 Gambaran histopatologi mukosa usus halus dengan pewarnaan HE. Keterangan: kongesti kapiler (panah berkelok), infiltrasi neutrofil (panah biru), lapisan epitel terputus (panah)

Sumber: Pergel, et al, 2019

Pada gambaran histopatologi lapisan mukosa usus halus juga ditemukan adanya peningkatan marker *caspase-3* dengan pewarnaan imunohistokimia. *Caspase-3* terwarna dengan warna coklat pada gambaran Hal ini menunjukkan bahwa adanya apoptosis sel enterosit secara masif pada lapisan mukosa (Pergel, et al., 2019).



Gambar 2.4 Gambaran histopatologi mukosa usus halus dengan pewarnaan imunohistokimia dengan marker *caspase-3*
Keterangan: kepala panah menunjukkan ekspresi *caspase-3*
Sumber: Pergel, et al, 2019

2.2. Fibrosis Hepar

2.2.1 Definisi Fibrosis Hepar

Fibrosis hepar terjadi akibat respon penyembuhan jaringan hepar ekksesif karena adanya lesi kronik pada jaringan hepar (Hernandez-Gea & Friedman, 2011). Fibrosis hepar terjadi karena produksi matriks ekstraseluler yang berlebih dan diikuti ketidakmampuan degradasi dan remodeling jaringan (Mormone, George, & Nieto, 2011). Fibrosis yang terjadi di hepar dapat mengubah susunan jaringan hepar yang akan berdampak fungsi fisiologis sel-sel hepar. Jika tidak segera ditangani, fibrosis hepar dapat berkembang menjadi sirosis hepar yang memiliki prognosis buruk (Ebrahimi, Naderian, & Sohrabpour, 2016).

2.2.2 Patogenesis Fibrosis Hepar

2.2.2.1. Induksi CCL4 dan Fibrosis Hepar

Paparan agen racun seperti hepatitis, alkohol, asam empedu, dan zat kimia seperti *Carbon Tetrachloride* (CCL4) dalam jangka waktu yang lama dapat mengakibatkan kerusakan dan apoptosis pada hepatosit (Böttcher, et al, 2017).

Asetildehida merupakan produk metabolisme alkohol yang dapat menyebabkan peningkatan sekresi *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) sehingga menstimulasi *Hepatic Stellate Cells* (HSC) untuk mensekresikan matriks ekstraseluler (Anania, *et al*, 1996).

HSC yang teraktivasi akan mengeluarkan kandungan vitamin A yang ada dalam sel nya. Pengeluaran vitamin A ini menyebabkan perubahan fenotip dari HSC. Akibatnya HSC berdiferensiasi menjadi MFB. MFB merupakan sel yang bertanggung jawab atas produk dari matriks ekstraseluler (Pinzani, 2015). Matriks ekstraseluler yang dihasilkan oleh MFB ini akan menggantikan jaringan yang rusak untuk sementara. Sehingga dapat mempertahankan fungsi fisiologis organ. Matriks ekstraseluler yang dihasilkan nantinya akan di remodelling lagi oleh enzim *Matrix Metalloproteinase* (MMP) (Weiskerchen, Weiskerchen, & Tacke, 2018). Enzim MMP memiliki peran untuk mendegradasi matriks ekstraseluler yang telah diproduksi oleh MFB. Matriks ekstraseluler yang didegradasi nantinya akan digantikan oleh sel-sel hepatosit yang baru. Kerja dari MMP ini diatur oleh enzim *Tissue Inhibitors Metalloproteinase* (TIMP). TIMP bekerja dengan cara menghambat produksi dari MMP ketika matriks ekstraseluler yang terdapat di jaringan sudah tidak ada. Pada jangka waktu yang lama, terjadi penurunan produksi MMP dan peningkatan TIMP (Mormone, George, & Nieto, 2011). Hal ini mengakibatkan matriks ekstraseluler yang diproduksi tadi tidak mengalami degradasi. Akibatnya jaringan yang mengalami kerusakan tetap terisi oleh matriks ekstraseluler. Kerusakan jaringan yang terus menerus mengakibatkan semakin banyaknya matriks ekstraseluler yang diproduksi (Weiskerchen, Weiskerchen, & Tacke, 2018). Semakin luas juga matriks ekstraseluler yang menggantikan jaringan

yang rusak. Jika hal ini terjadi secara terus menerus, hepar akan kehilangan fungsi fisiologisnya. Kehilangan fungsi fisiologis pada hepar diakibatkan hilangnya sel-sel hepatosit akibat kerusakan jaringan dan tidak dapat terbaru (Pinzani, 2015).

Pada keadaan normal, matriks ekstraseluler selanjutnya akan di degradasi dan di remodeling. Enzim yang berperan dalam regulasi ini adalah MMP dan TIMP. MMP merupakan enzim yang bertugas untuk mendegradasi dari matriks ekstraseluler dan TIMP bertugas untuk menghambat kerja dari MMP. Keseimbangan kerja dari MMP dan TIMP sangat penting dalam meregulasi produksi dari matriks ekstraseluler (Goto, *et al*, 2004). Penelitian yang dilakukan oleh Mormone, *et al*, (2011) menunjukkan produksi enzim MMP semakin menurun ketika HSC teraktivasi secara terus menerus. Sebaliknya, ekspresi TIMP mengalami peningkatan ketika HSC teraktivasi secara terus menerus.

2.2.2.2. Kerusakan Epitel Usus Halus dan Fibrosis Hepar

Kerusakan epitel usus halus memiliki peranan penting dalam patogenesis fibrosis hepar. Kerusakan pada epitel mukosa usus halus dapat menyebabkan terjadinya translokasi bakteri dari lumen usus ke pembuluh darah (Guarner, *et al* 2005). Translokasi bakteri dari usus halus ke hepar terjadi karena *barrier* mukosa pada usus halus mengalami kerusakan. *Barrier* ini mencegah masuknya bakteri dan toksinnya kedalam pembuluh darah. Kerusakan dari epitel usus halus dapat disebabkan akibat paparan agen toksin seperti CCL4.

Translokasi bakteri dari usus halus ke hepar melalui pembuluh darah vena porta. Berdasarkan penelitian Konturek, *et al*, (2018) bahwa semua komponen yang diserap dan dibawa oleh pembuluh darah dari saluran pencernaan akan dibawa ke hepar melalui vena porta. Bakteri yang masuk ke dalam hepar akan di deteksi oleh

sel Kuppfer melalui reseptor TLR4 (Seki, et al., 2007). Hal ini akan menyebabkan sel kuppfer teraktivasi dan melepaskan sitokin-sitokin proinflamasi.

Sel kuppfer yang teraktivasi akan menghasilkan sitokin-sitokin pro-inflamasi seperti *tumor necrotic factor- α* (TNF- α), *interleukin-6* (IL-6), *interleukin-1* (IL-1). Sitokin-sitokin pro-inflamasi ini akan menyebabkan keadaan inflamasi pada jaringan sekitarnya. Keadaan inflamasi ini akan mengundang sel-sel imun untuk datang ke jaringan yang rusak. Sel-sel imun tersebut akan mendegradasi debris-debris sel yang telah rusak. Disaat yang bersamaan sel kuppfer juga menghasilkan sitokin-sitokin pro-fibrogenetik, seperti TGF- β dan PDGF untuk memperbaiki jaringan hepar yang rusak. Sitokin pro-fibrogenetik ini, kemudian mengaktivasi dari HSC yang berada di sekitar jaringan. Aktivasi dari HSC akan menyebabkan produksi dari matriks ekstraseluler (Mormone, George, & Nieto, 2011).

2.3. Kosambi

Tanaman kosambi merupakan tanaman asli dari asia tenggara dan asia selatan. Tanaman ini dapat ditemui di lembah himalaya, Sri langka, dan Indonesia. Di Indonesia sendiri tanaman kosambi banyak tumbuh di Jawa, Bali, Nusa Tenggara, Maluku, Sulawesi, Pulau Kai, dan Pulau Seram. Di wilayah Jawa Timur khususnya tanaman ini bisa ditemukan di Panuran, Probolinggo, Pasuruan, dan Besuki. (Suita, 2012)

2.1.1. Taksonomi Kosambi

Kingdom: *Plantae*

Subkingom: *Tracheobionta*

Subdivisi: *Spermatophyta*

Divisi: *Magnoliophyta*

Kelas: *Magnoliopsysda*

Subkelas: *Rosidae*

Ordo: *Sapindales*

Famili: *Sapindaceae*

Genus: *Schleichera Wilid.*

Spesies: *Schleichera Oleosa (Lour.) Oken*

(Goswami & Singh, 2017)

2.1.2. Deskripsi Tanaman Kosambi

Kosambi merupakan tanaman yang tumbuh di daerah dataran rendah yang beriklim kering. Kosambi dapat tumbuh di dataran yang memiliki ketinggian 250 mdpl hingga 600 mdpl. Kosambi, untuk dapat tumbuh membutuhkan curan hujan 750 – 2500 mm per tahunnya. Tumbuhan kosambi dapat tumbuh pada suhu lingkungan 35 - 47,5 °C. Kosambi membutuhkan tanah yang kering hingga terkadang tanah yang berbatu, kerikil, dan liat. Kawasan hutan produksi yang tidak produktif dan lahan kritis di luar kawasan hutan dapat ditanami kosambi. (Suita, 2012)

Kosambi atau kesambi (*Schleichera oleosa*) adalah sejenis pohon daerah kering, berkerabat dengan jenis rambutan yang berasal dari suku Sapindaceae. Kosambi memiliki beberapa nama yang berbeda di masing-masing daerah, misalnya: *kasambi* (Sunda.); *kosambi*, *kusambi*, *sambi* (Jawa dan Bali); *kasambhi* (Madura.); *kusambi*, *usapi* (Timor); *kasembi*, *kahembi* (Sumba); *kehabe* (Sawu); *kabahi* (Solor); *kalabai* (Alor); *kule*, *ule* (Rote); *bado* (Makassar); *ading* (Bugis). (Suita, 2012)

Tanaman kosambi termasuk pohon yang berukuran besar, tingginya sendiri mampu mencapai 40 m dan diameternya dapat mencapai 2 m. Batang pohon kosambi selalu bengkok dan bermata kayu seperti berbanir. Kulit pohon kosambi bertekstur halus, berwarna abu-abu. Batang pohon berbentuk silindris, berkerut dan tipis, berbulu pendek berwarna kuning kemerahan ketika muda dengan kelenjar tertentu, hitam, kemudian coklat kekuningan seperti abu. Daunnya bersirip genap, anak daun terakhir seringkali seperti ujung anak daun. Bentuk daunnya lanset, berseling, panjang 11-25 cm, lebar 2-6 cm, tepi rata, ujung lancip, pertulangan menyirip, tangkai bulat, panjang + 1 cm dan berwarna hijau. Bunga terletak pada bagian cabang yang tidak berdaun, kadang-kadang terletak diketiak daun, warna kuning pucat hingga hijau pucat. Bunga kosambi adalah bunga majemuk, berbentuk tandan, di ketiak daun atau ujung batangan, kelopak 4-6 lembar, bersatu di pangkal, berduri, hijau dan warna mahkotanya putih. Buah dan biji berbentuk bulat dengan diameter biji 6-10 cm, buah terdiri atas 1 - 2 biji, biji dikelilingi oleh kulit berwarna coklat kehitaman. Termasuk akar tunggang dan berwarna coklat muda. (Suita, 2012)



Gambar 2.5 Pohon Kosambi
Sumber: Suita, 2012

2.1.3. Kandugan Tanaman Kosambi

Tanaman kesambi (*Schleichera oleosa*), dari beberapa penelitian sebelumnya disebutkan bahwa tanaman ini memiliki banyak manfaat. Tanaman ini dipercaya sebagai tanaman obat. Dahulu masyarakat Bali dan Madura menggunakan kulit pohon kesambi sebagai obat kulit yang sangat manjur, terutama terhadap penyakit kudis dan penyakit kulit lainnya (Situmeang, Nuraeni, Ibrahim, & Silaban, 2016). Daun kesambi berkhasiat sebagai obat eksem, obat kudis, obat koreng dan obat radang telinga. Buah dari tanaman kesambi banyak mengandung vitamin C yang baik sebagai antioksidan (Suita, 2012).



Gambar 2.6 Daun dan Buah Kosambi
Sumber: Kundu, et al, 2011

Beberapa tanaman obat, buah-buahan, sayuran dapat mengurangi risiko kerusakan oksidatif karena mengandung vitamin, karoten, senyawa fenolik, flavanoid, alkanoid, tanin, dll. Yang bertindak sebagai agen kemopreventif. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa kosambi memiliki efek anti inflammasi dan anti rematik yang baik (Santha , Kanchana, & Shakeela, 2017). Penelitian sebelumnya menemukan bahwa daun dari kosambi mengandung banyak metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, saponin, tannin, glikosida, phytosterol, terpenoid dan coumarin (Tiwari & Pandey, 2017).

a. Flavonoid

Flavonoid telah banyak diteliti dan terbukti memiliki berbagai manfaat untuk tubuh. Flavonol banyak tersebar dalam tumbuhan baik sebagai pigmen antosianin dalam petal maupun dalam daun tumbuhan tingkat tinggi. Flavonol umumnya terdapat dalam bentuk glikosida dalam bentuk umum seperti kaempferol, kuersetin dan mirisetin (Arifin & Ibrahim, 2018). Flavonoid dapat berperan sebagai zat antioksidan, Quercetin adalah salah satu flavonol terbaik. Quercetin ditemukan di banyak buah dan sayuran tapi juga banyak terdapat pada bawang merah, apel merah, anggur merah, teh, cranberry, kangkung, paprika dan brokoli. Quercetin, telah mendapat banyak perhatian dalam hal ini karena quercetin juga mewakili subklas flavonol yang menunjukkan nutrisi dan sifat farmasinya (Arifin & Ibrahim, 2018).

Antioksidan adalah kelompok bahan kimia yang melindungi sistem biologis terhadap potensi efek berbahaya dari proses, atau reaksi oksidasi. Antioksidan merupakan suatu molekul yang memiliki mekanisme aktivitas seperti penangkap radikal bebas, inaktivasi peroksida dan spesies oksigen reaktif lainnya. Antioksidan merupakan zat yang dibutuhkan oleh tubuh yang secara umum dapat menghambat oksidasi lemak. Dimana radikal bebas dihasilkan dari produk samping hasil dari proses pembentukan energi dalam tubuh. Flavonoid bisa mencegah luka akibat radikal bebas. Salah satunya adalah menangkap langsung radikal bebas. Flavonoid mampu menangkap radikal bebas secara langsung melalui sumbangan atom hidrogen. Flavonoid yang sering dijumpai adalah apigenin dan luteolin (Nijveldt, et al., 2001).

b. Tannin

Tannin adalah metabolit sekunder polifenol dari tanaman tingkat tinggi, dan merupakan ester galoil dan turunannya, di mana gugus galoil atau turunannya melekat pada berbagai inti poliol, katekin, dan triterpenoid (*gallo-tannin*, *ellagitannin*, dan tanin kompleks), atau mereka adalah *proanthocyanidins* oligomer dan polimer yang dapat memiliki pola kopling dan substitusi yang berbeda (tanin terkondensasi) (Khanbabaee & Ree, 2002).

Tannin tidak hanya berfungsi sebagai antioksidan primer (dengan cara menyumbangkan atom hidrogen atau elektron), tannin juga berfungsi sebagai antioksidan sekunder. Tannin memiliki kemampuan untuk mengkelat ion logam seperti Fe (II) dan mengganggu salah satu langkah reaksi dalam reaksi Fenton dan dengan demikian memperlambat oksidasi (Amarowicz, 2007).

c. Saponin

Saponin adalah senyawa yang ditemukan di banyak tanaman dan mereka memiliki fitur khas membentuk busa. Saponin merupakan salah satu metabolit sekunder yang dapat ditemukan pada ekstrak daun kosambi (Situmeang, Nuraeni, Ibrahim, & Silaban, 2016). Saponin merupakan glikosida yang memiliki aglikon polisiklik. Aglikon ini biasa disebut sebagai sapogenin, sedangkan subset dari saponin steroid umumnya disebut sebagai sarapogenin. Saponin bersifat amphipati karena fungsi aglikon yang larut dalam lemak dan rantai sakarida yang larut dalam air.

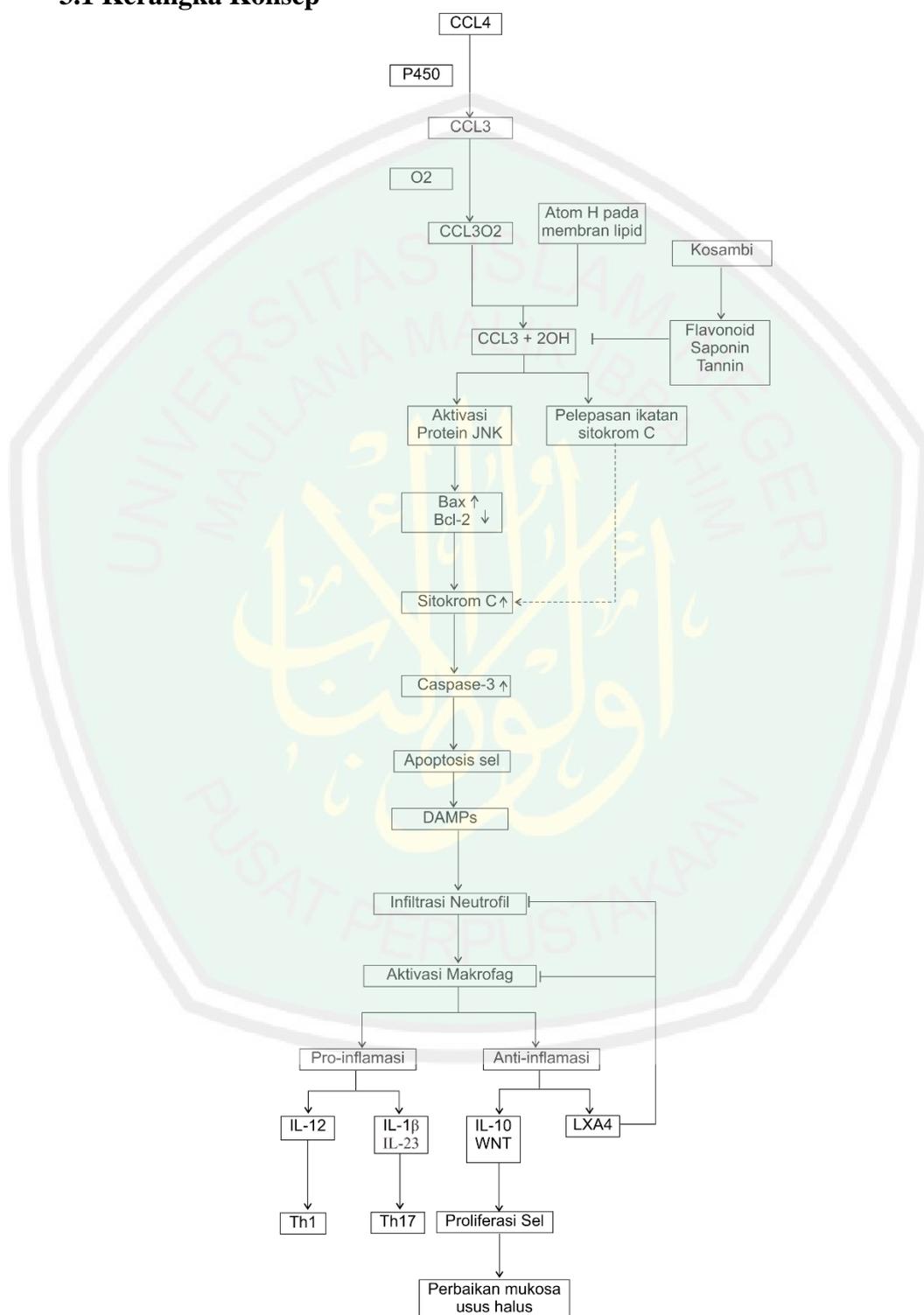
Saponin dipercaya memiliki fungsi sebagai antioksidan baik dalam tubuh. Penelitian yang dilakukan Nafiu, et al, (2017) membuktikan bahwa saponin memiliki kemampuan antioksidan yang lebih poten jika dibandingkan dengan

Quercetin. Pada penelitian lain juga membuktikan bahwa, saponin memiliki kemampuan untuk menstabilkan ROS dengan mendonorkan satu atom H (Ashraf, Aziz, Stanslas, Ismail, & Kadir, 2013).



BAB III KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep



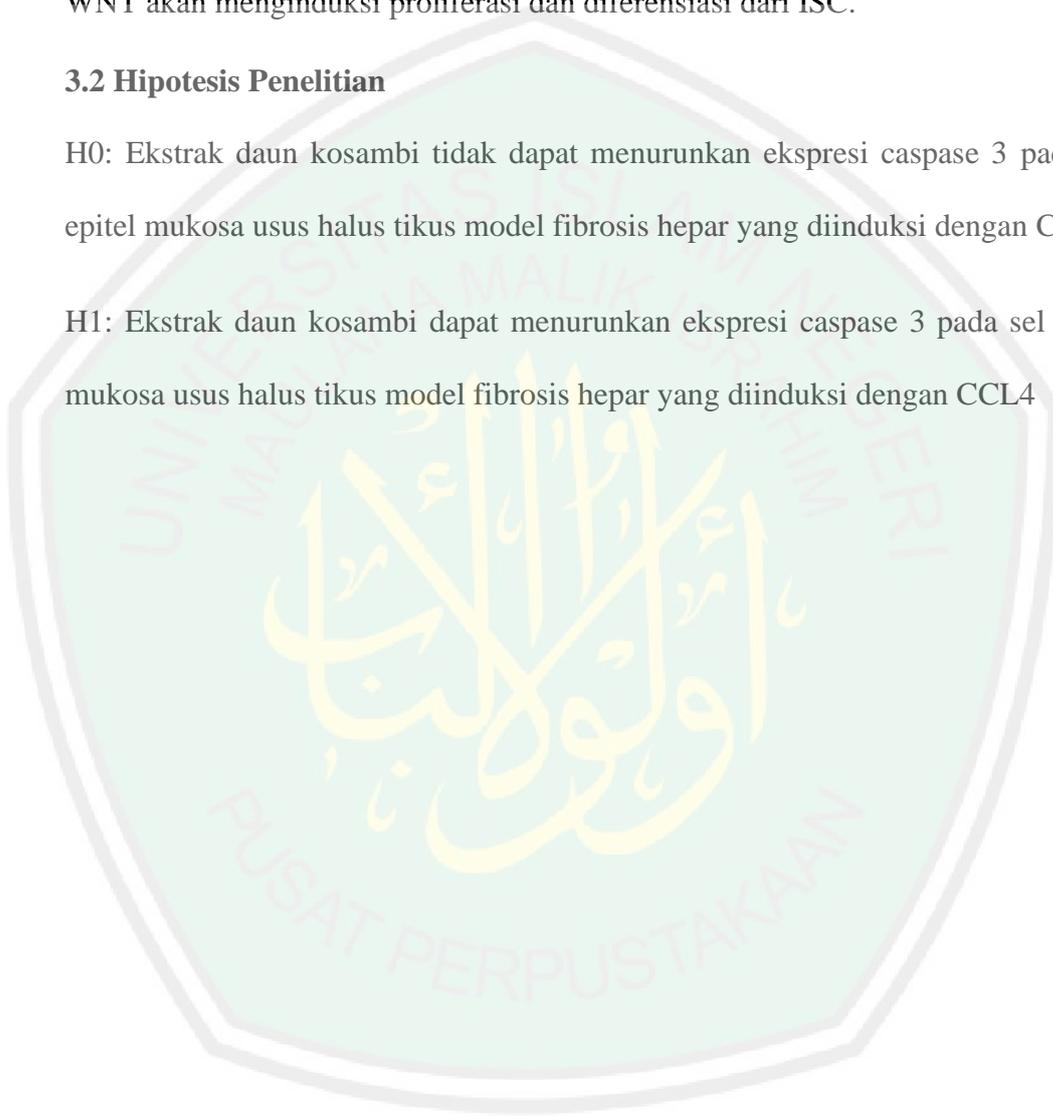
Induksi CCL4 secara intraperitoneal akan di metabolisme oleh enterosit usus halus. CCL 4 akan diubah menjadi CCL3. CCL3 nantinya akan berikatan dengan molekul O₂ bebas membentuk suatu superperoksida bernama CCL3O₂. CCL3O₂ dapat memperoksidasi membran lipid dengan cara mengambil satu atom H pada ikatan gugus lemak jenuh. Akibatnya akan terbentuk molekul OH yang merupakan salah ROS yang dapat merusak ikatan kimia pada sel. Molekul OH dapat mengaktifasi protein JNK yang nantinya akan memfosforilasi sitokrom p53. Fosforilasi sitokrom p53 akan menyebabkan transkripsi dari protein proapoptik, seperti Bax (*Bcl2-associated X protein*), dan PUMA (p53-upregulated-modulator-of-apoptosis). PUMA merupakan protein yang memiliki kerja menghambat aktivasi dari protein antiapoptotik seperti Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). Bax dapat menginduksi apoptosis dengan cara melubangi membran mitokondria. Molekul OH juga dapat melepaskan ikatan antara sitokrom c dengan cardiolipin. Sitokrom C yang bebas akan keluar menuju sitoplasma dan menginduksi kaskade *caspase-3*. Kaskade *caspase-3* akan menyebabkan apoptosis sel enterosit. Apoptosis sel enterosit memberikan kesempatan bakteri untuk masuk kedalam pembuluh darah dan menyebar keseluruhan tubuh. Apoptosis sel enterosit akan dideteksi oleh APC melalui mekanisme DAMPs (*damage-associated molecular patterns*). Akibatnya APC (*Antigen presenting cell*) akan mengundang neutrofil untuk infiltrasi pada jaringan yang mengalami kerusakan. Infiltrasi neutrofil akan menyebabkan aktivasi dari makrofag yang akan mengeluarkan sitokin-sitokin pro-inflamasi seperti IL-12, IL-1b, dan IL-23. IL-12 akan mengaktifasi sel Th1, sedangkan IL-1b dan IL-23 akan mengaktifasi sel Th17. Pada akhir fase inflamasi, neutrofil akan mengalami apoptosis dan mengirimkan sinyal kepada makrofag untuk melakukan fagositosis.

Fagositosis yang dilakukan makrofag ini akan mengubah fungsi makrofag yang awalnya sel pro-inflamasi menjadi sel anti-inflamasi. Pada fase ini makrofag akan mensekresikan sitokin-sitokin seperti IL-10, WNT, dan LXA4. LXA4 memiliki mekanisme kerja menghambat infiltrasi neutrofil ke jaringan yang rusak. IL-10 dan WNT akan menginduksi proliferasi dan diferensiasi dari ISC.

3.2 Hipotesis Penelitian

H0: Ekstrak daun kosambi tidak dapat menurunkan ekspresi caspase 3 pada sel epitel mukosa usus halus tikus model fibrosis hepar yang diinduksi dengan CCL4

H1: Ekstrak daun kosambi dapat menurunkan ekspresi caspase 3 pada sel epitel mukosa usus halus tikus model fibrosis hepar yang diinduksi dengan CCL4



BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Desain penelitian ini adalah penelitian eksperimental *post test only control group design* untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun kosambi (*Scheicera Oleosa*) terhadap ekspresi *caspase-3* pada sel epitel mukosa usus halus yang diinduksi CCL4 pada tikus model fibrosis hepar.

4.2. Waktu dan Tempat Penelitian

4.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2020 hingga Maret 2020

4.2.2 Tempat Penelitian

1. Pemeliharaan hewan coba dan perlakuan pada hewan coba dilakukan di Laboratorium hewan coba FKIK Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Penggilingan daun kosambi dilakukan di Matera Medica Batu
3. Pembuatan ekstrak daun kosambi dilakukan di Laboratorium Fitokimia FKIK Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Pembuatan larutan ekstrak daun kosambi untuk sonde dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik FKIK Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Pembuatan hewan coba model fibrosis hepar dengan metode injeksi CCL4 secara intraperitoneal dilakukan di Laboratorium hewan coba FKIK Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

6. Pengambilan organ usus halus dilakukan di Laboratorium hewan coba FKIK Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
7. Pembuatan preparat histologi dan pewarnaan imunohistokimia *caspase-3* dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya
8. Analisa gambaran histopatologi usus halus dilakukan di Laboratorium Histologi FKIK Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

4.3. Populasi Penelitian

Penelitian ini menggunakan populasi tikus wistar putih dengan jenis kelamin jantan, usia 3 bulan dengan berat 100-200 gram yang berasal dari peternak hewan coba di Kabupaten Malang (*Wistar Farm Purnomo*).

4.4. Sampel Penelitian

Jumlah kelompok yang digunakan pada penelitian ini terdapat 5 kelompok dengan penjelasan masing-masing kelompok seperti dibawah ini:

1. Kontrol negatif (K-) : Tikus tidak diberi perlakuan (tikus normal)
2. Kontrol positif (K+) : Tikus yang diinjeksi CCL4 Intraperitoneal dosis 0,5 ml/KgBB 2 x seminggu selama 6 minggu
3. Perlakuan 1 (P1) : Tikus diinjeksi CCL4 Intraperitoneal dosis 0,5 ml/KgBB 2 x seminggu selama 6 minggu, diberi ekstrak daun kosambi dengan dosis 200 mg/ kgBB (0,2 mg/grBB) setiap hari selama 6 minggu.
4. Perlakuan 2 (P2) : Tikus diinjeksi CCL4 Intraperitoneal dosis 0,5 ml/KgBB 2 x seminggu selama 6 minggu, diberi ekstrak daun kosambi dengan dosis 400 mg/KgBB (0,4 mg/grBB) setiap hari selama 6 minggu.

5. Perlakuan 3 (P3) : Tikus diinjeksi CCL4 Intraperitoneal dosis 0,4 ml/KgBB 2 x seminggu selama 6 minggu, diberi ekstrak daun kosambi dengan dosis 600 mg/KgBB (0,6/grBB) setiap hari selama 6 minggu.

Jumlah sampel per masing-masing kelompok dilakukan perhitungan ulang dengan rumus Federer :

$$(n - 1) \times (t - 1) \geq 15$$

Keterangan :

n = Besar sampel tiap kelompok

t = Banyaknya kelompok

Jumlah hewan coba perkelompok dihitung sebagai berikut:

$$(n-1) (t-1) \geq 15$$

$$(n-1) (5-1) \geq 15$$

$$(n-1) (4) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \approx 5$$

Sehingga setiap kelompok digunakan 5 ekor dan total hewan coba yang digunakan adalah 25 ekor tikus.

4.5. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.5.1. Kriteria Inklusi

1. Tikus putih jantan wistar berwarna putih.
2. Sehat (gerak aktif, rambut tidak kusam, tidak rontok atau botak).
3. Memiliki berat 100-200 gram.

4. Berusia sekitar 3 bulan.

4.5.2. Kriteria Eksklusi

1. Tikus mati atau sakit selama penelitian.
2. Sakit selama aklimatisasi

4.6. Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah:

a. Pemeliharaan hewan coba

Kandang tikus, tutup kandang, tempat pakan dan minum.

b. Pembuatan ekstrak daun kosambi

Oven, mesin penggiling, *beaker glass*, batang pengaduk, tabung *erlenmeyer*, corong, kaca arloji, sendok tanduk, cawan porselen, *rotatory vacuum evaporator*, *ultrasonic cleaner*, oven, neraca analitik.

c. Pemberian ekstrak daun kosambi

Sonde lambung, spuit 3 ml, kain penutup.

d. Pembuatan tikus model fibrosis hepar dengan metode injeksi CCL4 intraperitoneal

Blue tip, *yellow tip*, *micropipet*, tabung Eppendorf, *laminar airflow*, spuit 1 ml, milipore, sarung tangan.

e. Pembedahan tikus dan preparasi sampel organ hepar

Gunting bedah, scalpel dan blade, papan pembedahan, jarum pentul, cawan petri, masker, sarung tangan, toples organ.

f. Pembuatan preparat histologi

Tissue cassette, beaker glass, mikrotom, Poly-L-Lysine slides, deckglass, mikro pipet 10 µl, mikro pipet 100 µl, mikro pipet 1000 µl, mikro tube, timer, tempat pewarnaan, freezer.

g. Analisa preparat histologi

Mikroskop *Nikon Eclipse E200, program Fiji (ImageJ)*

4.6.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah:

a. Pemeliharaan hewan coba

Tikus wistar jantan, sekam, pakan tikus (BR-1), jagung, dan air

b. Pembuatan ekstrak daun kosambi

Daun kosambi, simplisia daun kosambi, metanol, air, aluminium foil, kertas saring.

c. Pembuatan larutan ekstrak daun kosambi untuk sonde

Na-CMC 0,5%, aquades, larutan ekstrak daun kosambi

d. Pembuatan tikus model fibrosis hepar dengan metode injeksi CCL4 secara intraperitoneal

CCL4 merk Merck 1.02222.2500, olive oil merk Pietro Coricelli, alkohol 70%.

e. Pengambilan organ usus halus

Formalin 10%, larutan NaCl.

f. Pembuatan preparat histologi

Alkohol absolut 100%, 95%, Xylol, Parafin, Aquadest, PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 7,2 - 7,4, Antibodi primer, Streptavidin, Substrat enzim peroksidase : DAB, Hematoxylin, Kapas/tissue

4.7. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

4.7.1. Identifikasi Variabel

1. Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak daun kosambi.

2. Variabel Terikat (*Dependent Variable*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah ekspresi *caspase-3* pada gambaran histopatologi usus halus tikus.

3. Variabel Kontrol (*Control Variable*)

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah jenis makanan, minuman, sekam, dan kondisi kandang.

4.7.2. Definisi Operasional

1. Tikus model fibrosis hepar adalah tikus wistar jantan yang diinjeksi CCL4 secara intraperitoneal dosis 0,5 ml/KgBB 2 x seminggu selama 6 minggu (Ma, et al., 2017).
2. CCL4 yang digunakan adalah *Carbon tetrachloride* merek Merck 1.02222.2500, yang berbentuk cair dan dilarutkan dalam olive oil sebelum diinjeksikan ke tikus.
3. Daun kosambi adalah daun yang di dapat hasil memetik di lingkungan Universitas Brawijaya dan telah di determinasi di Materia Medica Batu
4. Ekstrak daun kosambi yang digunakan adalah hasil penggilingan daun kosambi sehingga menjadi simplisia di Materia Medica Batu dan selanjutnya di ekstrak dengan metanol di Laboratorium fitokimia Farmasi FKIK UIN Malang.

5. Gambaran histopatologi ekspresi caspase 3 adalah sel epitel mukosa usus halus yang terwarnai coklat oleh marker imunohistokimia pada saat pengamatan dengan mikroskop dengan perbesaran 400x dalam 10 lapang pandang .

4.8. Prosedur Penelitian

4.8.1. Persiapan Hewan Coba

Jumlah hewan coba yang digunakan pada penelitian ini 25 ekor yang dibagi dalam 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor. Hewan coba diberi identitas yang ditempatkan didalam kandang yang berbeda, dengan 1 kandang diisi 5 tikus. Suhu lingkungan pemeliharaan 25°C. Hewan coba diberi makan pelet dengan merk BR-1, jagung dan air. Hari pertama hewan coba datang, dilakukan aklimatisasi selama 7 hari. Setelah dilakukan aklimatisasi, hewan coba diinjeksi CCL4 selama 6 minggu untuk membuat hewan coba menjadi fibrosis hepar (Ma, et al., 2017). Berat badan tikus ditimbang setiap hari dengan menggunakan timbangan. Hewan coba diberi makan dan minum ad libitum.

4.8.2. Pembuatan Ekstrak Daun Kosambi

Daun kosambi yang telah dipetik dikeringkan terlebih dahulu. Setelah daun kering lalu di giling menggunakan mesin. Setelah menjadi serbuk halus (simplisia), lalu diekstraksi dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*). Ekstraksi ultrasonik adalah ekstraksi dengan melalui perambatan energi gelombang ultrasonik dengan memakai cairan untuk media perambatan yang dapat menaikkan intensitas dari perpindahan energi.

Ekstraksi pada daun kosambi dilakukan dengan cara ekstraksi ultrasonik dengan pelarut methanol dengan waktu sekitar 3 jam. 1 gram simplisia daun

kosambi dimasukkan ke dalam erlenmeyer, lalu ditambahkan pelarut methanol sebanyak 10 ml dengan perbandingan simplisia : pelarut = 1 : 10. Selanjutnya dimasukkan ke dalam alat ekstraksi ultrasonic (UAE) dengan memakai frekuensi 42 kHz dengan suhu kamar selama 10-30 menit. Setelah selesai, hasil ekstraksi disaring menggunakan kertas saring. Hasil yang didapat adalah ekstrak kasar senyawa flavonoid.

Selanjutnya hasil ekstrak tadi dialiri dengan gas nitrogen, sehingga dapat diperoleh ekstrak yang pekat.

4.8.3. Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Kosambi untuk Sonde

a. Pembuatan Stok Sediaan Larutan Na-CMC 0,5%

Stok larutan Na-CMC dibuat dengan memasukkan 50 mg Na CMC ke dalam 10 ml aquades, setelah itu diaduk sampai homogen, lalu dipanaskan kurang lebih 15 menit sampai warnanya menjadi bening dan bentuknya mirip seperti gel. Setelah itu diencerkan dalam gelas beker dengan aquades sampai volumenya mencapai 100 ml.

Dalam penelitian ini dibutuhkan total larutan sekitar 1.200 ml dilakukan pembulatan menjadi 1500 ml, sehingga dibutuhkan Na-CMC sebanyak 750 mg. Caranya yaitu dengan memasukkan 500 mg Na-CMC ke dalam 100 ml aquades, lalu aduk dan panaskan hingga menyerupai gel. Lalu tambahkan aquades hingga volume nya 1000 ml. Kemudian mencampurkan 250 mg Na-CMC ke dalam 50 ml aquades, lalu aduk dan panaskan hingga menyerupai gel. Lalu tambahkan aquades hingga volume nya 500 ml.

b. Dosis Ekstrak Perkelompok Perlakuan Perhari

Dosis 1: $200 \text{ mg/KgBB} = 0,2 \text{ g/KgBB} \times 0,2 \text{ Kg} = 0,04 \text{ g}$

Dosis 2: $400 \text{ mg/KgBB} = 0,4 \text{ g/KgBB} \times 0,2 \text{ Kg} = 0,08 \text{ g}$

Dosis 3: $600 \text{ mg/KgBB} = 0,6 \text{ g/KgBB} \times 0,2 \text{ Kg} = 0,12 \text{ g}$

(Santha , Kanchana, & Shakeela, 2017)

c. Stok Ekstrak Perkelompok Perlakuan

Dosis 1: $0,04 \text{ g} \times 7 \text{ hari} = 0,28 \text{ g} \times 6 \text{ minggu} = 1,68 \text{ g}$

Dosis 2: $0,08 \text{ g} \times 7 \text{ hari} = 0,56 \text{ g} \times 6 \text{ minggu} = 3,36 \text{ g}$

Dosis 3: $0,12 \text{ g} \times 7 \text{ hari} = 0,84 \text{ g} \times 6 \text{ minggu} = 5,04 \text{ g}$

Larutan ekstrak daun kosambi untuk sonde dibuat setiap 7 hari sekali untuk mencegah kontaminasi mikroorganisme pada ekstrak

d. Volume Na CMC 0,5% Larutan Sonde Perkelompok

Dosis 1: $0,04 \text{ g} + k \text{ ml} = 1 \text{ ml} \rightarrow k \text{ ml} = 1 \text{ ml} - 0,04 \text{ gr} \rightarrow k \text{ ml} = 9,96 \text{ ml}$

Dosis 2: $0,08 \text{ g} + k \text{ ml} = 1 \text{ ml} \rightarrow k \text{ ml} = 1 \text{ ml} - 0,08 \text{ gr} \rightarrow k \text{ ml} = 9,92 \text{ ml}$

Dosis 3: $0,12 \text{ g} + k \text{ ml} = 1 \text{ ml} \rightarrow k \text{ ml} = 1 \text{ ml} - 0,12 \text{ gr} \rightarrow k \text{ ml} = 9,88 \text{ ml}$

Total volume Na CMC yang dibutuhkan untuk satu kali perlakuan = $9,96 \text{ ml} + 9,92 \text{ ml} + 9,88 \text{ ml} = 29,76 \text{ ml}$

Total volume Na CMC yang dibutuhkan selama penelitian = $29,76 \text{ ml} \times 7 \text{ hari} = 208,$

$32 \text{ ml} \times 6 \text{ minggu} = 1.249,92 \text{ ml}$

4.8.4. Pembuatan Hewan Coba Model Fibrosis Hepar dengan Metode Injeksi CCL4 Secara Intraperitoneal

1. Pembuatan stok CCL4 (*Carbon tetrachloride*)

Satu ekor tikus membutuhkan $0,5 \text{ ml/KgBB}$ atau $0,5 \mu\text{l/grBB}$ CCL4

Maka dari itu di dapat:

$$\begin{aligned} \text{Kebutuhan CCL4 per tikus} &= \text{Berat tikus} \times 0,5 \mu\text{l/grBB} \\ &= 170 \text{ gram} \times 0,5 \mu\text{l/grBB} \\ &= 85 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Kemudian CCL4 dicampur dengan olive oil sebagai pelarutnya dengan perbandingan 1 : 4

Maka dari itu = 85 μ l CCL4 : 340 μ l olive oil

Dosis untuk 25 ekor tikus = (85x25) : (340:25)

= 2.125 μ l CCL4 : 8.500 μ l olive oil

Dosis untuk 6 minggu perlakuan (seminggu 2 kali injeksi) = 12 kali injeksi

= (2.125x12) : (8.500x12)

= 25.500 μ l CCL4 : 102.000 μ l olive oil

= 25,5 ml CCL4 : 102 ml olive oil

2. Dosis injeksi

Dari stok campuran CCL4 dan olive oil yang telah dibuat, diambil 0,3 ml ke dalam spuit untuk diinjeksikan pada tikus secara intraperitoneal.

3. Injeksi CCL4

Tikus diletakkan diatas tutup kandang berupa kawat, lalu setelah tikus diam dan gerakan pasif, dipegang bagian punggung tikus menggunakan tangan kiri peneliti. Bagian leher kepala dan punggung dijepit dengan ibu jari dan jari telunjuk sehingga kepala menengadah keatas. Jari yang lainnya menjepit kaki dan ekor tikus sehingga tikus diam. Bersihkan daerah yang akan diinjeksi menggunakan kapas beralkohol. CCL4 diambil menggunakan spuit 1 ml sebanyak 0,3 ml lalu diinjeksi secara intraperitoneal. Setelah itu letakkan kembali tikus kedalam kandang.

4.8.5. Pengambilan Organ Usus

Setelah pemberian ekstrak daun kosambi secara sonde selama 6 minggu, hewan coba dikorbankan dengan cara dislokasi servikal. Hewan coba dibedah dengan menggunakan pisau bedah, dan cavum abdomen dibuka. Organ usus halus diambil dari cavum abdomen. Organ usus halus dicuci dengan larutan NaCl. Setelah itu dimasukkan kedalam toples organ yang sudah diberi formalin 10%. Kemudian dilakukan pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan imunohistokimia.

4.8.6. Pewarnaan imunohistokimia

Pada penelitian ini proses pewarnaan imunohistokimia mengacu pada protokol pewarnaan IHK -*Histofine* (2005). Pada proses pewarnaan preparat imunohistokimia, jaringan pada blok parafin akan dilakukan pemotongan dengan mikrotom dengan ketebalan 4 mikron. Diletakkan pada slides poly-L-lysine selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 malam (agar lebih merekat pada slides). Kemudian dilakukan deparafinisasi dengan direndam pada xylol sebanyak dua kali. Selanjutnya direndam pada alkohol absolut, alkohol 100%, alkohol 95% masing-masing dua kali. Lalu terakhir dicuci dengan larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Selanjutnya preparat ditetesi dengan antibodi primer sebanyak 2 tetes diinkubasi dalam suhu ruangan. Lalu cuci dengan PBS selama 3 X 5 menit. Setelah itu, preparat ditetesi lagi dengan antibodi sekunder sebanyak 2 tetes selama 30 menit dalam suhu ruangan. Preparat dicuci lagi dengan PBS selama 3 X 5 menit. Lalu tetesi dengan bloking serum selama 5-10 menit. Cuci dengan PBS selama 3 X 5 menit. Tetesi dengan streptavidin peroxidase selama 10 menit. Cuci dengan PBS selama 3 X 5 menit. Pemberian substrat enzim peroksidase : DAB selama 3-5 menit. Cuci dengan air mengalir selama 10 menit. Tetesi dengan hematoxylin selama 4

menit. Cuci dengan air mengalir selama 10 menit. Mounting, tutup dengan deckglass.

4.9. Analisis Data

4.9.1. Perhitungan Ekspresi *Caspase-3*

Ekspresi enzim caspase 3 pada sel epitel dihitung pada lapisan mukosa dari sediaan preparat usus halus dengan pewarnaan imunohistokimia, dengan pembesaran 400 kali, pada 10 lapangan pandang dari tiap preparat. Preparat diamati dengan menggunakan mikroskop. Selanjutnya hasil pengamatan akan di hitung jumlah sel epitel yang mengekspresikan *caspase-3* dengan menggunakan program Fiji (ImageJ).

4.9.2. Analisis Data di SPSS

1. Uji Normalitas

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui apakah data yang didapat terdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas ini menggunakan uji *Shapiro Wilk*. Data normal jika didapatkan $p > 0,05$.

2. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui apakah data yang didapat homogen atau tidak. Uji ini dilakukan sebagai syarat dalam analisis ANOVA. Uji homogenitas ini menggunakan uji Levene. Data homogen jika didapatkan $p > 0,05$.

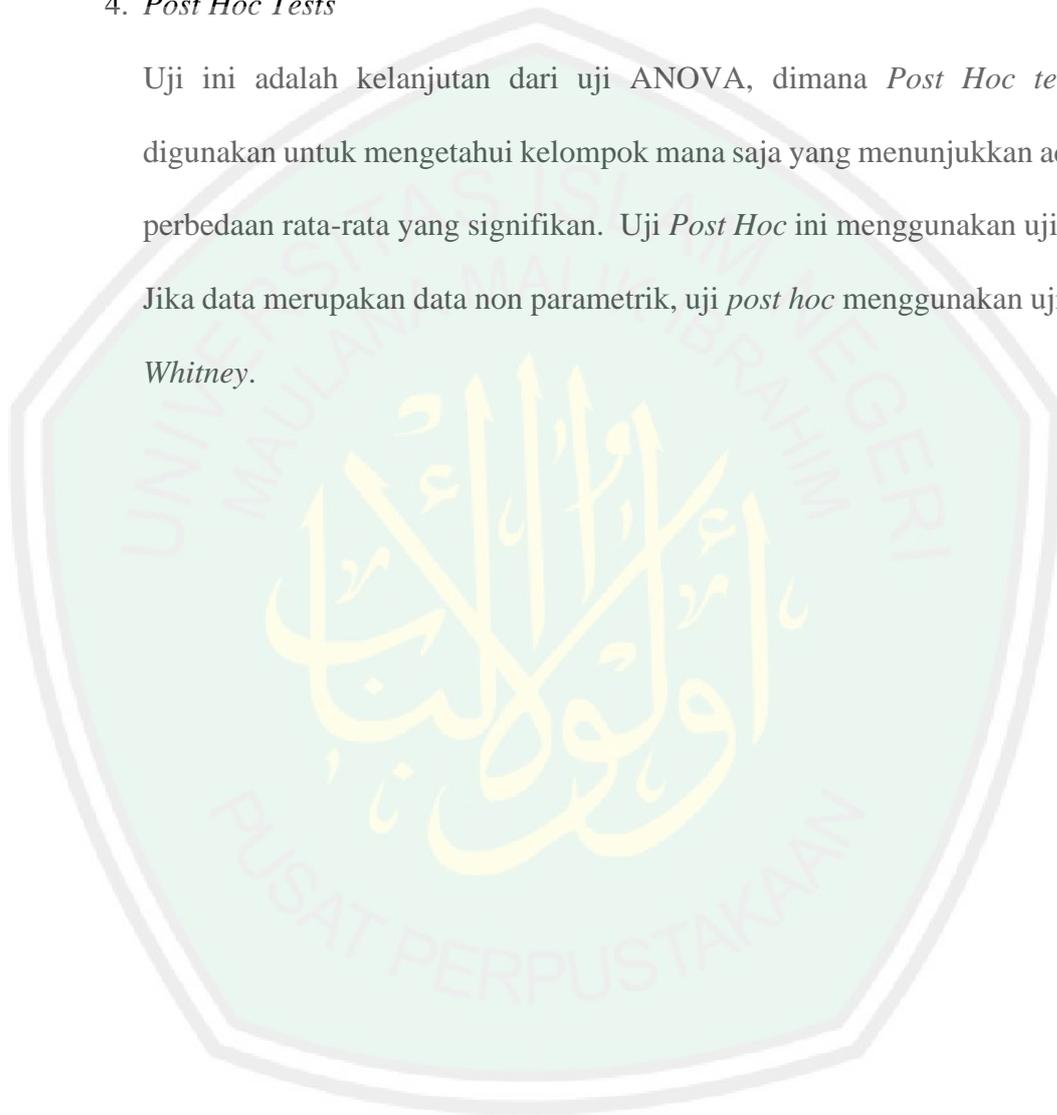
3. Uji ANOVA (*Analysis of variance*)

Untuk analisa komparatif antara variabel bebas dengan variabel tergantung dapat dilakukan uji *one way* ANOVA (jika syarat analisis parametrik terpenuhi) atau Uji *KruskalWallis* (jika syarat analisis parametrik tidak

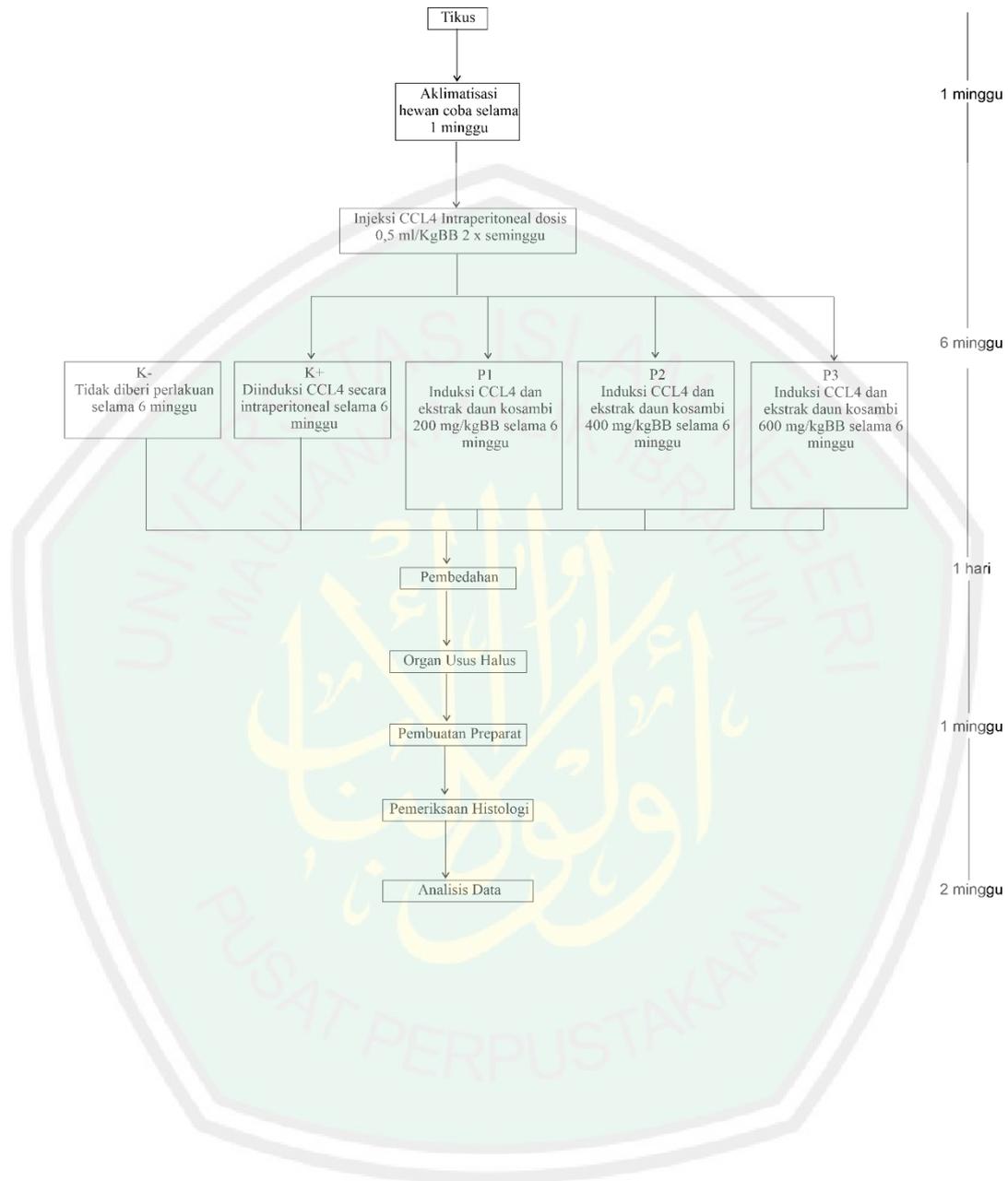
terpenuhi). Dan jika hasil dari uji one way ANOVA atau Uji *Kruskal-Wallis* didapatkan hasil $p < 0,05$ maka untuk mengetahui besarnya perbedaan masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan *Post Hoc Test*.

4. *Post Hoc Tests*

Uji ini adalah kelanjutan dari uji ANOVA, dimana *Post Hoc test* ini digunakan untuk mengetahui kelompok mana saja yang menunjukkan adanya perbedaan rata-rata yang signifikan. Uji *Post Hoc* ini menggunakan uji *LSD*. Jika data merupakan data non parametrik, uji *post hoc* menggunakan uji *Man Whitney*.



4.10. Alur Penelitian



BAB V

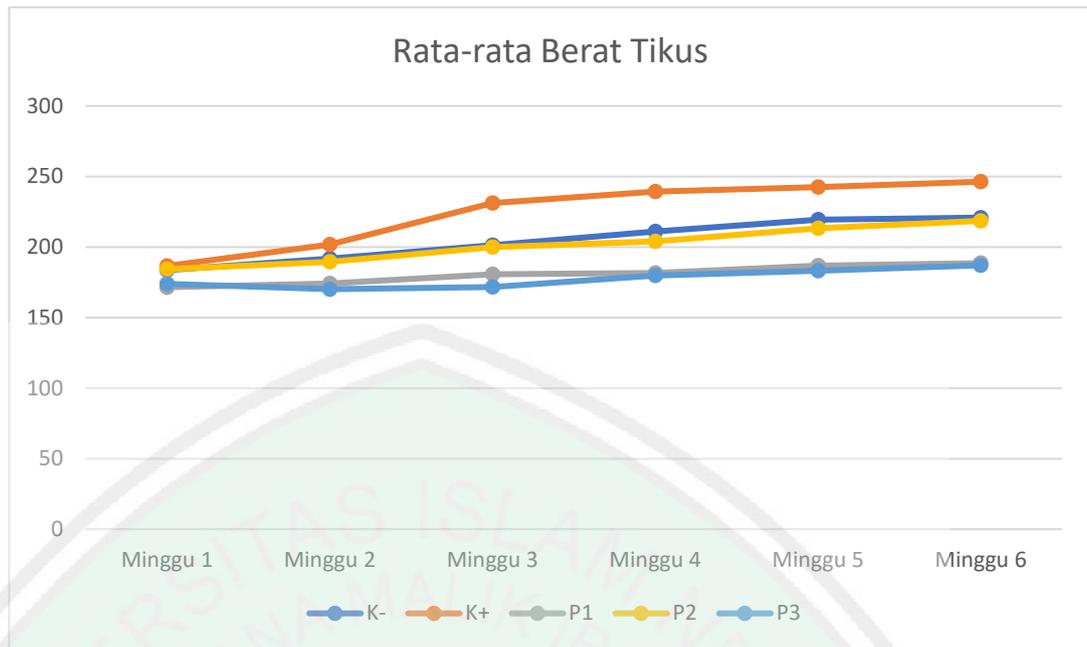
HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan metode *post test only control group design* yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kosambi (*Schleichera Oleosa*) terhadap jumlah sel epitel yang mengekspresikan *caspase-3*. Sampel yang digunakan dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi yang terbagi dalam 5 kelompok, masing-masing terdiri dari 5 sampel tikus wistar. Data yang didapatkan selanjutnya akan dianalisis dengan uji normalitas dan uji homogenitas terlebih dahulu. Uji normalitas yang digunakan adalah uji Saphiro-Wilk dan uji homogenitas yang digunakan adalah uji Levene. Selanjutnya data dianalisis dengan uji *One-Way ANOVA* untuk melihat pengaruh pemberian ekstrak daun kosambi. Jika didapatkan hasil yang signifikan ($p < 0,05$) data selanjutnya diolah uji *Post Hoc* LSD dengan ($p < 0,05$)

5.1.1. Berat tikus selama perlakuan

Hewan coba (tikus wistar jantan) yang digunakan pada penelitian ini sebelumnya telah dikelompokkan dan dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu. Selanjutnya selama 6 minggu kelompok hewan coba K+, P1, P2, P3 diinjeksikan CCL4 melalui intraperitoneal dan ditimbang setiap harinya. Pada gambar 5.1 didapatkan data rata-rata berat tikus mengalami peningkatan yang stabil selama 6 minggu. Pada kelompok P3 didapatkan penurunan berat badan sedikit pada minggu ke 2. Namun meningkat lagi pada minggu ke 3 dan minggu-minggu berikutnya.



Gambar 5.1 Grafik Rata-rata Berat tikus selama perlakuan

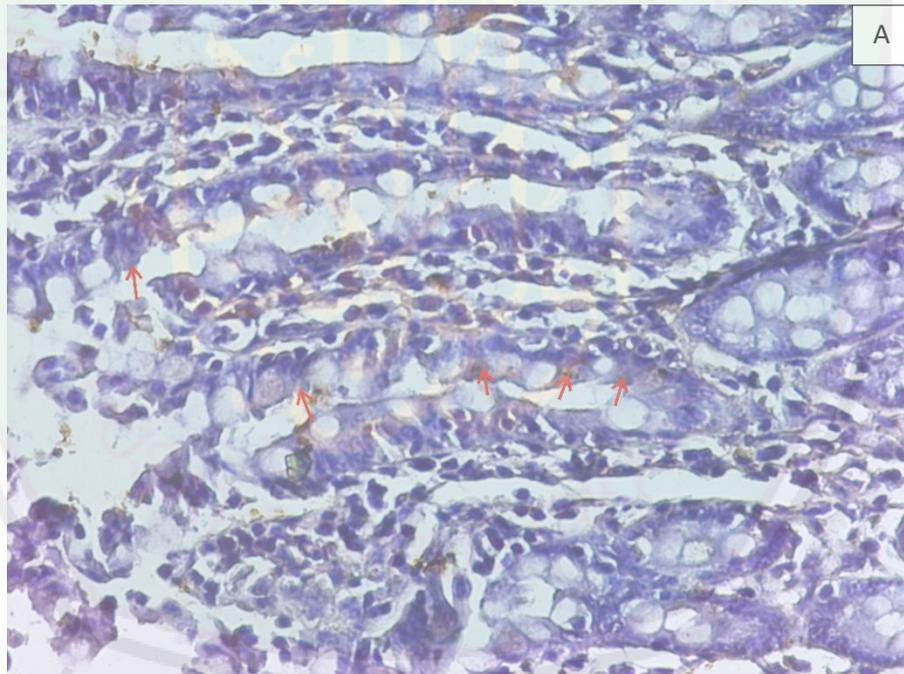
5.1.2. Gambaran histopatologi *caspase-3* pada sel epitel mukosa usus halus tikus model fibrosis hepar

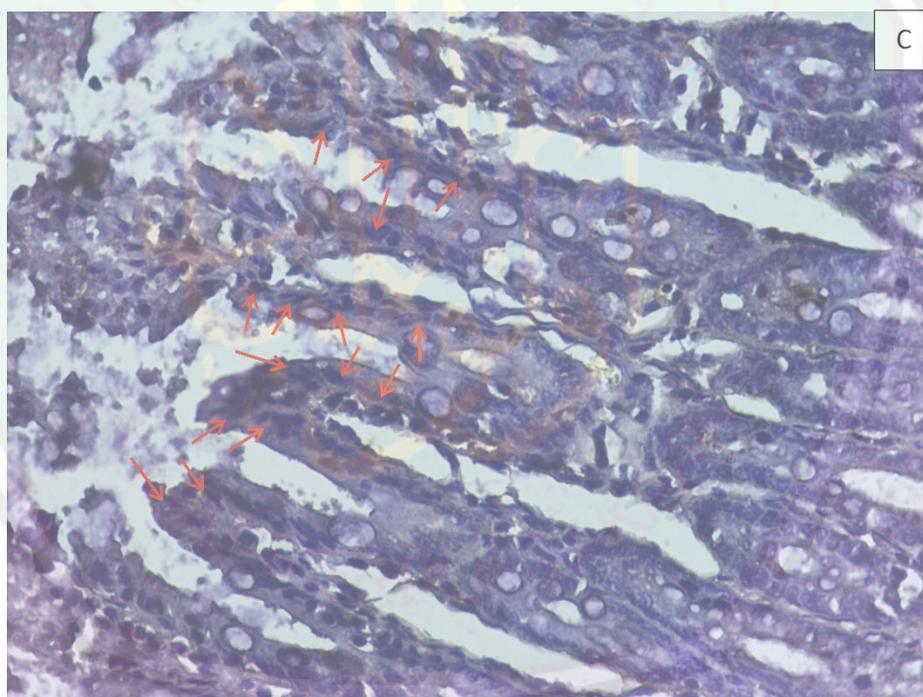
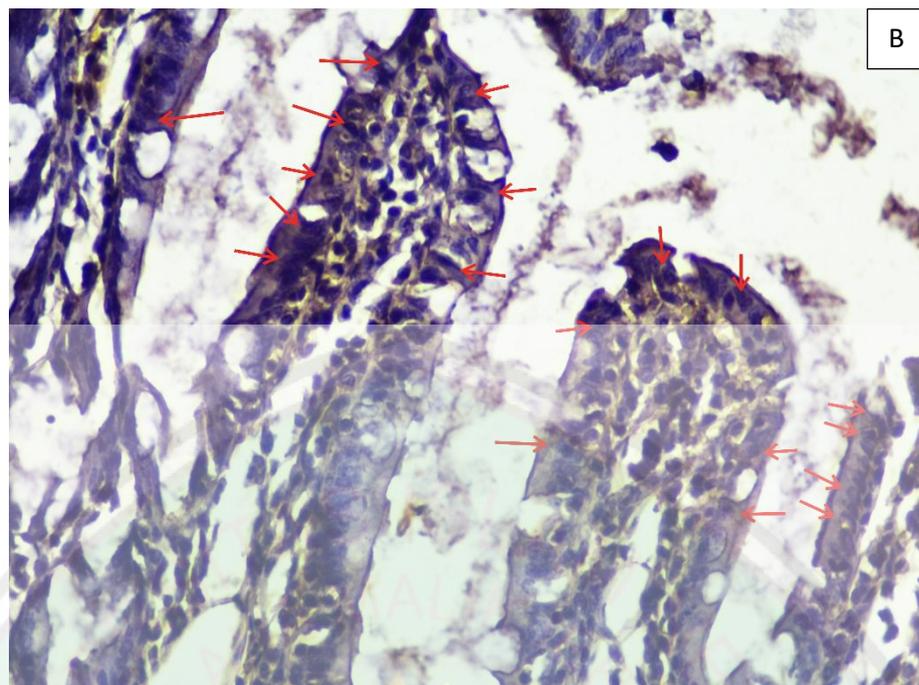
Pada penelitian ini pewarnaan imunohistokimia pada preparat sediaan usus halus menggunakan antibodi *caspase-3*. Sel pada preparat akan terwarnai coklat jika terdapat protein *caspase-3* pada sitoplasma sel epitel mukosa usus halus. Pada penelitian ini digunakan 2 antibodi yakni antibodi primer dan antibodi sekunder. Antibodi primer yakni antibodi yang berikatan dengan protein *caspase-3*. Sedangkan antibodi sekunder merupakan senyawa yang mewarnai antibodi primer agar dapat dilihat saat dilakukan pengamatan dengan mikroskop.

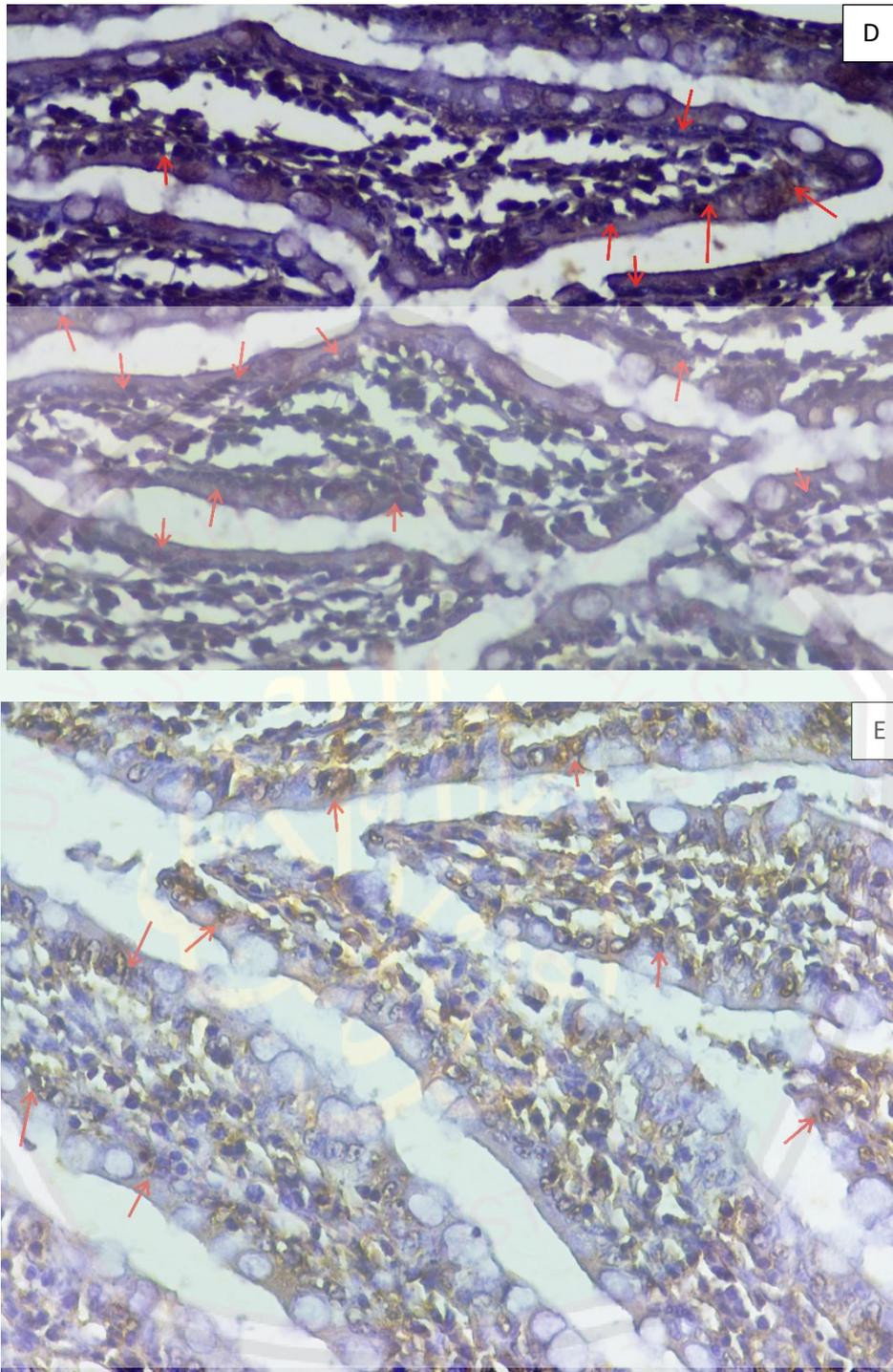
Berdasarkan hasil pengamatan sel yang terwarnai coklat ditemukan pada seluruh kelompok, baik kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol. Ekspresi *caspase-3* diukur dengan cara menghitung sel epitel yang terwarnai oleh antibodi *caspase-3*. Ekspresi *caspase-3* pada sel menunjukkan adanya aktivitas apoptosis

yang dimulai akibat stimulasi baik dari dalam ataupun luar sel (jalur intrinsik dan jalur ekstrinsik) (Ma, Ding, Zhang, & Liu, 2014).

Berdasarkan hasil pengamatan, didapatkan gambaran sel epitel berbentuk silindris dengan inti berwarna biru tua dan memiliki *brush border*. Pada hasil pengamatan, sel epitel yang tidak mengekspresikan *caspase-3* memiliki sitoplasma berwarna biru keunguan. Ekspresi *caspase-3* pada sel epitel ditunjukkan dengan adanya warna coklat pada sitoplasma sel epitel. Pada preparat usus halus ini sel goblet akan terwarnai biru keunguan seperti sel epitel yang tidak mengekspresikan *caspase-3*. Pada hasil pengamatan juga terlihat lapisan lamina propria yang berada tepat dibawah sel epitel silindris.







Gambar 5.2 Gambaran Histopatologi sel mukosa epitel usus halus dengan pewarnaan pewarnaan imunohistokimia *caspase-3* pada perbesaran 400x.

Keterangan: Gambar (A) kelompok K-; Gambar (B) kelompok K+; Gambar (C) P1 (dosis 200mg/KgBB); Gambar (D) P2 (dosis 400mg/KgBB; Gambar (E) P3 (dosis 600mg/KgBB). Panah merah menunjukkan ekspresi *caspase-3*. Terlihat sel epitel dengan inti berwarna biru tua dan sitoplasma berwarna biru keunguan. Gambaran coklat pada sitoplasma sel menandakan adanya protein *caspase-3* pada sitoplasma.

Pengamatan ekspresi *caspase-3* pada sel epitel lapisan mukosa usus halus menggunakan program Fiji (ImageJ) untuk menghitung jumlah sel yang mengekspresikan *caspase-3*.

5.1.3. Hasil analisis data dengan SPSS

Data dikumpulkan dan diolah dengan menggunakan program IBM SPSS versi 26.0 dan dinyatakan dalam rerata \pm simpang baku (mean \pm SD). Kemudian dilakukan uji beda jumlah sel epitel yang mengekspresikan *caspase-3* antar kelompok dengan menggunakan uji *One-Way ANOVA*. Dengan batas derajat kemaknaan $p < 0,05$ dengan 95% interval kepercayaan dan penyajian dalam bentuk tabel. Hasil uji *One-Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol, yang dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* ($p < 0,05$).

5.1.2.1. Analisa deskriptif pengaruh pemberian ekstrak daun kosambi terhadap ekspresi *caspase 3*

Berdasarkan analisa deskriptif didapatkan rata-rata jumlah sel epitel mukosa usus halus yang mengekspresikan *caspase-3* adalah sebagai berikut:

Tabel 5.1 Rata-rata Jumlah Sel Epitel Yang Mengekspresikan *Caspase-3*

Kelompok	Rata-rata \pm SD
K-	100 \pm 11,498 ^a
K+	413 \pm 77,748 ^b
P1	181 \pm 65,253 ^c
P2	208 \pm 62,319 ^c
P3	143 \pm 66,077 ^{ac}

5.1.2.2. Uji normalitas pengaruh pemberian ekstrak daun kosambi terhadap ekspresi *caspase-3*

Sebagai syarat penggunaan uji parametrik maka data penelitian harus memenuhi asumsi normalitas. Hasil pengujian dengan uji *Saphiro Wilk* dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas *Saphiro Wilk*

Kelompok	Uji <i>Saphiro Wilk</i> ($p>0,05$)	Keterangan
K-	0,663	Normal
K+	0,615	Normal
P1	0,322	Normal
P2	0,630	Normal
P3	0,066	Normal

Dari hasil pengujian dengan uji *Saphiro Wilk* diketahui bahwa pada semua kelompok perlakuan diperoleh nilai signifikansi $p>0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa data memenuhi asumsi normalitas.

5.1.2.3. Uji homogenitas pengaruh pemberian ekstrak daun kosambi terhadap ekspresi *caspase-3*

Hasil pengujian dengan uji *Levene* dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 5.3 Hasil Uji Homogenitas *Levene*

Variabel	Uji <i>Levene</i> ($p<0,05$)	Keterangan
Jumlah Sel Epitel yang mengekspresikan <i>caspase-3</i>	0,051	Homogen

Dari hasil pengujian homogenitas diketahui bahwa ragam sebaran data homogen yang ditunjukkan dengan nilai signifikansi $p = 0,051$ ($p>0,05$).

5.1.2.4. Uji *One-Way* ANOVA pengaruh pemberian ekstrak daun kosambi terhadap ekspresi *caspase-3*

Uji *One Way* ANOVA digunakan untuk mengetahui perbedaan ekspresi *caspase-3* antar kelompok penelitian sebagai berikut:

Tabel 5.4 Hasil Uji *One Way* ANOVA

Kelompok	Rata-Rata	Uji <i>One-Way</i> ANOVA
K-	100	0,000
K+	413	
P1	181	
gP2	208	
P3	143	

Hasil uji *One Way* ANOVA menunjukkan terdapat perbedaan antar kelompok perlakuan akibat pemberian ekstrak daun kosambi terhadap ekspresi *caspase-3* pada sel epitel mukosa usus halus setelah paparan CCL4 dengan nilai signifikan $p=0,000$ ($p<0,05$).

5.1.2.5. Uji *Post Hoc* LSD pengaruh pemberian ekstrak daun kosambi terhadap ekspresi *caspase-3*

Dari hasil uji *One Way* ANOVA diperoleh perbedaan/pengaruh yang signifikan, maka untuk mengetahui perbandingan antar kelompok maka akan dilanjutkan dengan *Post Hoc* LSD dengan hasil sebagai berikut:

Tabel 5.5 Hasil Uji *Post Hoc* LSD

Kelompok Perbandingan	Perbedaan Rata-rata	Sig.	Keterangan
K- dengan K+	-313,200	0,000	Signifikan
K- dengan P1	-80,800	0,050	Signifikan
K- dengan P2	-108,000	0,011	Signifikan
K- dengan P3	-43,000	0,279	Tidak Signifikan
K+ dengan P1	232,400	0,000	Signifikan
K+ dengan P2	205,200	0,000	Signifikan
K+ dengan P3	270,200	0,000	Signifikan
P1 dengan P2	-27,200	0,490	Tidak Signifikan

P1 dengan P3	37,800	0,340	Tidak Signifikan
P2 dengan P3	65,000	0,108	Tidak Signifikan

Hasil uji *Post Hoc LSD* didapatkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok K- dengan kelompok K+, P1 dan P2. Namun, didapatkan perbedaan yang tidak signifikan antar K- dengan P3. Berdasarkan hasil uji *Post Hoc* juga didapatkan perbedaan yang signifikan antara kelompok K+ dengan kelompok K-, P1, P2 dan P3. Data hasil uji *Post Hoc* juga menunjukkan terdapat perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok P1, P2 dan P3.

5.2. Pembahasan

5.2.1. Berat Tikus

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini tikus *rattus norvegicus* galur wistar. Hewan coba dikelompokkan menjadi 5 kelompok sesuai dengan kelompok perlakuan penelitian. Hewan coba dibagi dengan kelompoknya mulai dari aklimatisasi hingga lama perlakuan selesai. Hewan coba diberi pakan yang sama yakni pakan BR-1 dan ditambah jagung. Pemberian pakan jagung berfungsi sebagai tambahan nutrisi untuk tikus. Berdasarkan Permana (2010), pemberian jagung dapat menjadi pertimbangan sebagai nutrisi tambahan untuk menjaga stabilitas berat badan tikus. Pada penelitian ini tikus diinjeksikan CCL4 yang mampu merusak sel epitel pada mukosa usus halus. Kerusakan pada lapisan mukosa usus halus dapat menurunkan daya cerna yang dimiliki oleh tikus. Kandungan serat yang rendah pada jagung menyebabkan protein dan karbohidrat lebih mudah diserap oleh organ pencernaan (Arief, 2007).

Berdasarkan data penimbangan berat tikus selama 6 minggu didapatkan hasil rata-rata berat badan tikus pada masing-masing kelompok mengalami peningkatan yang stabil pada tiap minggunya. Hal ini mengindikasikan bahwa

pakan dan minum yang diberikan mampu memenuhi kebutuhan nutrisi tikus untuk bertahan selama 6 minggu masa perlakuan. Pada penelitian sebelumnya injeksi CCL4 pada peritoneum selama 8 minggu, menunjukkan terjadi penurunan berat badan pada tikus percobaan (Yeh, Hsieh, Lee, & Hsieh, 2011). Pada penelitian tersebut, CCL4 menyebabkan kerusakan pada sistem pencernaan, hepar dan ginjal. Stres akibat dari kerusakan organ tikus tersebut menyebabkan nafsu makan tikus menurun yang berdampak pada penurunan berat badan tikus. Selain stres akibat kerusakan pada organ tikus akibat injeksi CCL4, faktor-faktor seperti stress akibat perlakuan tampak tidak terlalu memberikan efek yang signifikan terhadap berat badan tikus. Menurut Balcombe (2004), perlakuan di laboratorium seperti pemberian sonde mulut dan injeksi pada hewan coba dapat menyebabkan stres pada hewan coba. Keadaan stres pada hewan coba dapat menyebabkan penurunan berat badan yang signifikan. Perlakuan di laboratorium yang tidak sesuai prosedur juga dapat menyebabkan kematian pada hewan coba.

Penambahan berat badan pada tikus diduga juga dipengaruhi oleh adanya pemberian ekstrak daun kosambi pada tikus. CCL4 yang diinjeksikan pada tikus dapat menginduksi apoptosis pada sel epitel mukosa usus halus karena proses metabolisme dari CCL4 yang dilakukan oleh sel epitel (Pergel, et al., 2019). Hasil akhir dari proses metabolisme CCL4 pada sel epitel adalah terbentuknya molekul OH yang merupakan salah satu ROS (Bhattacharya, 2015). ROS hasil metabolisme tadi akan menginduksi apoptosis sel melalui jalur intrinsik. Pemberian ekstrak daun kosambi pada tikus dapat meningkatkan kadar antioksidan dalam tubuh tikus. Peningkatan kadar antioksidan pada tubuh tikus dapat menetralkan ROS yang dihasilkan saat metabolisme CCL4. Aktivitas antioksidan dalam menetralkan ROS

hasil metabolisme CCL4 menurunkan kejadian apoptosis pada sel epitel mukosa usus halus.

Aktivitas antioksidan dalam menetralkan ROS hasil metabolisme CCL4 menurunkan kejadian apoptosis pada sel epitel mukosa usus halus. Hal ini menyebabkan sel epitel mukosa usus halus mampu mempertahankan kemampuan absorpsi nutrisi makanan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Gao, *et al*, (2012) berat badan tikus pada kelompok penelitian yang diinduksi CCL4 masih mengalami kenaikan. Hal ini mengindikasikan bahwa organ pencernaan tikus meskipun mendapatkan paparan CCL4 masih mampu untuk melakukan absorpsi makanan.

5.2.2. Pengaruh pemberian CCL4 pada usus halus tikus model fibrosis hepar

Pemberian CCL4 secara intraperitoneal dapat menyebabkan fibrosis pada hepar (Andrean, 2020). CCL4 yang diinjeksikan secara intraperitoneal akan masuk pada pembuluh darah dan dibawa ke hepar. CCL4 pada hepar akan menyebabkan kerusakan pada hepar yang nantinya akan dideteksi oleh sel kuppfer. Sel kuppfer selanjutnya akan mengaktivasi dari HSC yang nantinya akan menghasilkan matriks ekstraseluler. Pada lesi kronik yang terjadi secara terus menerus akan terjadi penumpukan matriks ekstraseluler pada jaringan hepar. Penumpukan matriks ekstraseluler pada jaringan hepar menyebabkan berkurangnya ruang untuk sel hepatosit yang artinya akan terjadi penurunan dari kemampuan dari hepar (Pinzani, 2015).

Berdasarkan data yang didapat fibrosis hepar terjadi pada kelompok K+, P1, dan P2 (Andrean, 2020). Kelompok K+ dan P1 didapatkan skor fibrosis METAVIR dengan skro rata-rata 2 yang mengindikasikan fibrosis pada trias porta dengan

septra yang jarang. Pada kelompok P2 didapatkan skor fibrosis METAVIR dengan skor rata-rata 1 yang mengindikasikan fibrosis pada trias porta tanpa ada septa. Namun pada kelompok P3 dan K- memiliki skor fibrosis METAVIR dengan skor rata-rata 0. Perbandingan skor fibrosis METAVIR antara kelompok K- dan K+ mengindikasikan terdapat pengaruh pemberian CCL4 secara intraperitoneal terhadap terjadi fibrosis hepar (Andrean, 2020).

Pada preparat imunohistokimia kelompok K- didapatkan rata-rata jumlah sel epitel yang mengekspresikan *caspase-3* paling sedikit dibandingkan dengan kelompok penelitian lain. Ekspresi *caspase-3* pada sel epitel lapisan mukosa usus halus kelompok K- merupakan peristiwa normal dimana proses apoptosis dan regenerasi terjadi secara terus menerus. Keseimbangan antara proses apoptosis dan regenerasi sel inilah yang menyebabkan pertahanan lapisan mukosa dapat mencegah masuknya bakteri (Okumura & Takeda, 2018). Apoptosis pada sel epitel mukosa usus halus biasanya disebabkan oleh keadaan inflamasi lokal akibat adanya patogen. Patogen akan dideteksi oleh sel makrofag yang ada di lapisan mukosa usus halus yang selanjutnya akan menimbulkan keadaan inflamasi lokal (Wang, Ye, Zeng, & Qiao, 2019). Sel epitel mukosa usus halus yang mengalami apoptosis akan digantikan dengan sel epitel yang baru yang diproduksi oleh ISC (*Intestinal Stem Cell*). ISC merupakan sel pluripotent yang memiliki daya proliferasi dan mampu berdiferensiasi menjadi sel-sel epitel pada mukosa usus halus (Perochon, Carroll, & Cordero, 2018).

Kelompok K+ memiliki rata-rata jumlah sel epitel yang mengekspresikan *caspase-3* paling banyak dibandingkan dengan seluruh kelompok penelitian lainnya. Pada kelompok K+ didapatkan rata-rata jumlah sel epitel yang

mengekspresikan *caspase-3* sebanyak kurang lebih 413 sel dalam sepuluh lapang pandang. Ekspresi *caspase-3* yang sangat tinggi utamanya dipengaruhi oleh adanya injeksi CCL4 secara intraperitoneal. CCL4 yang diinjeksikan akan menyebabkan stres oksidatif pada sel epitel yang mengakibatkan aktivasi apoptosis jalur intrinsik. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Pergel, *et al.*, (2019) bahwa kelompok K⁺ memiliki jumlah sel epitel mukosa usus halus yang mengekspresikan *caspase-3* lebih banyak dibandingkan dengan kelompok K⁻. Pada penelitian lain juga didapatkan kelompok K⁺ juga mengekspresikan protein seperti Bax (*Bcl2-associated X protein*) dan Fas yang merupakan protein proapoptosis yang berperan dalam aktivasi kaskade *caspase-3* (Ma, et al., 2017). Hasil rata-rata jumlah sel epitel yang mengekspresikan usus halus pada kelompok K⁻ dan K⁺ menunjukkan pemberian CCL4 pada tikus berpengaruh terhadap ekspresi *caspase-3* pada sel epitel mukosa usus halus.

5.2.3. Pengaruh pemberian ekstrak daun kosambi terhadap ekspresi *caspase-3* pada sel epitel mukosa usus halus tikus model fibrosis hepar

Caspase-3 merupakan protein yang berperan dalam mekanisme apoptosis sel baik dari jalur intrinsik maupun ekstrinsik (Ma, Ding, Zhang, & Liu, 2014). Hal ini disebabkan oleh adanya hasil metabolisme CCL4 yang dilakukan oleh sel epitel itu sendiri. CCL4 dimetabolisme oleh enzim sitokrom P450 yang dimiliki oleh sel epitel menjadi *trichloromethyl peroxyde* (CCL3O₂) yang merupakan *reactive oxygen species* (ROS) (Pergel, et al., 2019). ROS inilah yang dapat menginisiasi terjadinya kaskade apoptosis intrinsik sel. Pada keadaan normal apoptosis sel merupakan kejadian yang normal dan biasanya diimbangi dengan kemampuan

regenerasi sel. Keseimbangan antara apoptosis dan regenerasi sel epitel pada usus halus menjadi faktor penting untuk menjaga stabilitas barier mukosa.

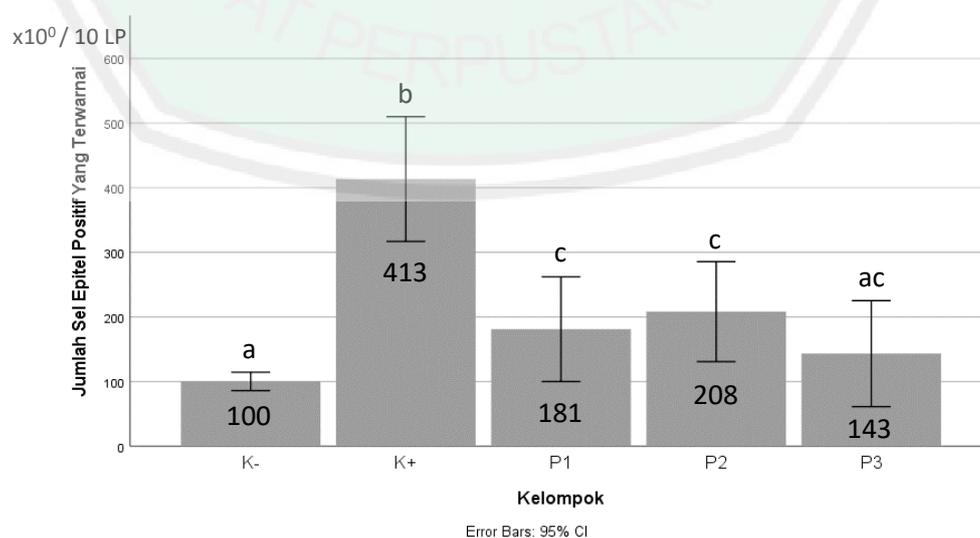
Aktivasi dari kaskade apoptosis jalur intrinsik sel dimulai pada aktivasi dari protein JNK oleh ROS. Protein JNK yang teraktivasi menyebabkan fosforilasi sitokrom p53 yang merupakan salah satu protein yang berperan dalam transkripsi gen DNA apoptosis. Sitokrom p53 selanjutnya akan menginduksi transkripsi dan translasi protein Bax (*Bcl2-associated X protein*) dan PUMA pada inti sel (Sinha, Das, Pal, & Sil, 2013). Protein Bax merupakan protein proapoptosis yang memiliki kemampuan untuk melubangi membran luar mitokondria (Ma, Ding, Zhang, & Liu, 2014). Protein PUMA memiliki kemampuan untuk menghambat transkripsi dan translasi Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) yang merupakan protein antiapoptosis (Sinha, Das, Pal, & Sil, 2013). ROS juga dapat masuk ke dalam ruang mitokondria dan menyebabkan pelepasan ikatan antara sitokrom c dengan cardiolipin (Sinha, Das, Pal, & Sil, 2013). Hal ini akan menyebabkan sitokrom c bebas di ruang intramembran. Ketika membran luar mitokondria rusak akibat protein Bax, sitokrom c yang bebas dalam ruang intramembran akan keluar menuju sitoplasma. Pada sitoplasma, sitokrom c akan berikatan dengan *apoptosis-activating-factor*. Ikatan antara sitokrom c dan *apoptosis-activating-factor* akan mengaktifkan kaskade caspase-9 dan *caspase-3*.

Kelompok K- memiliki rata-rata jumlah sel epitel yang mengekspresikan *caspase-3* sebanyak 100 sel. Penyebab munculnya ekspresi *caspase-3* pada sel epitel mukosa usus halus kelompok K- karena adanya proses apoptosis sel epitel yang normal terjadi. Ekspresi *caspase-3* pada kelompok K+ yang meningkat utamanya dipengaruhi akibat injeksi CCL4 secara intraperitoneal pada tikus. CCL4

yang diinjeksikan dapat menginduksi apoptosis sel epitel mukosa usus halus melalui apoptosis jalur intrinsik. Hasil jumlah sel epitel yang mengekspresikan caspase-3 pada kelompok K- dan K+ dapat dijadikan dasar perbandingan untuk melihat pengaruh pemberian ekstrak daun kosambi terhadap ekspresi caspase-3 akibat paparan CCL4.

Pada preparat imunohistokimia kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3) didapatkan hasil rata-rata jumlah sel epitel yang mengekspresikan *caspase-3* lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok K+. Hal ini menunjukkan terdapat pengaruh dari pemberian ekstrak daun kosambi. Ekstrak daun kosambi memiliki kandungan seperti flavonoid, saponin dan tanin yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Pemberian zat toksik CCL4 dapat menyebabkan keadaan stres oksidatif pada sel epitel yang nantinya akan menginduksi apoptosis jalur intrinsik. Pada kelompok P3 didapatkan rata-rata jumlah sel epitel yang positif terkecil. Hal ini menunjukkan kemampuan ekstrak daun kosambi pada dosis 600mg/KgBB mampu menurunkan *caspase-3* lebih baik dari pada dosis perlakuan 200mg/KgBB dan dosis perlakuan 400mg/KgBB.

Rata-rata Jumlah Sel Epitel Yang Mengekspresikan *Caspase-3*



Gambar 5.3 Diagram Hasil Analisis SPSS

Data hasil pengamatan selanjutnya akan diolah dengan menggunakan program IBM SPSS versi 26.0. Hasil uji tes normalitas dengan uji *Saphiro-Wilk* didapatkan seperti pada tabel 5.2. Berdasarkan hasil uji tes *Saphiro-Wilk* menunjukkan bahwa distribusi data normal ($p > 0,05$) dan selanjutnya data dilakukan uji Homogenitas. Hasil uji homogenitas dengan uji Levene didapatkan $p = 0,051$ (tabel 5.3). Hal ini menunjukkan bahwa data homogen ($p > 0,05$) yang artinya data termasuk dalam data parametrik dan dilanjutkan dengan uji olah data parametrik *One Way ANOVA*.

Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok penelitian. Artinya H_0 pada penelitian ini ditolak dan H_1 diterima. H_1 pada penelitian ini adalah Paparan ekstrak daun kosambi mampu menurunkan ekspresi caspase 3 pada lapisan mukosa usus halus yang lebih parah akibat paparan dari CCL4. Karena pada uji *One Way ANOVA* didapatkan hasil yang signifikan maka data dilanjutkan dengan uji Post Hoc.

Uji Post Hoc yang digunakan pada penelitian ini adalah uji Post Hoc LSD. Hasil uji Post Hoc LSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok K- dengan kelompok K+, P1 dan P2. Perbedaan yang signifikan juga ditemukan pada perkelompok K+ dengan K-, P1, P2, dan P3. Namun didapatkan perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok perlakuan dengan ekstrak daun kosambi yakni P1 dengan P2 dan P3, dan P2 dengan P3.

Perbedaan signifikan yang didapatkan antara kelompok K+ dengan kelompok perlakuan ($p < 0,05$) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun kosambi pada tikus yang diinjeksikan CCL4 dapat menurunkan ekspresi *caspase-3* pada sel epitel lapisan mukosa usus halus. Perbedaan yang signifikan terjadi pada

kelompok perlakuan dengan dosis 200mg/KgBB, dosis 400mg/KgBB, dan dosis 600mg/KgBB. Perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) juga ditemukan antara kelompok K- dengan kelompok P1 dan P2. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian dosis 200mg/Kg dan dosis 400mg/KgBB mampu menurunkan ekspresi *caspase-3* pada sel epitel mukosa usus halus namun belum dapat menurunkan hingga seperti keadaan normal. Namun ditemukan perbedaan yang tidak signifikan antara kelompok K- dengan P3. Hal ini menunjukkan bahwa dosis 600mg/KgBB mampu menurunkan ekspresi *caspase-3* secara optimal hingga seperti pada keadaan normal. Efek dosis ekstrak daun kosambi 200mg/KgBB dan 400mg/KgBB yang tidak sebaik dosis 600mg/KgBB kemungkinan disebabkan karena perbedaan jumlah metabolit sekunder pada dosis yang lebih rendah kadarnya lebih sedikit dibandingkan dengan dosis yang lebih tinggi. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya, yakni ekstrak daun kosambi pada dosis yang lebih tinggi mampu mencegah kerusakan akibat stres oksidatif lebih baik dibandingkan dosis yang lebih rendah (Goswami & Singh, 2017). Sehingga dapat ditarik sebuah kesimpulan bahwa pemberian ekstrak daun kosambi dengan dosis 600mg/KgBB lebih efektif menurunkan ekspresi *caspase-3* dibandingkan dengan dosis pemberian 200mg/KgBB dan dosis 400mg/KgBB.

Kemampuan antioksidan yang dimiliki ekstrak daun kosambi terbukti mampu menekan stres oksidatif akibat paparan CCL4 pada sel epitel mukosa usus halus tikus model fibrosis hepar. Hal ini ditunjukkan dengan penurunan ekspresi *caspase-3* pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak daun kosambi dibandingkan dengan kelompok K+. Ekspresi *caspase-3* merupakan tanda dari aktivitas apoptosis yang terjadi pada sel epitel mukosa usus halus. Aktivitas

apoptosis disebabkan karena adanya stress oksidatif yang disebabkan oleh ROS. Pada penelitian ini ROS terbentuk utamanya akibat metabolisme dari CCL4 oleh sel epitel mukosa usus halus. CCL4 akan diubah menjadi CCL3 yang nantinya akan berikatan dengan gugus O₂ dan membentuk CCL3O₂. CCL3O₂ selanjutnya akan menarik satu atom H dari gugus lemak jenuh pada membran fosfolipid sehingga membentuk ROS. Metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak daun kosambi seperti flavonoid, saponin dan tanin akan menyumbangkan satu atom H untuk menstabilkan ROS yang terbentuk tadi (Nijveldt, et al., 2001) (Ashraf, Aziz, Stanslas, Ismail, & Kadir, 2013). ROS yang telah mendapatkan satu atom H dari metabolit sekunder ekstrak daun kosambi menjadi lebih stabil dan tidak reaktif (Goswami & Singh, 2017). Akibatnya protein JNK tidak teraktivasi dan sitokrom c tidak terlepas ikatannya dengan cardiolipin.

Peningkatan ekspresi caspase-3 pada kelompok P2 diduga tidak hanya dipengaruhi oleh pemberian CCL4 secara intraperitoneal. CCL4 dapat menginduksi apoptosis sel epitel mukosa usus halus melalui jalur intrinsik akibat adanya produksi ROS yang berlebih pada sel epitel. Pemberian ekstrak daun kosambi seharusnya dapat menurunkan kadar ROS sehingga ekspresi caspase-3 juga mengalami penurunan. Faktor lain seperti adanya agen toksin bakteri atau infeksi dari bakteri dapat menyebabkan keadaan inflamasi pada lapisan mukosa usus halus (Na, Stakenborg, Seok, & Matteoli, 2019). Keadaan inflamasi ini terjadi karena adanya produksi sitokin pro inflamasi seperti TNF- α dan IL-23 yang bertujuan untuk mengaktifasi sel makrofag. Sitokin pro inflamasi TNF- α dapat menginduksi apoptosis sel melalui jalur ekstrinsik dengan cara berikatan dengan reseptor TNFR-1 (*tumor necrotizing factor receptor-1*) (Sinha, Das, Pal, & Sil, 2013).

5.2.4. Integrasi Islam

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan hewan coba tikus sebagai model fibrosis hepar yang diinduksi CCL4. Penelitian ini berfokus pada kemampuan ekstrak daun kosambi dalam menurunkan ekspresi *caspase-3* pada sel epitel mukosa usus halus. Penelitian ini termasuk dalam ilmu biomedik yang merupakan salah satu ranting pada cabang ilmu kedokteran dan kesehatan. Ilmu kedokteran dan kesehatan sendiri merupakan salah satu cabang dari pohon ilmu UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Cabang ini berasal dari batang yang kokoh yakni Al-Quran, Al-Hadis, pemikiran islam, dan sirah nabawiyah (Suprayogo, 2016). Hubungan antara ranting, cabang dan batang menunjukkan bahwa penelitian ini bersumber dari Al-Quran, Al-Hadis dan pemikiran islam.

Seiring berkembangnya zaman, manusia terus menerus mencari terobosan-terobosan teknologi untuk memudahkan kehidupannya sehari-hari. Begitu pula dengan teknologi dibidang kedokteran yang juga terus berkembang. Telah banyak ditemukan pengobatan-pengobatan baru untuk penyakit-penyakit yang dahulunya dianggap tidak ada obatnya. Mulai dari kemoterapi dengan menggunakan senyawa kimia hingga obat alternatif yang didapatkan dari tanaman-tanaman herbal. Berkembangnya pengobatan di bidang kedokteran ini sesuai dengan hadis Rasulullah SAW yang diriwayatkan oleh Muslim yang berbunyi:

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ، فَإِذَا أَصَابَ الدَّوَاءُ الدَّاءَ، بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ (رواه مسلم: ٥٧٠٥)

Artinya: “Setiap penyakit pasti memiliki obat. Bila sebuah obat sesuai dengan penyakitnya maka dia akan sembuh dengan seizin Allah Azza wa Jalla.” (HR. Muslim No. 5705)

Berdasarkan hadis diatas dapat diambil makna bahwa Allah SWT menurunkan suatu penyakit pasti ada obatnya. Pada hadis ini Allah SWT melalui Rasulullah SAW telah memberi petunjuk tentang keberadaan obat untuk suatu penyakit. Manusia yang diberi akal diperintahkan untuk berusaha mencari obat tersebut. Namun, pada hadis ini juga diingatkan bahwa segala kesembuhan terjadi atas seizin Allah SWT.

Usaha manusia yang memanfaatkan akal dan pikirannya untuk mencari obat suatu penyakit sebenarnya juga merupakan perintah Allah SWT. Perintah ini tercantum dalam firman Allah QS. Ali-Imran ayat 191 yang berbunyi:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمٰوٰتِ وَالْاَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هٰذَا بَطِيْلًا سُبْحٰنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ (ال عمران: ١٩١)

Artinya: “(Yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk atau dalam keadaan berbaring, dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), “Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan semua ini sia-sia; Mahasuci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka.” (Terjemah QS Ali-Imran ayat 191) (Cordoba International Indonesia, 2016)

Pada ayat diatas menggunakan kata (رَبَّنَا) yang mengindikasikan kalimat tersebut berasal dari manusia kepada Allah SWT. Berdasarkan susunan kalimat tersebut Allah SWT secara tersirat memerintahkan manusia untuk berfikir. Pada ayat ini juga terdapat kata (مَا خَلَقْتَ هٰذَا بَطِيْلًا) yang memiliki arti bahwa tidak ada satupun ciptaan Allah SWT di muka bumi ini yang sia-sia (Arifah , 2017). Artinya

segala sesuatu yang ada disekitar kita memiliki makna dan manfaat tersendiri, termasuk tanaman-tanaman yang ada disekitar kita. Hal ini diperkuat dalam firman Allah SWT pada Pada QS. Asy-Syuara ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ (الشّعراء: ٧)

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (Terjemah QS Asy-Syuara ayat 7) (Cordoba International Indonesia, 2016)

Pada QS. Asy-Syuara ayat 7 Allah SWT memberikan manusia petunjuk bahwa Ia telah menciptakan berbagai macam makhluk di langit dan bumi ini, yang salah satu makhluknya adalah tumbuhan. Tumbuhan yang telah Ia ciptakan sesungguhnya memiliki banyak manfaat yang masih banyak belum diketahui manusia. Termasuk salah satunya tanaman kosambi (*Schleichera Oleosa*) yang digunakan pada penelitian ini. Tanaman kosambi merupakan tanaman hutan yang telah banyak dibudiyakan utamanya di daerah Jawa Timur. Namun, masih belum banyak penelitian tentang efek dari kandungan tanaman kosambi terhadap suatu penyakit.

Pada penelitian ini didapatkan data bahwa ekstrak daun kosambi mampu menurunkan ekspresi *caspase-3* pada sel epitel di lapisan mukosa usus halus. Penurunan ekspresi *caspase-3* dapat terjadi karena adanya kandungan-kandungan seperti flavonoid, saponin dan tanin pada daun kosambi yang mampu menghambat molekul radikal bebas yang dapat merusak jaringan. Molekul radikal bebas pada penelitian ini berasal dari hasil metabolisme zat toksin yakni CCL4. Berdasarkan hasil yang didapatkan pada penelitian ini tanaman kosambi, khususnya daun

kosambi, yang sebelumnya belum banyak diketahui manfaatnya telah terbukti memiliki kandungan yang dapat mencegah terjadinya kerusakan sel epitel pada usus halus. Hal ini dapat menjadi penjelasan tambahan dari QS Asy-Syuara ayat 7 yang memberikan petunjuk bahwa Allah SWT telah menciptakan berbagai macam tumbuhan yang mengandung banyak manfaat. Umat islam dapat memanfaatkan tanaman kosambi untuk dibudidayakan sebagai salah satu tanaman obat yang memiliki nilai jual.

Ekspresi capase-3 pada sel epitel lapisan mukosa usus halus terjadi karena adanya induksi apoptosis jalur intrinsik akibat adanya ROS. Pada manusia keadaan ini dapat terjadi akibat konsumsi alkohol (Konturek, et al., 2018) ataupun makanan-makanan yang dapat menyebabkan keadaan inflamasi pada usus halus. Islam telah mengajarkan kepada manusia bahwa untuk mengkonsumsi makanan dan minuman yang baik untuk tubuh. Hal ini tercantum pada QS Al-Baqarah ayat 168:

يَا أَيُّهَا النَّاسُ كُلُوا مِمَّا فِي الْأَرْضِ حَلَّالًا طَيِّبًا وَلَا تَتَّبِعُوا خُطُوَاتِ الشَّيْطَانِ ۚ إِنَّهُ لَكُمْ عَدُوٌّ مُّبِينٌ

(البقرة: ١٦٨)

Artinya: “Wahai manusia! Makanlah dari (makanan) yang halal dan baik yang terdapat di bumi dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah syaitan. Sungguh, syaitan itu musuh yang nyata bagimu.” (Terjemah QS Al-Baqarah ayat 7) (Cordoba International Indonesia, 2016)

Berdasarkan ayat diatas, Allah SWT telah memerintahkan manusia untuk makan makanan yang halal dan baik untuk dirinya. Kata (طَيِّبًا) yang memiliki arti baik pada ayat tersebut, juga meliputi kebaikan dalam segi kesehatan. Hal ini

mengindikasikan bahwa islam utamanya mengajarkan cara menjaga kesehatan dengan mengkonsumsi makanan dan minuman yang halal dan baik. Alkohol merupakan salah satu minuman yang telah secara jelas diharamkan oleh Allah SWT dalam QS Al-Maidah ayat 90:

يَا أَيُّهَا الَّذِينَ ءَامَنُوا إِنَّمَا الْخَمْرُ وَالْمَيْسِرُ وَالْأَنْصَابُ وَالْأَزْهُمُ رِجْسٌ مِّنْ عَمَلِ الشَّيْطَانِ فَاجْتَنِبُوهُ لَعَلَّكُمْ

تُفْلِحُونَ (المائدة: ٩٠)

Artinya: “Wahai orang-orang yang beriman! Sesungguhnya minuman keras, berjudi, (berkorban untuk) berhala, dan mengundi nasib dengan anak panah, adalah perbuatan keji dan termasuk perbuatan syaitan. Maka jauhilah (perbuatan-perbuatan) itu agar kamu beruntung.” (Terjemah QS Al-Maidah ayat 90) (Cordoba International Indonesia, 2016)

Berdasarkan penelitian, alkohol dapat merusak ketahanan barrier mukosa pada usus halus (Elamin, Masclee, Dekker, & Jonkers, 2013) yang dapat berdampak pada kesehatan hepar (Konturek, et al., 2018). Hal ini juga dapat membuktikan alkohol selain minuman yang haram juga termasuk dalam minuman yang tidak baik untuk tubuh. Ekstrak daun kosambi diharapkan dapat dikonsumsi sebagai suplemen tambahan untuk umat islam dalam menjaga kesehatan badannya.

BAB VI PENUTUP

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan mengenai pengaruh ekstrak daun kosambi (*Schleichera oleosa*) terhadap ekspresi *caspase-3* pada sel epitel lapisan mukosa usus halus pada tikus model fibrosis hepar, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Injeksi CCL4 melalui intraperitoneal dapat menginduksi apoptosis sel epitel lapisan mukosa pada usus halus melalui jalur apoptosis intrinsik.
2. Ekstrak daun kosambi dapat menurunkan ekspresi *caspase-3* pada sel epitel lapisan mukosa pada usus halus.
3. Dosis ekstrak daun kosambi 600mg/KgBB dapat menurunkan ekspresi *caspase-3* lebih optimal dibandingkan dengan dosis 200mg/KgBB dan dosis 400mg/KgBB.

6.2. Saran

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang berfokus pada ekspresi *caspase-3* pada sel epitel usus halus yang bertujuan untuk melihat kemampuan ekstrak daun kosambi dalam mempertahankan barier mukosa terhadap agen toksik CCL4. Bagi penelitian selanjutnya diharapkan dapat mengkorelasikan data antara ketahanan barier mukosa pada usus halus dengan derajat keparahan fibrosis hepar. Ketahanan barier mukosa pada usus halus ditandai dengan jumlah dan struktur dari sel epitel pada lapisan mukosa usus halus.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Quran dan Terjemahan. (2016). Cordoba International Indonesia. Bandung
- Amarowicz, R. (2007). Tannins: The New Natural Antioxidants? *European Journal Of Lipid Science And Technology*, 109, 549-551.
- Andreas, V. (2020). EFEK EKSTRAK METANOL DAUN KOSAMBI (*Schleichera oleosa*) DALAM MENGHAMBAT FIBROSIS HEPAR PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI Carbon tetrachloride. Malang: Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Arief, R. W. (2007). Analisis Kualitas Relatif Protein Jagung Secara In Vivo Dengan Metode PDCAAS. *Jurnal Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian*, 95-104.
- Arifah, S. E. (2017). *Pendidikan Akal Dalam Perspektif Al-Qur'an*. Semarang: Fakultas Ilmu Tarbiyah dan Keguruan UIN Walisongo.
- Arifin, B., & Ibrahim, S. (2018). Struktur, Bioaktivitas dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*, 21-29.
- Ashraf, M. F., Aziz, M. A., Stanslas, J., Ismail, I., & Kadir, M. A. (2013). Assessment of Antioxidant and Cytotoxicity Activities of Saponin and Crude Extracts of *Chlorophytum borivilianum*. *The Scientific World Journal*, 1-7.
- Balcombe, J. P., Barnard, N. D., & Sandusky, C. (2004). Laboratory routines cause. *Journal of the American Association for Laboratory*, 42-51.
- Bhattacharya, S. (2015). Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System. *Free Radicals in Human Health and Disease*, 17-29.
- Bottcher, K., & Pinzani, M. (2017). Pathophysiology of liver fibrosis and the methodological barriers to the development of anti-fibrogenetic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 3-8.
- Ebrahimi, H., Naderian, M., & Sohrabpour, A. A. (2016). New Concepts on Pathogenesis and Diagnosis of Liver Fibrosis; A Review Article. *Middle East Journal of Digestive Disease*, 166-178.
- Elamin, E. E., Masclee, A. A., Dekker, J., & Jonkers, D. M. (2013). Ethanol metabolism and its effects on the intestinal epithelial barrier. *Nutrition Reviews*, 483-499.
- Gao, H. Y., Li, G. Y., Lou, M. M., Li, X. Y., Wei, X. Y., & Wang, J. H. (2012). Hepatoprotective effect of Matrine salvianolic acid B salt on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Fibrosis. *Journal of Inflammation*, 9-16.
- Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2007). *Color Textbook of Histology*. Philadelphia: Saunders Elsevier.

- Goswami, S., & Singh, R. P. (2017). Ayurvedic, Phytochemical and Pharmacological Review of *Schleichera Oleosa* (Lour.) Oken: a Traditional Plant with Enormous Biological Activity. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 295-309.
- Hernandez-Gea, V., & Friedman, S. L. (2011). Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 425-456.
- Karin, M., & Clevers, H. (2016). Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature*, 307-315.
- Khanbabaee, K., & Ree, T. v. (2002). Tannins: Classification and Definition. *Natural Product Reports*, 641-649.
- Knockaert, L., Berson, A., Ribault, C., Prost, P.-E., Fautrel, A., Pajaud, J., . . . Robin, M.-A. (2012). Carbon Tetrachloride-Mediated Lipid Peroxidation Induces Early Mitochondrial Alterations In Mouse Liver. *Laboratory Investigation*, 92, 396-410. doi:10.1007/s00204-013-1034-4
- Konturek, P. C., Harsch, I. A., Konturek, K., Schink, M., Konturek, T., Neurath, M. F., & Zopf, Y. (2018). Gut–Liver Axis: How Do Gut Bacteria Influence the Liver? *Medical Science*, 1-9.
- Kuhlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biology*, 1-11.
- Kundu, M., & Schmidt, L. H. (2011). *Schleichera oleosa* (Lou.) Oken. *Seed Leaflet*, 1-2.
- Ma, J.-Q., Ding, J., Zhang, L., & Liu, C.-M. (2014). Hepatoprotective properties of sesamin against CCl₄ induced oxidative stress-mediated apoptosis in mice via JNK pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 41-48.
- Ma, W., Tao, L., Zhang, W., Zhu, Y., Xue, D., Zhang, J., & Liu, Z. (2017). Xia-Yu-Xue Decoction Inhibits Intestinal Epithelial Cell Apoptosis in CCL₄-Induced Liver Fibrosis . *Cellular Physiology and Biochemistry*, 333-344.
- Mescher, A. L. (2013). *Junquiera's Basic Histology Text and Atlas*. Philadelphia: McGraw-Hill.
- Mormone, E., George, J., & Nieto, N. (2011). Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chemico-Biological Interactions*, 225-231.
- Muthukrishnan, S., & Sivakkumar, T. (2017). Pharmacognostical investigation, phytochemical studies of *Schleichera oleosa* (lour) oken leaves. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 109-119.
- Na, Y. R., Stakenborg, M., Seok, S. H., & Matteoli, G. (2019). Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 531-543.
- Nafiu, M. O., & Ashafa, A. T. (2017). Antioxidant and Inhibitory Effects of Saponin Extracts from *Dianthus basuticus* Burt Davy on Key Enzymes Implicated in Type 2 Diabetes In vitro. *Pharmacognosy Magazine*, 576-582.

- Nijveldt, R. J., Nood, E. v., Hoorn, D. v., Boelens, P. G., Norren, K. v., & Leeuwen, P. v. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Society for Clinical Nutrition*, 418-425.
- Okamoto, R. (2011). Epithelial regeneration in inflammatory bowel disease. *Inflammation and Regeneration*, 275-281.
- Okumura, R., & Takeda, K. (2018). Maintenance Of Intestinal Homeostasis By Mucosal Barriers. *Inflammation and Regeneration*, 5.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoid: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 1-15.
- Paulsen, F., & Waschke, J. (2011). *Sobotta Atlas of Human Anatomy*. Philadelphia: Elsevier.
- Pergel, A., Tumkaya, L., Colakoglu, M. K., Demiral, G., Kalcan, S., Ozdemir, A., . . . Yilmaz, A. (2019). Effects of infliximab against carbon tetrachloride-induced intestinal injury via lipid peroxidation and apoptosis. *Human Experimental Toxicology*, 1-8.
- Permana, Z. (2010). *Konsumsi, Kecernaan Dan Performa Tikus Putih (Rattus norvegicus) Yang Diberi Ransum Disuplementasi Biomineral Cairan Rumen*. Bogor: Fakultas Peternakan IPB.
- Perochon, J., Carroll, L. R., & Cordero, J. B. (2018). Wnt Signalling in Intestinal Stem Cells: Lessons from Mice and Flies. *Genes*, 1-19.
- Pinzani, M. (2015). Pathophysiology of Liver Fibrosis. *Digestive Disease*, 492-497.
- Romero, A. C., Hernandez, E. O., Ceron, T. F., & Chavez, A. A. (2013). The Exogenous Antioxidants. Dalam J. A. Morales-Gonzales, *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases* (hal. 33-57). IntechOpen.
- Santha, M. L., Kanchana, P., & Shakeela, S. (2017). Anti-inflammatory and Anti-arthritis Activity of *Schleichera Oleosa* (Lour.) Oken Bark. *International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research*, 79-84.
- Scholten, D., Trebicka, J., Liedtke, C., & Weiskirchen, R. (2015). The carbon tetrachloride model in mice. *Laboratory Animals*, 4-11.
- Seki, E., Minicis, S. D., Osterreicher, C. H., Kluwe, J., Osawa, Y., Brenner, D. A., & Schwabe, R. F. (2007). TLR4 enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis. *Nature Medicine*, 1324-1332.
- Serafini, M., Peluso, I., & Raguzzini, A. (2010). Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*, 273-278.
- Sinha, K., Das, J., Pal, P. B., & Sil, P. C. (2013). Oxidative Stress: The Mitochondria-Dependent And Mitochondria-Independent Pathways Of Apoptosis. *Archives of Toxicology*, 87, 1157-1180. doi:10.1007/s00204-013-1034-4

- Situmeang, B., Nuraeni, W., Ibrahim, A. M., & Silaban, S. (2016). Analysis Of Secondary Metabolite Compounds From Leaves Extract Kesambi (*Schleichera Oleosa*) And Antioxidant Activity Test. *Jurnal Pendidikan Kimia*, 164-168.
- Suita, E. (2012). *Seri Teknologi Perbenihan Tanaman Hutan Kesambi (Schleicera Oleosa MERR.)*. Bogor: Balai Penelitian Teknologi Perbenihan Tanaman Hutan.
- Suprayogo, I. (2016, September 11). *Membangun Itegrasi Ilmu Dan Agama : Pengalaman UIN Maulana Malik Ibrahim Malang*. Diambil kembali dari UIN Maulana Malik Ibrahim Malang: <https://www.uin-malang.ac.id/r/160901/membangun-itegrasi-ilmu-dan-agama-pengalaman-uin-maulana-malik-ibrahim-malang.html>
- Tiwari, N., & Pandey, V. N. (2017). Qualitative and Quantitave Phytochemical Screening of Secondary Metabolites in Seeds of *Schleichera Oleosa* (Lour.) Oken. *International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology*, 357-359.
- Wang, S., Ye, Q., Zeng, X., & Qiao, S. (2019). Functions of macrophages in the maintenance of intestinal homeostasis. *Journal of Immunology Research*, 1-8.
- Weiskerchen, R., Weiskerchen, S., & Tacke, F. (2018). Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and tranlational implications. *Molecular Aspects of Medicine*, 2-15.
- Yeh, Y.-H., Hsieh, Y.-L., Lee, Y.-T., & Hsieh, C.-H. (2011). Protective effects of cholestin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, e264-e271.

LAMPIRAN

Lampiran 1. *Ethical Clearance* dari KEPK FKIK UIN Maliki Malang

	<p>FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN Gedung Klinik UMMI It 2 Jalan Gajayana No. 50, Dinoyo, Kec Lowokwaru, Kota Malang E-mail: kepk.fkik@uin-malang.ac.id - Website : http://www.kepk.fkik.uin-malang.ac.id</p>
<p>KETERANGAN KELAIKAN ETIK (ETHICAL CLEARANCE) No. 015/EC/KEPK-FKIK/2020</p>	
<p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG TELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN :</p>	
Judul	Efek Ekstrak Metanol Daun Kesambi (<i>Schleihera Oleosa</i>) Terhadap Histopatologi Hepar, Kadar Transforming Growth Factor- β (TGF β) Hepar, dan Apoptosis Sel Epitel Mukosa Usus Halus Pada Tikus Model Fibrosis Hepar
Sub Judul	Efek Ekstrak Metanol Daun Kesambi (<i>Schleihera Oleosa</i>) Terhadap Histopatologi Hepar, Kadar Transforming Growth Factor- β (TGF β) Hepar, dan Apoptosis Sel Epitel Mukosa Usus Halus Pada Tikus Model Fibrosis Hepar
Peneliti	- dr. Tias Pramesti Griana, M.Biomed - Kholifah Holil, M.,Si - Vicky Andrian - Aathifah - Mohammad Reza Riandinata
Unit / Lembaga	Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Tempat Penelitian	Laboratorium Hewan Coba FKIK UIN Malang, Laboratorium Fitokimia Farmasi FKIK UIN Malang, Laboratorium Histologi FKIK UIN Malang, Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya
<p>DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN TERSEBUT TELAH MEMENUHI SYARAT ATAU LAIK ETIK.</p>	
Mengesahkan Dekan FKIK-UIN Maulana Malik Ibrahim Malang	Malang, 21 JAN 2020 Ketua 
 Dr. dr. Bambang Pardjianto, SpB. SpBP-RE(K) NIP. 19620112015051005	dr. Avin Ainur F, MBIomed NIP. 19800203200912 2 002
<p>Keterangan :</p> <ul style="list-style-type: none">- Keterangan Laik Etik Ini berlaku 1 (satu) tahun sejak tanggal dikeluarkan.- Pada akhir penelitian, laporan Pelaksanaan Penelitian harus diserahkan kepada KEPK-FKIK dalam bentuk <i>soft copy</i>.- Apabila ada perubahan protokol dan/atau Perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).	

Lampiran 2. Hasil Determinasi Daun Kosambi (*Schleichera Oleosa*)



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No 87 Telp (0341) 593396
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/ 753A / 102.7 /2018
 Sifat : Biasa
 Perihal : Determinasi Tanaman Kesambi

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : dr. TIAS PRAMESTI G.
 NIM : 1981 051 820 11 01 2011
 Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
 UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG

1. Perihal determinasi tanaman kesambi

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Sapindales
Famili	: Sapindaceae
Genus	: <i>Schleichera</i>
Spesies	: <i>Schleichera oleosa</i> (Lour.) Oken
Sinonim	: <i>Schleichera oleosa</i> Merr. = <i>Schleichera trijuga</i> Willd.
Nama Daerah	: Kusambi (Melayu); Kasambi (Sunda); Kesambi (Jawa); Khosambi (Madura); Kesambi (Bali); Sambi (Bima); Komi (Sumba).
Kunci Determinasi	: 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15b-197b-208b-219b-220a-221b-222a-1b-5b-6.

2. Morfologi : Habitus: Pohon, tinggi ± 25 m. Batang: Tegak, bulat, berkayu, permukaan kasar, percabangan simpodial, coklat kotor Daun: Tunggal, lanset, berseling, panjang 11-25 cm, lebar 2-6 cm, tepi rata, ujung lancip, pertulangan menyirip, tangkai bulat, panjang ± 1 cm, hijau Bunga: Majemuk, bentuk tandan, di ketiak daun atau ujung batang, kelopak 4-6 lembar, bersatu di pangkal, berduri, hijau, mahkota putih. Buah: Bulat, coklat kehitaman. Biji: Bulat, coklat. Akar: Tunggang, coklat muda

3. Kandungan Kimia : Daun mengandung saponin, tanin, dan alkaloid.

4. Nama Simplisia : *Schleicherae oleosae folium* / daun kesambi.

5. Penggunaan : Penelitian.

6. Daftar Pustaka

- Syamsuhidayat, S.S. dan Hutapea, J.R. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 30 Desember 2019
 An. Kepala UPT Lab. Herbal Materia Medica Batu
 Kepala Seksi Pelayanan Laboratorium Herbal,



Fitria Rahmawati, S Farm., Apt.
 NIP. 19900430 201403 2 002

Lampiran 3. Hasil perhitungan sel epitel mukosa usus halus yang mengekspresikan CCL4

Kelompok	LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	LP6	LP7	LP8	LP9	LP10	Total	Rata-rata
K-1	8	15	16	15	17	2	18	5	10	4	110	11
K-2	4	5	15	16	18	5	7	10	6	6	92	9,2
K-4	7	3	12	5	21	10	13	5	14	10	100	10
K-5	4	4	8	3	12	11	9	13	10	12	86	8,6
K-6	16	11	17	5	8	10	8	14	15	9	113	11,3
K+2	21	24	21	21	34	41	28	44	49	43	326	32,6
K+3	34	55	44	32	56	40	28	49	59	81	478	47,8
K+4	45	42	19	26	33	28	42	38	44	40	357	35,7
K+5	49	55	57	56	26	50	65	50	55	45	508	50,8
K+6	43	28	39	33	44	35	48	42	41	45	398	39,8
P1-1	24	12	10	26	8	11	7	7	17	15	137	13,7
P1-2	24	11	28	6	17	9	17	16	15	14	157	15,7
P1-4	6	24	14	7	12	10	11	9	10	8	111	11,1
P1-5	19	29	39	14	34	32	0	27	19	30	243	24,3
P1-6	25	9	16	43	25	36	29	22	20	32	257	25,7
P2-1	20	21	10	27	17	18	11	11	16	8	159	15,9
P2-2	29	27	22	18	23	3	21	20	21	20	204	20,4
P2-3	22	22	12	26	34	43	24	21	28	27	259	25,9
P2-5	12	8	11	14	13	9	18	12	22	18	137	13,7
P2-6	47	54	63	40	15	8	20	12	15	8	282	28,2
P3-2	16	8	9	9	8	8	10	8	6	11	93	9,3
P3-3	40	21	42	20	16	18	28	35	14	22	256	25,6
P3-4	10	15	10	12	8	10	29	21	21	11	147	14,7
P3-5	5	2	14	20	19	10	8	17	10	6	111	11,1
P3-7	8	14	13	17	15	7	4	9	12	10	109	10,9

Lampiran 4. Hasil Analisis Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kosambi Terhadap Ekspresi *Caspase-3* Pada Sel Epitel Mukosa Usus halus

1. Analisis Deskriptif

Descriptives

Jumlah Sel Epitel Yang Mengekspresikan *Caspase-3*

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K-	5	100,20	11,498	5,142	85,92	114,48	86	113
K+	5	413,40	77,748	34,770	316,86	509,94	326	508
P1	5	181,00	65,253	29,182	99,98	262,02	111	257
P2	5	208,20	62,319	27,870	130,82	285,58	137	282
P3	5	143,20	66,077	29,551	61,15	225,25	93	256
Total	25	209,20	123,894	24,779	158,06	260,34	86	508

2. Uji Normalitas *Saphiro Wilk*

Tests of Normality

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah Sel Positif	K-	,203	5	,200*	,940	5	,663
	K+	,197	5	,200*	,933	5	,615
	P1	,243	5	,200*	,883	5	,322
	P2	,193	5	,200*	,935	5	,630
	P3	,287	5	,200*	,791	5	,068

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

3. Uji Homogenitas *Levene*

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Jumlah Sel Positif	Based on Mean	2,854	4	20	,051
	Based on Median	1,197	4	20	,343
	Based on Median and with adjusted df	1,197	4	12,964	,358
	Based on trimmed mean	2,755	4	20	,056

4. Uji One Way ANOVA

ANOVA

Jumlah Sel Positif

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	293654,400	4	73413,600	19,645	,000
Within Groups	74739,600	20	3736,980		
Total	368394,000	24			

5. Uji Post Hoc LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah Sel Positif

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	-313,200*	38,663	,000	-393,85	-232,55
	P1	-80,800*	38,663	,050	-161,45	-,15
	P2	-108,000*	38,663	,011	-188,65	-27,35
	P3	-43,000	38,663	,279	-123,65	37,65
K+	K-	313,200*	38,663	,000	232,55	393,85
	P1	232,400*	38,663	,000	151,75	313,05
	P2	205,200*	38,663	,000	124,55	285,85
	P3	270,200*	38,663	,000	189,55	350,85
P1	K-	80,800*	38,663	,050	,15	161,45
	K+	-232,400*	38,663	,000	-313,05	-151,75
	P2	-27,200	38,663	,490	-107,85	53,45
	P3	37,800	38,663	,340	-42,85	118,45
P2	K-	108,000*	38,663	,011	27,35	188,65
	K+	-205,200*	38,663	,000	-285,85	-124,55
	P1	27,200	38,663	,490	-53,45	107,85
	P3	65,000	38,663	,108	-15,65	145,65
P3	K-	43,000	38,663	,279	-37,65	123,65
	K+	-270,200*	38,663	,000	-350,85	-189,55
	P1	-37,800	38,663	,340	-118,45	42,85
	P2	-65,000	38,663	,108	-145,65	15,65

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian



Proses penyaringan ekstrak daun kosambi



Proses penguapan etanol ekstrak daun kosambi



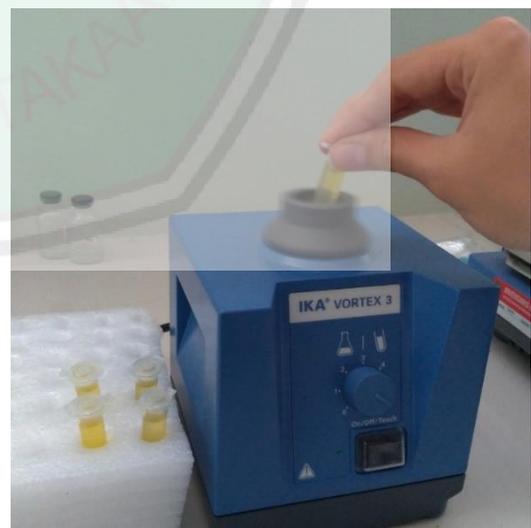
Proses pengeringan ekstrak daun kosambi



Ekstrak daun kosambi



Proses pembuatan larutan CCl₄ dicampur dengan *Olive oil*



Proses pencampuran larutan CCl₄ dengan *Olive oil*



Larutan CCL4 dengan *Olive oil*



Proses injeksi larutan CCL4 dengan *Olive oil* pada tikus secara intraperitoneal



Proses pemberian ekstrak daun kosambi pada tikus dengan sonde



Antibodi primer yang digunakan untuk pewarnaan imunohistokimia