

**LAPORAN HASIL PENELITIAN UNGGULAN  
PERGURUAN TINGGI  
TAHUN ANGGARAN 2012**



**Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Delima Terstandar 40% *Ellagic Acid* terhadap Penurunan Derajat Fibrosis Hati Tikus Putih sebagai Hewan Model Fibrosis Hati dengan Teknik *Bile Duct Ligation***

**WIWIK MISACO YUNIARTI**

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2012 Nomor : 2613/H3/KR/2012, Tanggal 9 Maret 2012**

**Universitas Airlangga  
2012**

**LAPORAN HASIL PENELITIAN UNGGULAN  
PERGURUAN TINGGI  
TAHUN ANGGARAN 2012**



**Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Delima Terstandar 40% *Ellagic Acid* terhadap Penurunan Derajat Fibrosis Hati Tikus Putih sebagai Hewan Model Fibrosis Hati dengan Teknik *Bile Duct Ligation***

**WIWIK MISACO YUNIARTI**

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2012 Nomor : 2613/H3/KR/2012, Tanggal 9 Maret 2012**

**Universitas Airlangga  
2012**

## RINGKASAN

Jumlah penderita penyakit hati kronis selalu mengalami peningkatan dari waktu ke waktu. Fibrosis hati merupakan bagian dari berbagai penyakit hati kronis dan merupakan fase penting dalam perkembangan penyakit hati menjadi sirosis hati. Hingga saat ini belum ditemukan terapi standar dan efektif untuk mencegah atau mengobati fibrosis hati agar tidak berkembang menjadi sirosis hati. Sebagai alternatif, saat ini telah banyak penelitian yang dilakukan untuk menggali potensi tanaman yang memiliki khasiat untuk kesehatan.

Buah delima merupakan bagian tanaman delima yang memiliki komponen paling lengkap bila dibandingkan bagian yang lainnya. Kandungan terbanyak buah delima adalah *polyphenol* dengan bahan aktif utama *punicalagin* dan *ellagic acid* (EA). Ekstrak buah delima terstandar mengandung 40 % atau lebih EA. Delima memiliki kemampuan terapi yang bervariasi melalui berbagai mekanisme yang berbeda.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh pemberian ekstrak buah delima pada tikus putih sebagai hewan model fibrosis hati dengan teknik *bile duct ligation*. Pemeriksaan dilakukan terhadap ekspresi kolagen tipe I dan derajat fibrosis hati pada hewan percobaan dengan menggunakan *METAVIR system*.

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan sebanyak 32 ekor, berumur 2,5 bulan dengan kisaran berat antara 160 – 190 gram dibagi menjadi 4 kelompok, di mana masing-masing kelompok terdiri dari 8 ekor tikus putih. Kelompok pertama adalah kelompok yang dilaparotomi (P0) dengan perlakuan pemberian *sodium carboxy methyl cellulose* (CMC) 0,3% sebanyak 2 ml. Tiga kelompok yang lain adalah tikus putih yang seluruhnya dilaparotomi dan dilakukan *bile duct ligation* dengan perlakuan masing-masing pemberian CMC 0,3% (P1), EA 60 mg/kgbb/po/hari (P2) dan ekstrak buah delima terstandar 150 mg/kg bb/hari peroral (P3) dalam pelarut CMC 0,3% dengan volume yang sama, yaitu 2 ml. Perlakuan diberikan selama 21 hari dan dimulai dua hari setelah pelaksanaan BDL. Hati dieksisi untuk pemeriksaan ekspresi kolagen tipe I dan derajat fibrosis hati.

Hasil pemeriksaan preparat dengan teknik imunohistokimia menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah delima terstandar (P3) dapat menghambat peningkatan ketebalan kolagen tipe I pada hati. Ketebalan kolagen tipe I pada kelompok P3 ( $2,53 \pm 0,43$ ) berbeda secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok P0 ( $0,00 \pm 0,00$ ) dan P1 ( $5,19 \pm 0,72$ ) ( $p < 0,05$ ), namun tidak dengan kelompok P2 ( $2,73 \pm 0,68$ ) ( $p > 0,05$ ).

Pemberian ekstrak buah delima terstandar dapat menghambat peningkatan derajat fibrosis dan berbeda nyata dengan kelompok P0 ( $p < 0,05$ ). Derajat fibrosis pada kelompok P3 merupakan yang terendah dan berbeda nyata bila dibandingkan dengan kelompok P1 ( $p < 0,05$ ), namun tidak berbeda nyata dengan kelompok P2 ( $p > 0,05$ ) Demikian juga untuk kelompok P2 yang tidak berbeda nyata dengan kelompok P1.

Beberapa penelitian tentang delima telah membuktikan bahwa senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak buah memiliki kemampuan saling meningkatkan efek biologis masing-masing. Sebagai contoh, telah dilaporkan bahwa EA dan *quercetin* (keduanya juga terdapat dalam buah delima) yang diberikan secara bersama-sama menunjukkan hambatan yang lebih kuat terhadap pertumbuhan sel kanker daripada bila diberikan secara individual.

Dalam penelitian ini, pemberian EA dan ekstrak buah delima terstandar dapat menghambat peningkatan derajat fibrosis pada hati. Berdasarkan hasil analisis statistik, antara kelompok yang diberi EA dengan kelompok yang diberi ekstrak buah delima memang tidak berbeda secara signifikan. Namun demikian, mengingat bahwa data yang dianalisis bukan merupakan data kontinu yang linier, maka perbedaan hasil skoring memberikan implikasi klinis yang cukup penting. Selain itu, pada penelitian yang sama terbukti bahwa aktivitas antiinflamasi yang dimiliki oleh EA tidak sekuat ekstrak buah delima dalam menghambat peningkatan ekspresi interleukin-6 (IL-6) dan transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1).

*Ellagic acid* merupakan senyawa dimer derivat *gallic acid* yang berada dalam buah delima dalam bentuk bebas sebagai *ellagic acid-glycosides* atau terikat dalam bentuk *ellagitannins*. Setelah diberikan secara per oral kepada tikus, 15% EA diekskresikan dalam bentuk metabolitnya melalui urin dan feses. Rendahnya konsentrasi *ellagic acid* dalam plasma disebabkan karena kelarutannya yang rendah dalam air. Selain itu juga diduga disebabkan karena EA mudah mengalami transformasi dan degradasi sebelum diabsorpsi. Metabolisme EA yang tidak larut dalam intestinal disebabkan oleh aktivitas mikroflora yang berada di dalam intestinal.

Keberadaan *polyphenol* dalam buah delima dapat meningkatkan kelarutan dan absorpsi EA dalam saluran pencernaan. Selain itu, *polyphenol* yang terdapat dalam ekstrak buah delima juga memiliki kemampuan untuk mengurangi EA yang dimetabolisir oleh mikroflora intestinal menjadi *urothilin A* dan *B* melalui aktivitas antibakterial yang dimiliki. Hal ini yang menyebabkan aktivitas antifibrotik ekstrak buah delima terstandar lebih baik daripada EA.

Dalam penelitian ini terbukti bahwa ekstrak buah delima terstandar memiliki efek antifibrotik dengan cara menghambat peningkatan ekspresi kolagen tipe I dan derajat fibrosis hati pada hewan model fibrosis hati.

## SUMMARY

The number of patients suffering from chronic liver disease has always been increasing from time to time. Liver fibrosis is part of several chronic liver diseases and is an important phase in the progression of liver disease to liver cirrhosis. Until now no standard and effective therapy has been found to prevent or treat liver fibrosis so that it will not develop into liver cirrhosis. To search for an alternative, currently many researches have been conducted to explore the components in herbs which may prove beneficial to health.

Pomegranate fruit is part of the pomegranate plant which possesses the most complete compositions compared to its other parts. The most abundant component in pomegranate fruit is *polyphenol* with the major active ingredient being *punicalagin* and *ellagic acid* (EA). Standardized pomegranate fruit extract contains 40% or more EA. Pomegranate fruit has various therapeutic capacities through various mechanisms.

The objective of this research was to analyse the effect of pomegranate fruit extract on rats as an animal model for liver fibrosis by bile duct ligation technique. Observations were made on the expressions of collagen type 1 and the degree of liver fibrosis was performed on experimental animals using the *METAVIR* system

Thirty two male rats (*Rattus norvegicus*), 2,5 months old weighing between 160-190 grams were divided into 4 groups, each consisting of 8 white mice. The first group (P0) consisted of mice which underwent laparotomy and treated with 2 ml of *carboxymethyl cellulose* (CMC) 0,3%. Three other groups consisted of mice which underwent laparotomy and bile duct ligation (BDL) but received different treatments. Group P1 was given *carboxymethyl cellulose* (CMC) 0,3%, P2 was given *ellagic acid* (EA) 60 mg/kgBW/po/day and P3 was treated with standardized pomegranate fruit extract 150 mg/kgBW/po/day within CMC 0,3% of equal volume. Treatments were administered on the second day after BDL for 21 days. The livers were excised for examination of degree of necroinflammation, expressions of IL-6, TGF-B1, MMP-1, type 1 collagen and the degree of liver fibrosis.

The administration of standardized pomegranate fruit extract (P3) could inhibit an increase an increase of collagen type 1 expression in liver. Collagen type 1 thickness in group P3 ( $2,53 \pm 0,43$ ) differed significantly compared to groups P0 ( $0,00 \pm 0,00$ ) and P1 ( $5,19 \pm 0,72$ ) ( $p < 0,05$ ) but not from group P2 ( $2,73 \pm 0,68$ ) ( $p > 0,05$ ).

The administration of standardized pomegranate fruit extract could inhibit an increase of fibrosis degree showing significant difference from group P0 ( $p < 0,05$ ). Group P3 showed

the lowest degree of fibrosis and this was significantly different from group P1 ( $p < 0,05$ ) but was not significantly different from group P2 ( $p > 0,05$ ). Similarly, group P2 was not significantly different from group P1.

Several researches on pomegranate proved that the substances contained in its fruit extract had the capacity to increase the biologic effects of one another. For example, it was reported that EA and *quercetin* (both are found in pomegranate fruit) administered simultaneously showed greater inhibition against the growth of cancer cells than when given separately.

In this study, administration of EA and standardized pomegranate extract can inhibit the increased degree of fibrosis in the liver. The group were given EA and pomegranate extract did not differ significantly ( $p < 0,05$ ). However, because the data being analyzed is not a linear continuous data, the distinction of scoring have an important clinical implications. Additionally, the same study proved that the anti-inflammatory activity of EA is not as strong as pomegranate extract in inhibiting the increased expression of interleukin-6 (IL-6) and transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1).

*Ellagic acid* is a dimer substance, a derivative of *gallic acid* in pomegranate fruit in its free structure as *ellagic acidglycosides* or bonded in the form of *ellagitannins*. After oral administration in mice, 15% EA is excreted in its metabolite form through urine and feces. The low plasma concentration of *ellagic acid* is caused by its low solubility in water. This is also because EA is easily transformed and degraded before it is absorbed. The metabolism of undissolved EA in the intestines is caused by the activity of microflora in the intestines.

The presence of *polyphenol* in pomegranate fruit can increase the solubility and absorption of EA in the digestive tract. Moreover, *polyphenol* in pomegranate fruit extract also has the ability to reduce EA metabolized by intestinal microflora into *uroolithin A* and *B* by its antimicrobial activity. This is why the antifibrotic activity of standardized pomegranate fruit extract is better than that of EA.

This study proved that pomegranate extract standardized have antifibrotic effects by inhibiting the increased expression of collagen type I and the degree of liver fibrosis in animal models of liver fibrosis.

## ABSTRAK

### Latar belakang :

Penderita penyakit hati kronis semakin bertambah dari waktu ke waktu, namun belum ada terapi yang benar-benar efektif untuk mengobatinya. Oleh karena itu, saat ini banyak dikembangkan penelitian yang menggali potensi tanaman yang diduga memiliki efek antifibrotik. Salah satunya adalah buah delima (*Punica granatum L.*).

### Tujuan :

Tujuan dari penelitian ini adalah menganalisis pengaruh ekstrak buah delima pada fibrosis hati akibat obstruksi bilier pada tikus putih. Fibrosis hati diinduksi dengan teknik *bile duct ligation* (BDL). Pemeriksaan dilakukan terhadap kolagen tipe I dan derajat fibrosis hati,

### Metode penelitian :

Tigapuluh dua ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*), umur 2,5 bulan dan memiliki kisaran berat badan 160-190 gram dibagi menjadi empat kelompok perlakuan. Kelompok pertama (P0) adalah kelompok tikus laparatomi yang diberi larutan *carboxy methyl cellulose* (CMC) 0,3% sebanyak 2 ml. Tiga kelompok yang lain adalah kelompok yang dilaparatomi dan *bile duct ligation* (BDL), tetapi mendapat perlakuan yang berbeda. Kelompok P1 diberi larutan *carboxy methyl cellulose* (CMC) 0,3%, P2 diberi *ellagic acid* (EA) 60 mg/kgbb/po/hari dan P3 diberi ekstrak buah delima terstandar 150 mg/kgbb/po/hari dalam CMC 0,3% dengan volume yang sama. Pemberian perlakuan dilakukan hari kedua setelah BDL dan diberikan selama 21 hari. Hati dieksisi satu hari setelah pemberian terakhir.

### Hasil :

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah delima terstandar dapat menghambat ekspresi kolagen tipe I secara bermakna pada kelompok P2 dan P3 bila dibandingkan dengan kelompok P1 ( $p < 0,05$ ). Pemberian ekstrak buah delima secara signifikan juga dapat menghambat perkembangan fibrosis hati bila dibandingkan dengan P1, walaupun masih lebih tinggi bila dibandingkan P0 ( $p < 0,05$ ). Derajat fibrosis hati tidak berbeda nyata antara P3 dengan P2 dan antara P2 dengan P1 ( $p > 0,05$ ).

### Kesimpulan :

Pemberian ekstrak buah delima 150 mg/kgbb/po/hari memiliki efek antifibrotik dengan cara menghambat peningkatan ekspresi kolagen tipe I dan derajat fibrosis hati.

Kata kunci : buah delima, kolagen tipe I, derajat fibrosis.



## ABSTRACT

### Background:

The number of patients with chronic hepatitis increases from time to time, however no therapy which is very effective in treating it has been developed. Therefore, currently many researches are being carried out to explore the components in herbs thought to possess antibiotic effect. Among them is the pomegranate fruit (*Punica granatum L.*).

### Objective:

The objective of this study was to analyse the effect of standardized pomegranate fruit extract on liver fibrosis due to biliary obstruction in rats. Liver fibrosis was induced by bile duct ligation (BDL) technique. Examinations were performed on the expressions of type 1 collagen and the degree of liver fibrosis.

### Method:

Thirty two male albino rats (*Rattus norvegicus*), 2,5 months old weighing 160-190 grams were divided into four experimental groups. The first group (P0) consisted of rats which underwent laparotomy and treated with 2 ml of *carboxymethyl cellulose* (CMC) 0,3%. Three other groups consisted of rats which underwent laparotomy and bile duct ligation (BDL) but received different treatments. Group P1 was given *carboxymethyl cellulose* (CMC) 0,3%, P2 was given *ellagic acid* (EA) 60 mg/kgBW/po/day and P3 was treated with standardized pomegranate fruit extract 150 mg/kgBW/po/day within CMC 0,3% of equal volume. Treatments were administered on the second day after BDL for 21 days. The livers were excised one day after the last administration.

### Result:

The results showed that administration of standardized pomegranate extract can inhibit the expression of type I collagen significantly in the P2 and P3 compared with P1 group ( $p < 0.05$ ). Treatment with standardized pomegranate fruit extract also significantly suppressed the progression of liver fibrosis compared to P1, even though there was more liver fibrosis compared to P0 ( $p < 0,05$ ). The degree of liver fibrosis was not significantly different between P3 and P2, and between P2 and P1 ( $p > 0,05$ ).

### Conclusion:

The administration of standardized pomegranate fruit extract 150 mg/kgBW/po/day exerted antifibrotic effect by inhibiting an increase of collagen type 1 and the degree of liver fibrosis.

**Keywords:** pomegranate fruit, collagen type I, degree of liver fibrosis.

## PRAKATA

Dengan memanjatkan syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas rahmad dan hidayahNya, sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Delima Terstandar 40% Ellagic Acid terhadap Penurunan Derajat Fibrosis Hati Tikus Putih sebagai Hewan Model Fibrosis Hati dengan Teknik *Bile Duct Ligation*“. Besar harapan saya, hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan untuk kepentingan peningkatan kesehatan dan kualitas hidup masyarakat pada umumnya dan penderita penyakit hati pada khususnya.

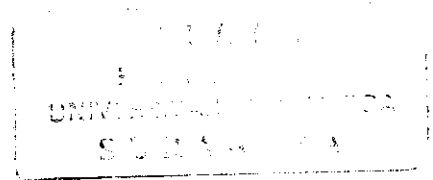
Pada kesempatan ini, saya menyampaikan terimakasih kepada rektor Universitas airlangga dan Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang telah diberikan untuk pelaksanaan penelitian ini

Semoga Allah Yang Maha Esa senantiasa melimpahkan rahmad dan karuniaNya kepada semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

Surabaya, 29 Oktober 2012

Penulis

## DAFTAR ISI



	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN.....	i
RINGKASAN DAN SUMMARY.....	ii
ABSTRAK DAN ABSTRACT.....	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
Latar Belakang.....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	2
Mekanisme Fibrosis Hati.....	2
Bahan Aktif Delima .....	7
Aktivitas Delima.....	7
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	11
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	12
Jenis Rancangan Penelitian.....	12
Unit Eksperimen, Replikasi dan Randomisasi.....	13
Variabel Penelitian.....	14
Definisi Operasional Variabel.....	14
Bahan Penelitian.....	15
Instrumen Penelitian.....	16
Lokasi dan Waktu Penelitian.....	16
Kerangka Operasional Penelitian.....	17
Cara Pengolahan dan Analisis Data.....	19
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	20
BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN.....	26
DAFTAR PUSTAKA.....	27

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 4.1 Metode METAVIR .....	18
Tabel 5.1 Uji Homogenitas Subjek Penelitian Berdasarkan Berat Badan Awal dan Akhir Tikus Percobaan.....	21
Tabel 5.2 Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Kolagen I pada Hewan Percobaan .....	21
Tabel 5.3 Rerata dan Simpangan Baku Skoring Derajat Fibrosis Hati.....	23

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 5.1 Ketebalan Kolagen Tipe I.....	20
Gambar 5.2 Derajat Fibrosis pada Hati Hewan Percobaan.....	22

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
Lampiran 1. Biodata Peneliti.....	38
Lampiran 2. <i>Certificate of Analysis Ellagic Acid</i> .....	42
Lampiran 3. <i>Certificate of Analysis</i> Ekstrak Buah Delima Terstandar.....	43
Lampiran 4. Keterangan Kelaikan Etik " <i>Ethical Clearance</i> ".....	44

## BAB I. PENDAHULUAN

### Latar Belakang

Jumlah penderita penyakit hati kronis selalu mengalami peningkatan dari waktu ke waktu. Fibrosis hati merupakan bagian dari berbagai penyakit hati kronis dan merupakan fase penting dalam perkembangan penyakit hati menjadi sirosis hati. Hingga saat ini belum ditemukan terapi standar dan efektif untuk mencegah atau mengobati fibrosis hati sehingga tidak berkembang menjadi sirosis hati (Oh *et al.*, 2003). Sebagai alternatif, saat ini telah banyak penelitian yang dilakukan untuk menggali potensi tanaman yang memiliki khasiat untuk kesehatan.

Buah delima merupakan bagian tanaman delima yang memiliki komponen paling lengkap bila dibandingkan bagian tanaman yang lain. Kandungan terbanyak buah delima adalah *polyphenol* dengan bahan aktif utama *punicalagin* dan *ellagic acid* (EA). Ekstrak buah delima terstandar sebaiknya mengandung 40 % atau lebih *ellagic acid*. Delima memiliki kemampuan terapi yang bervariasi melalui berbagai mekanisme yang berbeda. Berbagai penelitian terhadap aktivitas buah delima telah membuktikan bahwa buah delima memiliki kemampuan antibakteri, antioksidan, antiinflamasi dan antikanker serta aktivitasnya dalam meregulasi proses fibrosis (Jurenka, 2008).

*Ellagic acid* (EA) yang terkandung dalam buah delima, adalah derivat polifenol yang juga banyak ditemukan dalam kacang-kacangan dan buah-buahan, misalnya raspberi, strawberi dan anggur. *Ellagic acid* memiliki aktivitas antifibrotik dengan cara menurunkan kadar kolagen, ekspresi TGF- $\beta$ 1 dan jumlah  $\alpha$ -SMA pada *stellate cell* pankreas teraktivasi pada tikus putih yang menderita pankreatitis kronis. Pada penelitian tersebut juga terbukti bahwa EA memiliki aktivitas antiinflamasi dan mampu menurunkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) (Suzuki *et al.*, 2009).

Langkah awal yang akan dilakukan peneliti adalah memberikan ekstrak buah delima terstandar yang mengandung 40% *ellagic acid* kepada hewan percobaan yang sedang dalam proses menuju fibrosis hati. Pemeriksaan dilakukan terhadap ekspresi kolagen tipe I dan derajat fibrosis (dengan metode Metavir) pada hewan model fibrosis hati.



## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### I. Mekanisme Fibrosis Hati

Fibrosis hati adalah proses kesembuhan luka yang ditandai dengan akumulasi protein matriks ekstraseluler terutama kolagen tipe I, III, *proteoglycan*, *fibronectin* dan laminin sebagai respons terhadap jejas hati (Gutierrez-Ruiz *et al.*, 2002). Pada bagian ini akan dijelaskan tentang proses inflamasi pada fibrosis hati, tahapan fibrosis hati dan mediator fibrogenesis hati serta interaksi interseluler.

#### a. Proses inflamasi pada fibrosis hati

Setelah terjadi jejas pada hati, maka akan berlangsung proses inflamasi yang melibatkan berbagai peran sitokin dan aktivasi HSCs. Pada hati yang mengalami inflamasi akan terjadi peningkatan jalur rekrutmen dan migrasi leukosit. Jalur tersebut melibatkan traktus portalis, sinusoid dan vena hepatica. Komposisi dan distribusi limfosit T (peripheral), limfosit B (sentral), sel plasma, histiosit, eosinofil, sel *natural killer* (NK) dan sel *mast* akan mengalami perubahan (Gutierrez-Ruiz *et al.*, 2002).

Leukosit yang direkrut hati selama terjadi jejas akan bergabung dengan sel *Kupffer* dalam memproduksi senyawa yang memodulasi perilaku HSCs. Monosit dan makrofag terlibat dalam aksi inflamasi dengan menghasilkan sejumlah besar *nitric oxide* (NO) dan sitokin proinflamasi seperti *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) yang memiliki efek stimulatoris langsung terhadap sintesis kolagen oleh HSCs (Reeves and Friedman, 2002).

Sel *Kupffer* dapat menstimulasi sintesis matriks ekstraseluler, proliferasi sel, dan pelepasan retinoid oleh HSCs melalui aksi sitokin, terutama TGF- $\beta$ 1 dan *reactive oxygen intermediates/lipid peroxidase*. Sel *Kupffer* yang berperan sebagai makrofag dalam sinusoid hati memiliki implikasi yang sangat luas terhadap hati yang mengalami jejas. Sel *Kupffer* dapat mengekspresikan TNF- $\alpha$ , di mana TNF- $\alpha$  berhubungan dengan apoptosis yang dipicu oleh *tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) dan Fas (Canbay *et al.*, 2003).

#### b. Tahapan fibrosis hati

Penyembuhan luka, remodeling dan perbaikan jaringan adalah mekanisme protektif yang teraktivasi sebagai respon terhadap stress dan jejas untuk menjaga integritas fungsional organ dan sistem tubuh. Deregulasi proses penyembuhan normal dan paparan yang berlanjut dapat menyebabkan jejas kronis. Jejas kronis inilah yang akan menyebabkan fibrosis pada jaringan dan kegagalan fungsi pada organ (Kisseleva



and Brenner, 2008). Rangkaian kejadian atau peristiwa penyebab fibrosis pada hati adalah kerusakan sel epitel, pelepasan TGF- $\beta$ 1, rekrutmen sel inflamasi, induksi pembentukan ROS, aktivasi sel penghasil kolagen dan induksi aktivasi miofibroblas.

#### (i) Kerusakan epitel/endotel

Kerusakan vaskuler memiliki peran penting pada proses fibrogenesis, karena merupakan pemicu terjadinya sklerosis sistemik. Sklerosis sistemik memiliki kontribusi pada proses penebalan pembuluh darah, produksi sitokin pro inflamasi dan TGF- $\beta$ 1, hipoksia jaringan, agregasi platelet, penurunan produksi *nitric oxide* (NO) dan menyebabkan fibrosis (Steen, 2006). Fibrosis akibat kerusakan vaskuler disebabkan karena kerusakan pembuluh darah pada membran basal dan cepatnya rekrutmen sel-sel inflamasi pada area yang mengalami jejas (Kumar *et al.*, 2005).

Sel epitelial dan endotelial terletak saling berdekatan, sehingga jejas yang terjadi pada sel endotelial dan membran basal seringkali akan mempengaruhi sel epitelial. Kerusakan pada sel epitelial dan endotelial juga berpengaruh terhadap proses inflamasi dan fibrogenesis. Sel epitelial yang teraktivasi akan mensekresikan sitokin, faktor pertumbuhan dan kemoatraktan untuk sel mononuklear dan fibroblas interstisial. Sel epitelial juga akan mengalami apoptosis atau transdiferensiasi menjadi fibroblas (Kuwano *et al.*, 2004). Sel epitelial yang mengalami apoptosis akan mensekresikan sitokin, yang berfungsi untuk merekrut dan mengaktivasi makrofag. Makrofag yang teraktivasi akan melepaskan TGF- $\beta$ 1 dan ROS ekstraseluler, terutama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, yang selanjutnya juga akan menyebabkan apoptosis sel epitelial.

#### (ii) Pelepasan TGF- $\beta$ 1 sebagai sitokin fibrogenik utama

*Transforming growth factor beta 1* (TGF- $\beta$ 1) membantu meningkatkan proses penyembuhan dan perbaikan luka. Pada kondisi patologis, TGF- $\beta$ 1 akan berinteraksi dengan sel parenkim, sel inflamasi, sel penghasil kolagen dan secara bersama-sama akan menstimulasi terjadinya fibrosis. Ekspresi TGF- $\beta$ 1 yang berlebihan pada mencit transgenik terbukti dapat menyebabkan fibrosis pada berbagai organ, sehingga TGF- $\beta$ 1 dapat dianggap sebagai sitokin pro-fibrogenik yang utama (Bataller and Brenner, 2005).

Hepatosit yang mengalami jejas dan sel *Kupffer* merupakan sel penghasil TGF- $\beta$ 1. *Transforming growth factor beta 1* diperlukan untuk aktivasi HSCs sebagai sel penghasil kolagen tipe I pada hati yang mengalami fibrosis. Sekali

teraktivasi, HSCs bersama dengan sel endotelial sinusoid akan bersama-sama memproduksi TGF- $\beta$ 1 (Bataller and Brenner, 2005).

### (iii) Rekrutmen sel inflamasi

Respons awal inflamasi terjadi melalui proses endositosis atau fagositosis yang diperantarai oleh sitokin. Netrofil adalah sel yang pertama kali direkrut dan berfungsi untuk membersihkan debris sel dan memfagosit badan apoptotik. Netrofil yang teraktivasi akan mengalami degranulasi dan melepaskan sitokin proinflamasi dan profibrogenik serta mengalami apoptosis. Setelah itu, makrofag akan menginfiltrasi jaringan yang mengalami jejas, melakukan fagositosis dan mensekresi sitokin fibrogenik. Makrofag adalah sumber utama TGF- $\beta$ 1 pada organ yang mengalami fibrosis. Limfosit T dan B juga ditarik menuju area yang mengalami jejas dan berperan dalam memfasilitasi sekresi sitokin profibrogenik (Bataller and Brenner, 2005).

### (iv) Induksi pembentukan *reactive oxygen species* (ROS)

Pada hati, ROS dihasilkan oleh hepatosit yang mengalami jejas, sel *Kupffer*, HSCs dan netrofil yang teraktivasi. Stres oksidatif yang disebabkan karena peningkatan ROS, misalnya superoksida, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil memiliki peran penting dalam proses fibrosis. Produk akhir proses peroksidasi lipid, yaitu *4-hydroxy-2,3-nonenal* (HNE) dan *4-hydroxy-2,3-alkenals* (HAKs) juga dapat bertindak sebagai mediator potensial yang mempengaruhi transduksi sinyal, proliferasi dan fungsi sel hati (Parola *et al.*, 1996). Keberadaan ROS dan HAKs memiliki kontribusi dalam proses fibrosis dengan cara meningkatkan sitotoksitasnya atau dengan memodulasi berbagai perubahan morfologi sel yang terlibat pada proses tersebut. Penurunan kadar antioksidan endogen juga memiliki kontribusi pada proses kerusakan jaringan (Bataller and Brenner, 2005).

### (v) Aktivasi sel penghasil kolagen

Aktivasi sel penghasil fibroblas dapat terjadi melalui aktivasi berbagai sel, yaitu miofibroblas residen, *epithelial to mesenchymal transition* dan *bone marrow derived fibroblast*.

#### Miofibroblas residen

Miofibroblas residen berasal dari fibroblas spesifik jaringan yang berproliferasi dan teraktivasi sebagai respons terhadap jejas. Sel ini diyakini merupakan sumber utama penghasil kolagen baik pada paru-paru, kulit, ginjal dan hati (Kisseleva and Brenner, 2008).

Fibroblas portal sebagai bagian populasi sel hati endogen juga memiliki implikasi pada fibrogenesis hati (Bataller and Brenner, 2006). Kolestasis dapat menyebabkan proliferasi fibroblas portal sehingga menyebabkan deposisi kolagen di sekitar saluran empedu. Aktivitas ini jauh lebih lambat bila dibandingkan dengan yang dihasilkan oleh aktivitas HSCs dan hanya memiliki sedikit kontribusi pada fibrosis hati (Knittel *et al.*, 1999).

#### ***Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)***

Sebagai respons terhadap jejas, epitel memiliki peran pada proses fibrosis dengan menghasilkan fibroblas melalui proses *epithelial-to-mesenchymal transition* (EMT). *Epithelial-to-mesenchymal transition* adalah suatu proses ketika sel epitel yang berdiferensiasi secara sempurna mengalami perubahan secara fenotif menjadi sel mesenkimal. Pada mencit, EMT juga terjadi sebagai respons terhadap jejas yang disebabkan oleh *bile duct ligation* (BDL). Teknik BDL telah terbukti dapat menyebabkan obstruksi kronis dan proliferasi sel saluran empedu, pertumbuhan miofibroblas periduktal yang berlebihan dan fibrosis (Xia and Dai, 2006).

#### **Fibrosit dan *bone marrow derived fibroblast***

Fibrosit memiliki peran dalam proses fibrosis baik pada kulit, hati, ginjal dan paru-paru. Bila dibandingkan dengan EMT, kontribusinya lebih rendah. Jumlah fibrosit pada jaringan fibrosis tergantung pada organ yang mengalami fibrosis dan jenis jejas yang menimbulkannya. Pada paru berkisar antara 5 – 25% (Kisseleva, 2006). Fibrosit melepaskan sitokin dan faktor pertumbuhan, yaitu TGF- $\beta$ 1 dan MCP-1 yang berperan dalam proses deposisi matriks ekstraseluler pada area yang mengalami (Quan *et al.*, 2006). *Bone marrow-derived cell (BM-derived cell)* telah terbukti memiliki kontribusi dalam proses fibrosis (Lama and Phan, 2006). Pada jejas hati yang disebabkan oleh intoksikasi CCl<sub>4</sub>, *BM-derived myofibroblast* mengekspresikan kolagen,  $\alpha$ -SMA, desmin dan vimentin sebagai tanda terjadinya fibrosis (Russo *et al.*, 2006).

#### **(vi)Induksi aktivasi miofibroblas oleh matriks**

Tergantung pada komposisi matriks ekstraseluler, fibroblas dapat dalam posisi tetap atau teraktivasi menjadi miofibroblas. Dengan adanya laminin, yang merupakan komponen penting membran basal, maka fibroblas akan berada dalam keadaan *quiescence*. Sebaliknya fibroblas yang mengalami stres ekstraseluler

karena matriks ekstraseluler abnormal, akan mengalami proliferasi dan berubah secara fenotip menjadi miofibroblas. Peningkatan deposisi matriks ekstraseluler yang abnormal akan mempercepat aktivasi sel penghasil kolagen (Hinz, 2007).

### c. Kolagen sebagai Petanda Fibrosis Hati

Kolagen adalah suatu makromolekul yang merupakan komponen utama dari matrik ekstraseluler. Selama ini telah dikenal 20 jenis kolagen yang terbentuk dari kombinasi berbagai macam rantai kolagen (Song, 2006). Kolagen tipe I terdiri dari *triple helix* dalam bentuk heterotrimer yang terdiri dari dua rantai  $\alpha 1(I)$  yang identik dan satu rantai  $\alpha 2(I)$ . Kolagen tipe I merupakan jenis kolagen yang paling banyak dijumpai pada hati yang mengalami fibrosis (Bataller and Brenner, 2005).

Pada hati yang mengalami jejas kronis, HSCs akan teraktivasi dan mengalami transdiferensiasi menjadi miofibroblas. Miofibroblas akan menghasilkan komponen matriks ekstraseluler, yaitu kolagen tipe I sebagai respon pada proses penyembuhan luka. Terdapat berbagai jenis kolagen pada hati yang mengalami fibrosis, yaitu :

- Kolagen tipe I

Kolagen tipe I merupakan jenis kolagen terbanyak pada hati yang mengalami fibrosis dan biasanya terletak pada area portal dan septa fibrous.

- Kolagen tipe III

Bersama dengan kolagen tipe I banyak dijumpai pada bagian yang dapat mengalami distensi, contohnya pada arteri.

- Kolagen tipe IV

Kolagen tipe IV banyak dijumpai di sekitar sel epitel, oleh karena itu pada liver banyak ditemukan pada area sinusoid dan membran basal pembuluh darah dan saluran empedu.

- Kolagen tipe V

Kolagen tipe V merupakan kolagen fibril yang banyak ditemukan pada hati yang mengalami sirosis dan ditemukan pada posisi mengelilingi hepatosit.

- Kolagen tipe VI

Kolagen jenis ini banyak ditemukan pada jaringan konektif.

- Kolagen tipe VII

Tipe kolagen yang paling banyak ditemukan pada membran basal dan stroma.

Kolagen tipe II, VIII, IX, X, XI, XII dan XIII tidak ditemukan pada hati (Kahraman *et al.*, 2009).

## II. Bahan Aktif Delima

Berbagai kandungan fitokimia telah berhasil diidentifikasi dari berbagai bagian tanaman delima. Kelompok utama fitokimia adalah *polyphenol* yang banyak ditemukan pada buahnya. *Polyphenol* delima terdiri dari *flavonoids* (*flavonols*, *flavonols* dan *anthocyanins*), *hydrolyzable tannins* (*ellagitannins* dan *gallotannins*) dan *condensed tannins* (*proanthocyanidins*). Fitokimia lain yang ditemukan pada delima adalah *organic acid*, *phenolic acid*, *sterols*, *triterpenoids*, *fatty acids*, *triglycerides* dan *alkaloids* (Seeram *et al.*, 2006).

*Hydrolyzable tannins* (HTs) sebagai bagian utama *polyphenol* dalam jus delima memiliki aktivitas antioksidan sebesar 92% (Gil *et al.*, 2000). *Punicalagin* merupakan bagian HTs paling dominan, bertanggungjawab terhadap hampir separuh dari aktivitas antioksidan jus delima. Daun, batang dan buah delima mengandung lebih dari 18 struktur HTs (Seeram *et al.*, 2006).

*Punicalagin*, merupakan salah satu senyawa *ellagitannins* yang banyak ditemukan pada selaput buah dan batang delima. *Punicalagin* yang terkandung dalam jus delima memiliki aktivitas antioksidan hingga 89%. Walaupun tidak dapat langsung diabsorpsi oleh tubuh karena ukurannya yang besar, *punicalagin* akan mengalami hidrolisis di dalam usus sebelum diabsorpsi. Proses hidrolisis yang ditandai dengan pembentukan *ellagic acid* ini akan menyebabkan konsentrasi *ellagic acid* yang stabil dalam darah hingga lebih dari 6 jam setelah pemberian (Zhang *et al.*, 2009).

*Ellagic acid* telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan, antiinflamasi dan dapat mencegah destruksi gen p53 oleh sel kanker. Selain itu, EA juga dapat berikatan dengan sel kanker dan membentuk suatu molekul kompleks, sehingga sel kanker menjadi inaktif. Penelitian terhadap efek hepatoprotektif *ellagic acid* juga menunjukkan bahwa konsumsi *ellagic acid* dapat meningkatkan kemampuan jaringan hati untuk melakukan detoksifikasi terhadap intermediet reaktif (Seeram *et al.*, 2005).

## III. Aktivitas Delima

Delima memiliki kemampuan terapi yang bervariasi dan proses tersebut terjadi melalui berbagai mekanisme yang berbeda. Berbagai penelitian terhadap aktivitas delima

difokuskan terhadap aktivitasnya sebagai antioksidan, antiinflamasi dan antikanker serta aktivitasnya dalam meregulasi proses fibrosis.

### **Aktivitas Antioksidan**

Seluruh bagian tanaman delima mengandung *polyphenol* dan memiliki aktivitas antioksidan. Bagian tanaman yang paling potensial digunakan sebagai antioksidan adalah kulit batang dan batang. Pada buah delima, membran buah yang mengandung banyak *tannins* dan *anthocyanins* memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi. *Gallic acid*, *ellagic acid*, *tannins* dan *anthocyanins* yang terkandung dalam delima dapat bertindak sebagai *scavenger* dan *chelating agent* (Seeram *et al.*, 2006).

Penelitian telah menunjukkan bahwa delima dalam bentuk jus dan ekstrak biji delima memiliki aktivitas antioksidan 2-3 kali lebih kuat daripada anggur merah atau teh hijau (Gill *et al.*, 2000). Jus buah delima memiliki aktivitas antioksidan yang ditandai dengan kemampuannya menghambat proses peroksidasi lipid pada hewan percobaan (Rosenblat *et al.*, 2006) serta meningkatkan kapasitas antioksidan plasma pada individu yang sudah berumur (Guo *et al.*, 2008).

Penelitian secara *in vitro* dengan memanfaatkan ekstrak *fermented pomegranate juice* (FPJ) dan *cold pressed seed oil* (CPSO) menunjukkan bahwa kedua bahan tersebut memiliki aktivitas antioksidan lebih kuat bila dibandingkan dengan ekstrak anggur merah dan teh hijau (Schubert *et al.*, 1999). *Pomegranate peel extract* (PPE) yang diberikan pada tikus putih yang mengalami kerusakan hati karena induksi  $\text{CCl}_4$  terbukti dapat meningkatkan dan mengatur aktivitas *free radical scavenging* yang dimiliki oleh hati seperti *catalase*, *superoxide dismutase* dan *peroxidase* serta dapat menurunkan kadar lipid peroksidase (Chidambara *et al.*, 2002).

### **Aktivitas Antiinflamasi dan Antikanker**

Senyawa yang terkandung dalam delima telah terbukti memiliki aktivitas antiinflamasi dan antikanker. Aktivitas tersebut disebabkan karena pengaruh delima terhadap  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , *cyclooxygenase* (COX) dan *lipoxygenase* (LOX) yang terlibat dalam proses tersebut. *Nuclear factor kappa B* ( $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ) merupakan faktor transkripsi yang akan teraktivasi sebagai respons terhadap berbagai stimulasi, misalnya karena keberadaan sitokin, mitogen, karsinogen, endotoksin, stress fisik atau kimia, radiasi dan hipoksia. Delima telah terbukti memiliki aktivitas menghambat aktivasi  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  yang terlibat dalam proses perkembangan berbagai jenis tumor. Delima juga menghambat aktivitas COX2, yaitu enzim yang terinduksi oleh aktivitas agen mitogenik atau inflamatorik, sehingga akan

meningkatkan sintesis prostaglandin pada jaringan inflamasi atau neoplastik (Seeram *et al.*, 2006)

*Cyclooxygenase* dihambat hingga 37% dan *lipoxigenase* dihambat hingga 75% akibat pemberian *cold pressed pomegranate juice* (CPSO). Sebagai pembanding, penggunaan *fruit pomegranate juice* (FPJ) hanya mampu menghambat enzim *lipoxigenase* 23.8% dengan dosis yang sama (Schubert *et al.*, 1999).

Penelitian pada mencit yang dipapar dengan kanker prostat *PC-3 cell line* menunjukkan bahwa *pomegranate peel extract* (PPE) mampu menghambat pertumbuhan sel dan menginduksi apoptosis melalui modulasi protein yang meregulasi apoptosis (Malik, 2005; Malik and Mukhtar, 2006).

Penelitian tentang pengaruh delima terhadap penurunan *prostate specific antigen* (PSA) juga telah dilakukan. Setelah pemberian delima, terjadi penurunan PSA hingga 27% yang disertai dengan penurunan proses proliferasi sel serta peningkatan jumlah sel kanker yang mengalami apoptosis. Hasil ini mengindikasikan bahwa delima memiliki aktivitas antiproliferasi, antiinflamasi, antioksidan dan pro apoptosis pada sel kanker (Pantuck *et al.*, 2006).

### Aktivitas Antifibrotik

Penelitian tentang aktivitas delima pada proses inflamasi kronis yang melibatkan aktivitas fibroblas, MMPs dan TIMPs telah dilakukan. Penelitian menggunakan bunga delima pada tikus putih diabetes yang menderita fibrosis pada jantungnya menunjukkan hasil yang baik. Diduga bahwa bunga delima memiliki peran dalam memodulasi *endothelin-1* (ET-1) dan NF- $\kappa$ B. Hasil tersebut menunjukkan bahwa bunga delima dapat dimanfaatkan sebagai agen antifibrotik pada penderita diabetes yang mengalami fibrosis pada jantung (Huang *et al.*, 2003). Ekstrak kulit buah delima juga telah terbukti dapat menghambat perkembangan fibrosis hati pada hewan percobaan dengan menurunkan kadar kolagen pada hati serta memperbaiki fungsi hati (Toklu *et al.*, 2007).

*Ellagic acid* yang terkandung dalam delima memiliki kemampuan dalam menurunkan kadar kolagen, ekspresi TGF- $\beta$ 1 dan jumlah  $\alpha$ -SMA pada *stellate cell* pankreas teraktivasi pada tikus putih yang menderita pankreatitis kronis. *Ellagic acid* juga mampu menurunkan produksi ROS. Berdasarkan hasil tersebut, diduga bahwa *allegic acid* dapat dimanfaatkan sebagai terapi alternatif pada penderita pankreatitis kronis atau fibrosis pankreas (Suzuki *et al.*, 2009).

### Mekanisme Lain

Konsumsi delima oleh penderita diabetes tipe 2 yang disertai dengan hiperlipidemia mampu menurunkan absorpsi kolesterol, meningkatkan ekskresi kolesterol dalam feses, memberikan efek positif terhadap enzim yang terlibat dalam metabolisme kolesterol, secara signifikan dapat menurunkan kadar kolesterol total dan *low density lipoprotein* (LDL) (Esmailzadeh *et al.*, 2006).

Konsumsi FPJ pada penderita hipertensi terbukti mampu menghambat aktivitas *angiotensin converting enzyme* (ACE). *Angiotensin converting enzyme* adalah biokatalisator untuk konversi angiotensin I menjadi angiotensin II, sebuah vasokonstriktor potensial. Hal ini akan berakibat pada penurunan tekanan darah sistolik (Aviram and Dorenfeld, 2001). Hasil ini mengindikasikan bahwa FPJ merupakan bahan potensial untuk mencegah penyakit kardiovaskuler.

*Pomegranate flower extract* (PFE) dapat meningkatkan sensitivitas terhadap insulin dan menurunkan kadar gula pada tikus diabetes (Huang *et al.*, 2005). *Pomegranate peel extract* (PPE) menunjukkan aktivitas hipoglikemia pada tikus yang mengalami diabetes dengan cara meningkatkan level insulin dan regenerasi sel beta pankreas (Khalil, 2004).

Berdasarkan uraian di atas, diharapkan ekstrak buah delima dapat dimanfaatkan sebagai agen antifibrotik pada penderita fibrosis hati. Aktivitas antifibrotik diukur berdasarkan ketebalan kolagen dan derajat fibrosis pada hati. Fibrosis pada hati selalu melibatkan proses stress oksidatif, reaksi inflamasi dan fibrogenesis. Di sisi lain, buah delima telah terbukti memiliki aktivitas anti oksidan, antiinflamasi dan antifibrotik pada beberapa organ yang mengalami fibrosis.



### **BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **Tujuan Penelitian**

##### Tujuan umum penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menjelaskan pengaruh ekstrak buah delima terhadap penurunan derajat fibrosis pada tikus putih sebagai hewan model fibrosis hati dengan teknik *bile duct ligation*.

##### Tujuan khusus penelitian

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah :

- a. Menganalisis penurunan ekspresi kolagen tipe I pada hati hewan model fibrosis hati yang diberi ekstrak buah delima.
- b. Membuktikan penurunan derajat fibrosis pada hati hewan model fibrosis hati yang diberi ekstrak buah delima.

#### **Manfaat Penelitian**

##### 1. Manfaat teoritik penelitian

Manfaat teoritik yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah penjelasan tentang pengaruh ekstrak buah delima terhadap penurunan derajat fibrosis pada tikus putih sebagai hewan model fibrosis hati dengan teknik *bile duct ligation*.

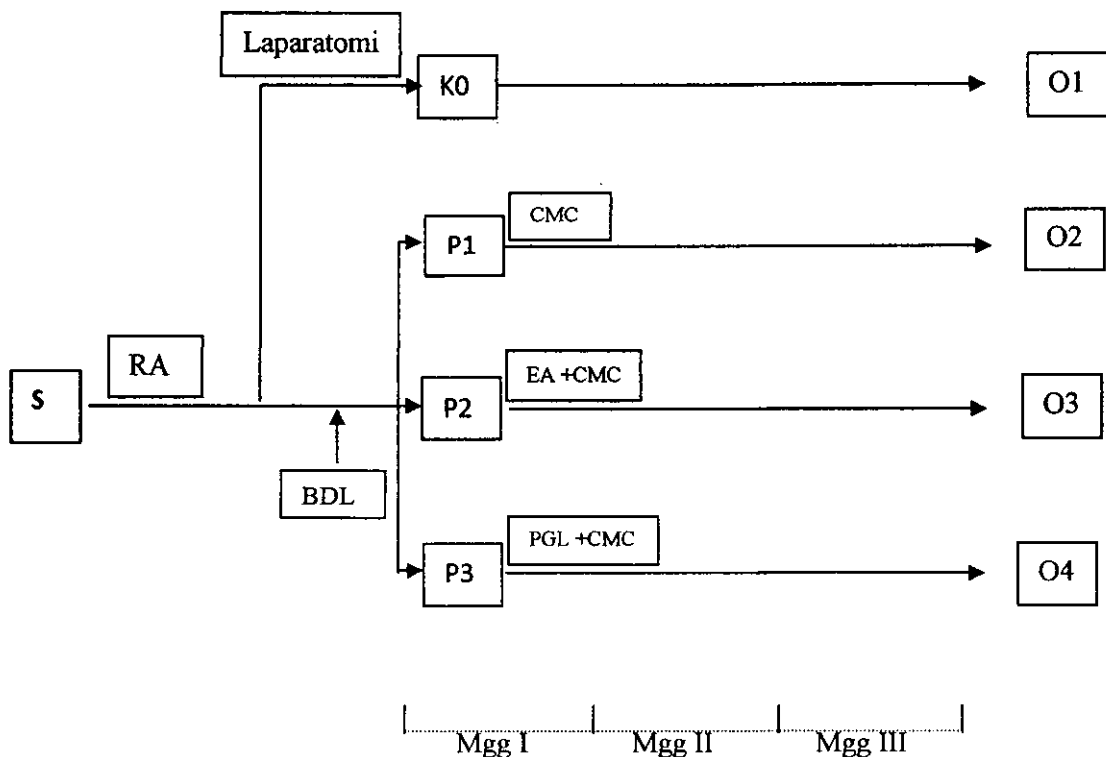
##### 2. Manfaat praktis penelitian

Apabila dalam penelitian ini terbukti bahwa ekstrak buah delima memiliki aktivitas menurunkan derajat fibrosis, maka hasil tersebut dapat digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut pada manusia untuk mengetahui dosis efektif, efektivitas dan efek samping yang ditimbulkan. Manfaat praktis selanjutnya adalah pemanfaatan buah delima sebagai obat herbal yang memiliki aktivitas antifibrotik pada penderita fibrosis hati.

## BAB IV. METODE PENELITIAN

### 1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorium. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *randomized control group - posttest only design*. Sampel maupun perlakuan diusahakan dalam keadaan terkendali dan terukur sehingga pengaruh perlakuan lebih dipercaya. Pengelompokan subjek penelitian dapat dilihat pada gambar berikut :



#### Keterangan :

S : Sampel, tikus putih dengan BDL.

BDL : *Bile duct ligation*.

EA : *Ellagic acid*

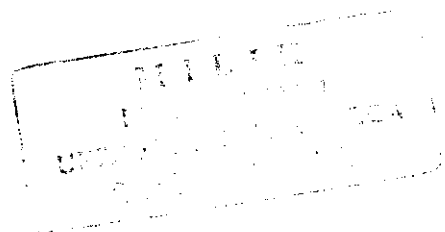
PGL : *Punica granatum Linn* (delima).

RA : *Random allocation*.

K0 : Kelompok tikus putih laparotomi tanpa pemberian ekstrak buah delima, yang diobservasi minggu setelah laparotomi.

P1 : Kelompok tikus putih BDL tanpa ekstrak buah delima yang diobservasi 3 minggu setelah perlakuan.

P2 : Kelompok tikus putih BDL dengan pemberian EA yang diobservasi 3



minggu setelah perlakuan.

- P3 : Kelompok tikus putih BDL dengan pemberian ekstrak buah delima yang diobservasi 3 minggu setelah perlakuan.
- O1 : Observasi pada kelompok K0
- O2 : Observasi pada kelompok P1
- O3 : Observasi pada kelompok P2.
- O4 : Observasi pada kelompok P3.

Catatan :

Dosis *ellagic acid* (EA) yang diberikan adalah 60 g/kgbb/po/hari, diberikan selama 21 hari. Berdasarkan kandungan 40% EA yang terdapat dalam ekstrak buah delima, maka dosis ekstrak buah delima yang diberikan adalah 150 mg/kg bb/hari peroral, dengan volume pemberian maksimal 2 ml, selama 21 hari (Beaussier *et al.*, 2006 ; Devipriya *et al.*, 2007).

## 2. Unit Eksperimen, Replikasi dan Randomisasi

### Unit eksperimen

Unit eksperimen yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* yang diperoleh dari Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Tikus putih digunakan dengan pertimbangan bahwa tikus putih adalah hewan percobaan yang cocok untuk hewan model sirosis dengan teknik ligasi saluran empedu, karena tidak semua hewan percobaan memiliki saluran empedu. Selain itu juga murah, mudah didapat dan mudah dipelihara.

### Randomisasi

Tikus putih jantan sebanyak 50 ekor, berumur 2,5 bulan yang telah disapih dari induknya diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 minggu sebelum digunakan sebagai sampel penelitian. Dalam masa adaptasi, seluruh tikus mendapatkan pakan dasar dan pemeliharaan standar hingga umur dan berat badan memenuhi syarat untuk digunakan dalam penelitian ini. Seluruh tikus disiapkan sebagai hewan model fibrosis liver dengan teknik *bile duct ligation*. Selanjutnya, 32 ekor tikus putih dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan sebagaimana yang terlihat pada rancangan penelitian.

### 3. Variabel Penelitian

Variabel bebas : Jenis perlakuan terhadap hewan percobaan.

Variabel tergantung :

- a. Ekspresi kolagen I hati.
- b. Derajat fibrosis

Variabel Kendali :

- a. Tatalaksana pemeliharaan
- b. Prosedur pembuatan hewan model.
- c. Dosis dan cara pemberian perlakuan.

### 4. Definisi Operasional Variabel

- a. Tikus putih adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Wistar*, jantan, berumur 2,5 bulan dengan berat badan 150 – 200 gram yang diperoleh dari Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- b. Hewan model fibrosis hati adalah *Rattus norvegicus* yang telah mengalami BDL sehingga terjadi kerusakan pada jaringan hati dan menunjukkan tanda-tanda fibrosis 2 hari setelah BDL
- c. Ekstrak buah delima adalah hasil ekstraksi seluruh bagian buah delima (*Punica granatum L*) dalam bentuk serbuk dan telah terstandarisasi mengandung 40% *ellagic acid* yang diproduksi oleh Xi'an Biof Bio-Technology Co., Ltd. (Room 1-1111, High-tech Venture Park, No. 69 Jinye Road, Gaoxin Distric of Xi'an, People Republic of China) (*Certificate of analysis* terlampir).
- d. Dosis ekstrak buah delima adalah jumlah ekstrak buah delima yang diberikan kepada subjek penelitian, yaitu sebesar 150 mg/kg bb/hari sesuai dengan dosis EA sebesar 60 mg/kgbb/po/hari (Devipriya *et al.*, 2007).
- e. Lama dan waktu pemberian ekstrak buah delima adalah lamanya waktu pemberian ekstrak buah delima pada tikus putih sebagai hewan model fibrosis hati, yaitu selama 21 hari. Pemberian dilakukan 2 hari setelah BDL (Beaussier *et al.*, 2006).
- f. Ekspresi kolagen tipe I adalah penilaian positif pemeriksaan preparat dengan teknik imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal anti *col type I*. Penilaian dilakukan secara kuantitatif visual dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali terhadap ketebalan kolagen yang diukur dengan menggunakan mikrometer pada 10 lapangan pandang yang berbeda. Kolagen tipe I merupakan jenis kolagen fibriler yang dapat ditemukan pada hati yang mengalami fibrosis.

- g. Derajat fibrosis hati adalah pengukuran terhadap derajat fibrosis pada hati berdasarkan pada jumlah jaringan fibrous pada hati. Pengukuran dilakukan terhadap derajat fibrosis dengan skor 0–4 (*staging*) menggunakan metode METAVIR. Sediaan histologi dibuat dengan pewarnaan *Trichrome Masson*.

## 5. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang diperlukan dan digunakan dalam penelitian ini adalah :

### Ekstrak Buah Delima Terstandar

Ekstrak buah delima terstandar yang mengandung 40 % *ellagic acid* dan *ellagic acid* 90% diproduksi Xi'an Biof Bio-Technology Co., Ltd. (Room 1-1111, High-tech Venture Park, No. 69 Jinye Road, Gaoxin Distric of Xi'an, People Republic of China). Sebagai pembanding terhadap aktivitas ekstrak buah delima terstandar yang mengandung 40 % *ellagic acid*, pada penelitian ini juga terdapat kelompok perlakuan yang diberi *ellagic acid* 90%.

### Bahan untuk Pembuatan Hewan Model

Bahan penelitian yang diperlukan dalam penelitian ini adalah tikus putih strain *Wistar*, kandang, tempat pakan dan minum, sekam untuk alas kandang, pakan standar, air minum, ketalar, diazepam, alkohol 70%, ampicillin injeksi, *betadine solution*, plester, *savlon*, kasa steril, benang jahit *catgut* 4/0 dan *prolene* 7/0 dan 4/0 serta sonde lambung.

### Bahan Pemeriksaan Laboratorium

Bahan yang diperlukan untuk berbagai pemeriksaan dalam penelitian ini adalah :

- a. Bahan pembuatan preparat dengan pewarnaan *Trichrome Masson* (TM) untuk penilaian derajat fibrosis.
- b. Bahan untuk pembuatan preparat dengan teknik imunohistokimia.

Bahan yang diperlukan adalah jaringan hati, antibodi monoklonal terhadap kolagen tipe I (C 2456), hematoksilin eosin, aseton, *xylol*, alkohol 100%, alkohol 90%, alkohol 80%, alkohol 70%, aquadestilata, *phosphate buffer saline* (PBS), *streptavidin biotin peroxidase*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5%, tripsin 3% dan substrat.

## 6. Instrumen Penelitian

Instrumen yang diperlukan dan digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah :

### Instrumen untuk Pembuatan Hewan Model

Instrumen yang diperlukan adalah *surgical set*, spuit 1 cc, meja operasi, baki plastik, *gloves*, doek steril, bengkok dan kandang pemulihan.

### Instrumen untuk Pemeriksaan Laboratorium

Instrumen yang diperlukan untuk mengamati derajat fibrosis hati dan ekspresi kolagen tipe I adalah gelas objek, mikropipet, inkubator dan mikroskop cahaya.

## 7. Lokasi dan Waktu Penelitian

### Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di beberapa laboratorium yang berbeda. Pembuatan hewan model dilakukan di Rumah Sakit Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Pemeliharaan hewan percobaan dilaksanakan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga. Pembuatan preparat histologi dan imunohistokimia dilakukan di Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Pemeriksaan preparat dilakukan di Lembaga Penyakit Tropis, Universitas Airlangga.

### Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Maret hingga Oktober 2012.

## 8. Kerangka Operasional Penelitian

### Persiapan Penelitian

#### a. Ekstrak buah delima terstandar mengandung 40% *ellagic acid*

Ekstrak buah delima terstandart yang mengandung 40 % *ellagic acid* dan *ellagic acid* 90% diproduksi oleh Xi'an Biof Bio-Technology Co., Ltd. (Room 1-1111, High-tech Venture Park, No. 69 Jinye Road, Gaoxin Distric of Xi'an, People Republic of China). (*Certificate of Analysis* terlampir).

#### b. Persiapan hewan percobaan

Pada penelitian ini digunakan 50 tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain *Wistar* umur 2,5 bulan yang memiliki berat antara 200 – 250 g. Dari jumlah tersebut, sebanyak 45 ekor tikus putih disiapkan sebagai hewan model fibrosis hati

dengan tehnik ligasi saluran empedu (*Bile Duct Ligation* = BDL (Blann *et al.*, 1992).

Tikus putih yang akan digunakan sebagai hewan model fibrosis hati dianesthesi dengan kombinasi ketamine HCl dan diazepam (100 mg : 5 mg, dengan dosis 0,5 ml / kg b.b. intra muskular). Insisi dilakukan pada *midline* abdomen sepanjang kurang lebih setengah dari jarak antara bagian abdomen posterior dengan *cartilago xyphoideus*.

Pada saluran empedu yang terletak 0,5 – 1 cm dari dinding duodenum, dibuat 2 ligasi dengan jarak kurang lebih 0,3 cm menggunakan *prolene* 7/0. Bagian yang terletak diantara dua ligasi dipotong untuk mendapatkan kondisi obstruksi total pada saluran empedu. Selanjutnya saluran empedu yang telah terikat dan terpotong dikembalikan ke dalam rongga abdomen. Muskulus dan kulit abdomen yang telah diinsisi ditutup kembali dengan jahitan terputus menggunakan *catgut* 4/0 dan *prolene* 4/0 (Waynforth *et al.*, 1992; Brandoni and Tores, 2009).

#### c. Perlakuan Terhadap Hewan Percobaan

Perlakuan terhadap hewan percobaan diawali dengan penentuan dosis dan lama pemberian ekstrak ethanol buah delima. Dosis ekstrak buah delima yang dipakai pada penelitian ini adalah 150 mg/kgbb/po/hari. Dosis ini berdasarkan dosis EA yang dapat diberikan selama 21 hari tanpa efek hepatotoksik, yaitu 60 mg/kgbb/hari (Devipriya *et al.*, 2007).

#### d. Pengambilan Jaringan Hati

Pengambilan jaringan hati dilakukan melalui laparatomi. Laparatomi dilakukan setelah hewan percobaan dianesthesi dengan kombinasi ketamine HCl dan diazepam (100 mg : 5 mg, dengan dosis 0,5 ml/kg b.b. intra muskular) untuk mengeksisi hati. Hati diperlakukan sebagaimana mestinya sebagai bahan pemeriksaan derajat fibrosis hati dan ekspresi kolagen tipe I.

#### e. Pemeriksaan Jaringan Hati

Pembuatan preparat untuk pemeriksaan derajat fibrosis hati dilakukan sesuai dengan pembuatan sediaan histologi dengan teknik pewarnaan *Trichrome Masson* (TM) (Hariadi, 2000). Penentuan derajat fibrosis hati dilakukan dengan metode *METAVIR system*.

Tabel 4.1 *METAVIR system*<sup>1)</sup>

Skoring Fibrosis	
Skor	Deskripsi
0	Tidak terjadi fibrosis
1	Terdapat pembesaran traktus portal tanpa septa
2	Terdapat pembesaran traktus portal dengan beberapa septa
3	Terdapat banyak septa tanpa sirosis
4	Sirosis

<sup>1)</sup> Brunt, 2000.

#### f. Pembuatan preparat imunohistokimia

Pembuatan preparat dengan teknik imunohistokimia dilakukan untuk pemeriksaan ekspresi kolagen tipe I. Teknik pewarnaan imunohistokimia yang digunakan adalah teknik *biotin streptavidin amplified*.

Ekspresi kolagen tipe I adalah penilaian positif pemeriksaan preparat dengan teknik imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal kolagen tipe I. Penilaian dilakukan secara kuantitatif visual dengan mikroskop cahaya. Penilaian dilakukan secara kuantitatif visual dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali terhadap ketebalan kolagen yang diukur dengan menggunakan mikrometer pada 10 lapangan pandang yang berbeda (Soresi *et al.*, 2006).

#### 9. Cara Pengolahan dan Analisis Data

Pengumpulan data dilakukan dalam lingkungan yang terkontrol dan terkendali dengan asumsi semua kondisi diusahakan sam dan dapat dikendalikan. Urutan analisis data:

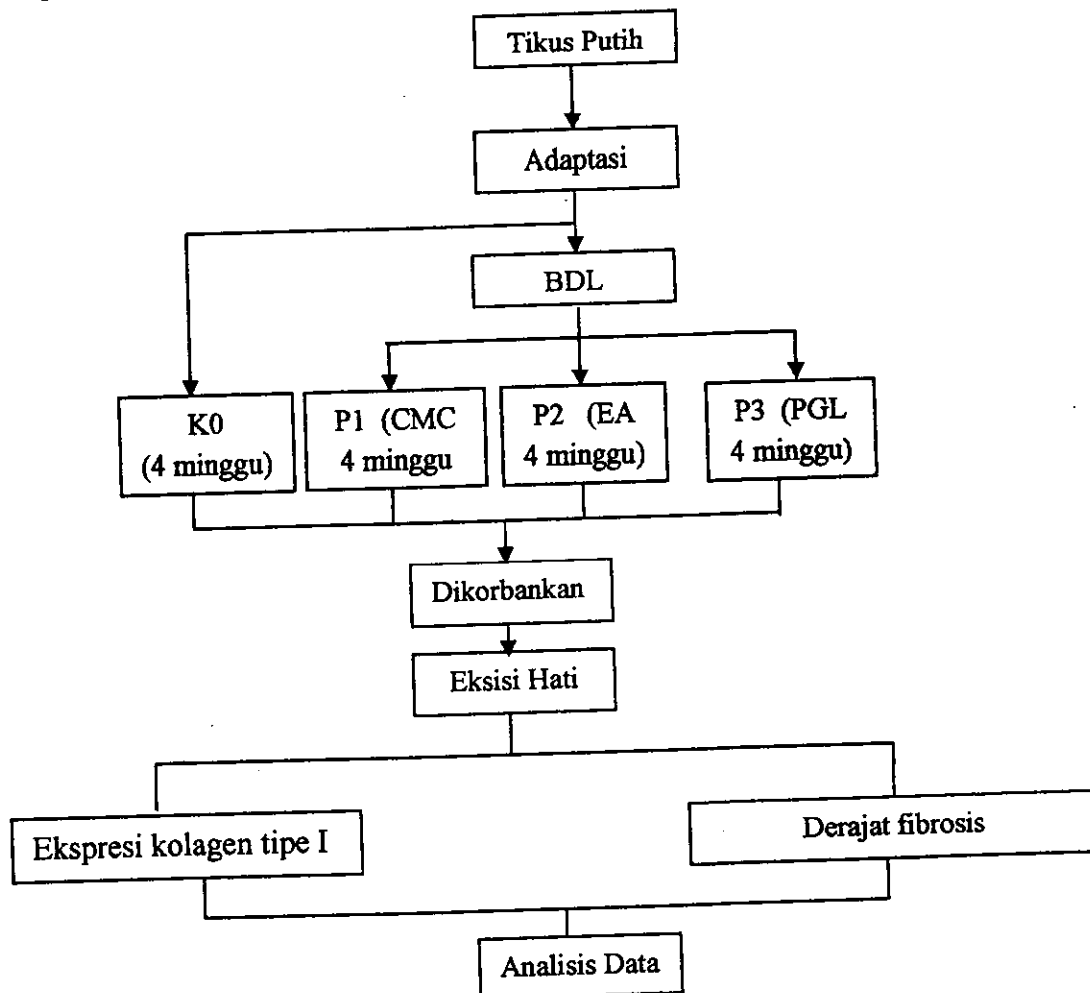
- a. **Uji Normalitas:** Untuk menguji bahwa variabel penelitian dengan skala data interval atau rasio yang diperiksa dalam penelitian ini berdistribusi normal.
- b. **Uji Homogenitas:** Untuk meyakinkan bahwa sampel berasal dari populasi yang homogen. Variabel yang diuji homogenitasnya adalah berat badan tikus. Uji statistik yang digunakan adalah ANOVA satu arah.
- c. **Uji Analysis of Varians (ANOVA):** terhadap variabel yang diteliti.



d. Uji Komparasi Ganda atau *Least Significans Difference (LSD)*: Digunakan untuk membandingkan pengaruh perlakuan antar kelompok perlakuan.

Tingkat kemaknaan uji statistik yang dipergunakan dalam penelitian ini sebesar 0,05. Data yang telah dikumpulkan diolah secara manual dan menggunakan perangkat lunak komputer program SPSS.

### Kerangka Operasional Penelitian

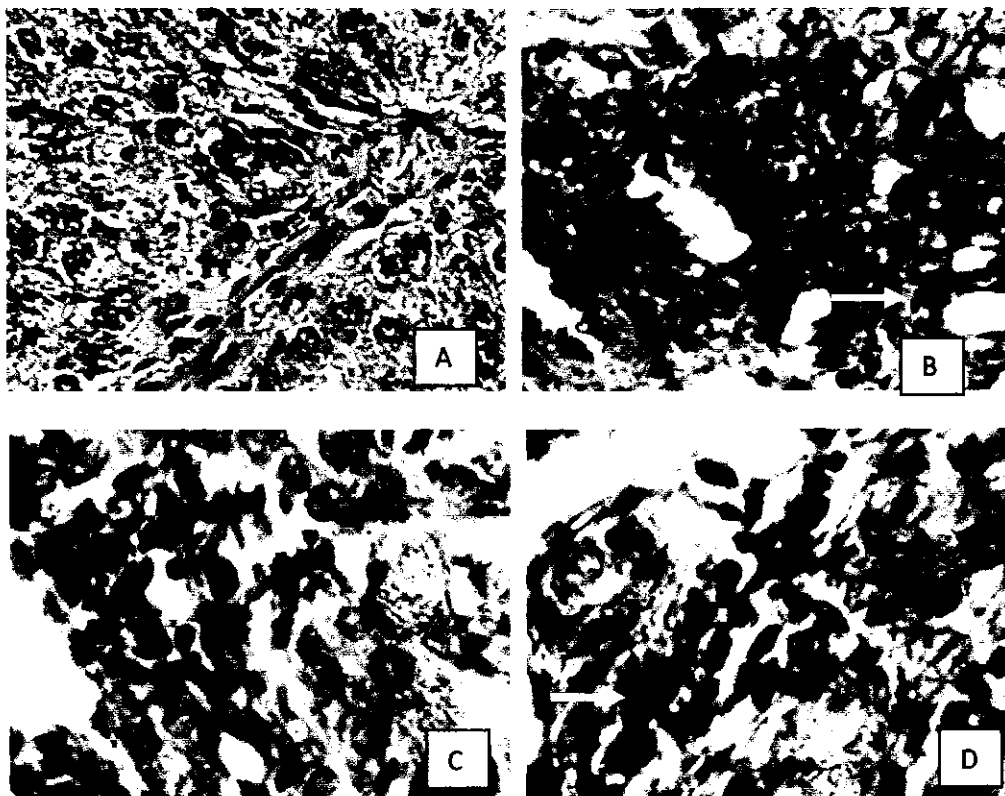


## BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknik imunohistokimia digunakan untuk memeriksa ekspresi kolagen tipe I pada jaringan hati. Identifikasi ekspresi kolagen tipe I bertujuan untuk mengamati proses fibrogenesis pada jaringan hati baik pada kelompok kontrol maupun pada kelompok perlakuan.

### 1. Ekspresi Kolagen tipe I

Pemeriksaan preparat pada kelompok P0, tidak tampak ekspresi kolagen tipe I (Gambar 1A). Pada Gambar 1 terlihat bahwa ekspresi kolagen tipe I paling kuat terjadi pada kelompok P1 (Gambar 1B) dan terlihat mengalami hambatan peningkatan setelah pemberian EA (Gambar 1C) maupun ekstrak buah delima terstandar (Gambar 1D). Hasil pemeriksaan preparat dengan teknik imunohistokimia menunjukkan bahwa pemberian *ellagic acid* (EA) (P2) maupun ekstrak buah delima terstandart (P3) dapat menghambat peningkatan ekspresi kolagen tipe I pada sel-sel penyusun hati.



Gambar 5.1. Gambaran Ekspresi Kolagen Tipe I pada Hati (Imunohistokimia dengan antibodi poliklonal terhadap kolagen tipe I, 400X)

Keterangan :           (Negatif)           (Positif)

Sebelum melakukan analisis statistik, terlebih dahulu dilakukan uji homogenitas terhadap subjek penelitian (Tabel 1).

Tabel 5.1. Uji Homogenitas Subjek Penelitian Berdasarkan Berat Badan Awal dan Akhir Tikus Percobaan

Kelompok (n = 8)	Berat Badan Awal (Gram)	Berat Badan Akhir (Gram)
	Mean ± SD	Mean ± SD
P0 (Kontrol)	175,00 ± 15,35	195,63 ± 17,61
P1 (BDL)	169,38 ± 16,57	170,63 ± 14,25
P2 (BDL + EA)	173,75 ± 16,64	190,00 ± 31,17
P3 (BDL + PGL)	186,88 ± 17,10	199,38 ± 28,59
Total (n = 32)	176,25 ± 16,94	188,91 ± 25,42
F	1,660	2,271
p	0,198	0,102

Uji homogenitas yang dilakukan dengan menggunakan *Oneway Anova* menunjukkan bahwa berat badan sebelum dan setelah perlakuan antar kelompok perlakuan memiliki variasi yang homogen ( $p = 0,198$  dan  $p = 0,102$ ).

Hasil analisis terhadap jumlah sel yang mengekspresikan kolagen tipe I menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara P0 dengan P1, P2 dan P3 ( $p < 0,05$ ), tetapi antara P2 dan P3 tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) Tabel 2.

Tabel 5.2. Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Kolagen I pada Hewan Percobaan

Kelompok (n = 8)	KOLAGEN I
P0 (Kontrol)	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
P1 (BDL)	5,19 <sup>c</sup> ± 0,72
P2 (BDL + EA)	2,73 <sup>b</sup> ± 0,68
P3 (BDL + PGL)	2,53 <sup>b</sup> ± 0,43

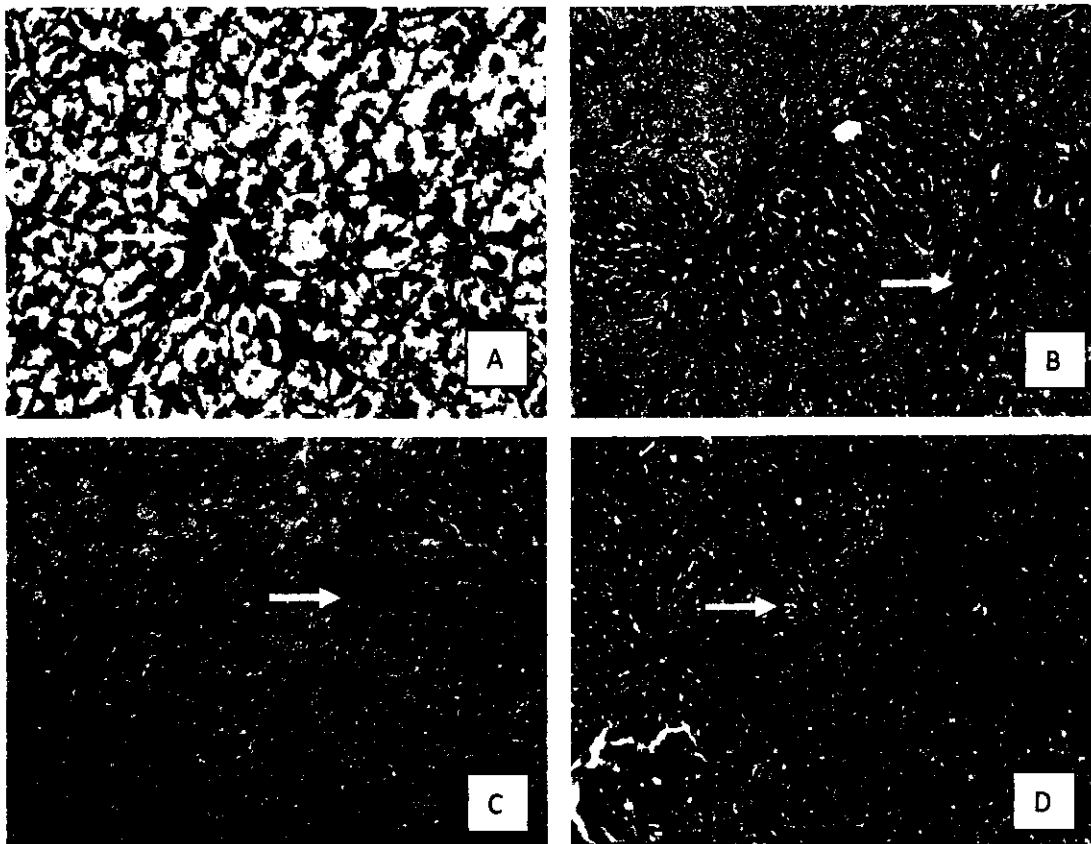
Keterangan : Superskrip dengan huruf yang berbeda pada kolom yang sama berarti berbeda nyata ( $p < 0,05$ )

Hasil pemeriksaan preparat dengan teknik imunohistokimia menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah delima terstandart (P3) dapat menurunkan ketebalan kolagen tipe I pada hati. Penurunan ketebalan kolagen tipe I pada kelompok P3 ( $2,53 \pm 0,43$ ) berbeda secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok P0 ( $0,00 \pm 0,00$ ) dan P1 ( $5,19 \pm 0,72$ ) ( $p < 0,05$ ), namun tidak dengan kelompok P2 ( $2,73 \pm 0,68$ ) ( $p > 0,05$ ).



## 2. Derajat Fibrosis Hati

Evaluasi derajat fibrosis dengan menggunakan *METAVIR system* menunjukkan bahwa pada kelompok P0 (kelompok tikus putih laparatomi yang diberi larutan CMC 0,3% dan diobservasi 3 minggu setelah perlakuan), terdapat gambaran jaringan fibrous di sekitar vena sentralis dengan rata-rata skor derajat fibrosis 1,000 (Gambar 2A). Sementara itu, pemeriksaan preparat hati pada kelompok P1 menunjukkan peningkatan jaringan fibrosis pada hati. Perubahan tersebut ditandai dengan terbentuknya septa fibrosis yang disertai dengan *bridging* fibrosis, perubahan arsitektur hati berupa hilangnya bentuk lobulus hati normal dengan rata-rata skor derajat fibrosis 2,625 (Gambar 2B). Sementara pengamatan pada kelompok P2 dan P3 menunjukkan penurunan jaringan fibrosis hati bila dibandingkan dengan kelompok P1 dengan skor derajat fibrosis masing-masing 2,250 dan 1,875 (Gambar 2C dan 2D).



Gambar 5.2. Gambaran Derajat Fibrosis Hati (*Trichrome Masson's*, 100X)

Keterangan :        Septa fibrosis

Derajat fibrosis pada kelompok P3 merupakan yang terendah dan berbeda nyata bila dibandingkan dengan kelompok P1 ( $p < 0,05$ ), namun tidak berbeda nyata dengan kelompok P2 ( $p > 0,05$ ) Demikian juga untuk kelompok P2 yang tidak berbeda nyata dengan kelompok P1. Perbandingan rerata dan simpangan baku hasil skoring derajat fibrosis pada jaringan hati hewan percobaan terlihat pada Gambar 2 dan Tabel 3. Hasil pengamatan juga menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah delima memiliki kemampuan menurunkan progresivitas proliferasi saluran empedu. Proliferasi saluran empedu terlihat paling progresif pada kelompok P1 dan terlihat berkurang pada kelompok P2 dan P3.

Tabel 5.3. Rerata dan Simpangan Baku Skoring Derajat Fibrosis Hati

Kelompok (n = 8)	Skoring Derajat Fibrosis	Median
	Mean $\pm$ SD	
P0 (Laparotomi)	1,000 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0000	1,00 <sup>a</sup>
P1 (Laparotomi + BDL)	2,625 <sup>c</sup> $\pm$ 0,5175	3,00 <sup>c</sup>
P2 (Laparotomi + BDL + EA)	2,250 <sup>bc</sup> $\pm$ 0,2949	2,00 <sup>bc</sup>
P3 (Laparotomi + BDL + PGL)	1,875 <sup>b</sup> $\pm$ 0,6667	2,00 <sup>b</sup>

Keterangan : Superskrip dengan huruf yang berbeda pada kolom yang sama berarti berbeda nyata ( $p < 0,05$ )

### 3. Efek Ekstrak Buah Delima terhadap Ekspresi Kolagen Tipe I

Fibrosis hati terjadi karena peningkatan sintesis kolagen. *Hydroxyproline* adalah senyawa karakteristik kolagen yang disekresikan oleh HSCs yang teraktivasi. Oleh karena itu, jumlah kolagen dapat digunakan sebagai indikator derajat fibrosis hati yang terjadi (Zhang *et al.*, 2008). Penelitian ini menunjukkan bahwa telah terjadi peningkatan ketebalan kolagen tipe I pada kelompok P1 bila dibandingkan dengan kelompok P0, P2 dan P3. Namun tidak terdapat perbedaan ketebalan kolagen tipe I antara kelompok P2 dan P3. Hasil ini telah dibandingkan dengan hasil skoring derajat fibrosis hati pada preparat yang diwarnai dengan teknik pewarnaan *Trichrome Masson's*. Hasil menunjukkan bahwa EA dan ekstrak buah delima terstandar dapat mengurangi deposisi dan mencegah perkembangan fibrosis hati lebih lanjut. Ekstrak buah delima terstandar memberikan hasil yang baik sebagaimana pemberian EA.

*Hepatic stellate cells* yang teraktivasi akan berubah menjadi *myofibroblast like cells*, yang berperan dalam proses peningkatan deposisi kolagen. Bila kolagen tipe I mengalami penurunan, berarti telah terjadi penurunan jumlah HSCs yang teraktivasi atau regresi HSCs ke dalam status tidak aktif (*quiescent*) (Iradale, 2001). Penurunan deposisi

kolagen tipe I yang diproduksi oleh HSCs juga melibatkan aktivitas kelompok *matrix metalloproteinases* (MMPs) (Han, 2006).

Aktivitas MMPs dan perkembangan fibrosis hati diatur melalui ekspresi TIMPs yang secara simultan juga dihasilkan oleh HSCs untuk menghambat aktivitas MMPs dalam mendegradasi matriks ekstraseluler (Iradale, 2001). Selama proses resolusi fibrosis, kadar TIMPs mengalami penurunan, sementara aktivitas MMPs dan apoptosis HSCs mengalami peningkatan (Woesner, 1991). Keterbatasan dalam penelitian ini adalah tidak dilakukannya pengukuran terhadap aktivitas MMP-1, ekspresi TIMP-1 dan aktivitasnya.

#### 4. Efek Ekstrak Buah Delima Terstandar terhadap Derajat Fibrosis Hati

*Bile duct ligation* pada tikus merupakan model yang ideal bila ditinjau dari aspek klinis maupun histopatologi untuk menggambarkan fibrosis hati sekunder hingga obstruksi bilier ekstrahepatik pada manusia (Soylu *et al.*, 2006).

Perbaikan fibrosis hati pada umumnya berhubungan dengan penurunan reaksi nekroinflamasi, namun tidak semua hasil penelitian mengindikasikan bahwa penurunan derajat fibrosis disebabkan karena penurunan reaksi nekroinflamasi. Penelitian tentang pemberian kombinasi vitamin C dan E menunjukkan bahwa walaupun terjadi penurunan derajat fibrosis, tetapi tidak disertai dengan perbaikan inflamasi pada penderita *nonalcoholic steatohepatitis* (NASH) (Harrison *et al.*, 2003).

Selain melalui jalur inflamasi, aktivitas antifibrotik juga dapat terjadi melalui aktivitas lain yang mengganggu proses fibrogenesis. Misalnya, efek antifibrotik *sylimarin* yang terjadi melalui penurunan regulasi sintesis kolagen tipe I (Jia *et al.*, 2001). *Ellagic acid* memiliki kemampuan untuk menginduksi apoptosis HSCs (Masamune *et al.*, 2005).

Tanaman atau ekstrak buah adalah campuran berbagai senyawa yang kompleks dan dalam penelitian tidak jelas apakah senyawa tunggal atau campuran senyawa yang bertanggung jawab terhadap efek yang diamati (Schafer *et al.*, 2005). Namun, beberapa penelitian telah membuktikan bahwa senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak buah memiliki kemampuan saling meningkatkan efek biologis masing-masing. Sebagai contoh, telah dilaporkan bahwa EA dan *quercetin* (keduanya juga terdapat dalam buah delima) yang diberikan secara bersama-sama menunjukkan hambatan yang lebih kuat terhadap pertumbuhan sel kanker daripada bila diberikan secara individual (Seram *et al.*, 2005).

*Polyphenol* yang terkandung dalam ekstrak buah delima memiliki aktivitas antioksidan dan hepatoprotektif baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. *Ellagic acid*, *oleanolic*

*acid* dan *ursolic acid* yang terdapat dalam buah delima telah terbukti memiliki efek hepatoprotektif, baik pada kerusakan hati akut akibat induksi bahan kimia maupun kronis seperti pada kasus fibrosis maupun sirosis hati. Hal ini diduga karena aktivitas bahan-bahan tersebut sebagai agen antioksidan dan atau antiinflamasi (Liu, 2005)

Dalam penelitian ini, pemberian EA dan ekstrak buah delima terstandar dapat menghambat peningkatan derajat fibrosis pada hati. Berdasarkan hasil analisis statistik, antara kelompok yang diberi EA dengan kelompok yang diberi ekstrak buah delima memang tidak berbeda secara signifikan. Namun demikian, mengingat bahwa data yang dianalisis bukan merupakan data kontinyu yang linier, maka perbedaan hasil skoring memberikan implikasi klinis yang cukup penting. Selain itu, pada penelitian yang sama terbukti bahwa aktivitas antiinflamasi yang dimiliki oleh EA tidak sekuat ekstrak buah delima dalam menghambat peningkatan ekspresi *interleukin-6* (IL-6) dan *transforming growth factor-beta 1* (TGF- $\beta$ 1).

*Ellagic acid*, senyawa dimer yang merupakan derivat *gallic acid*, berada dalam buah delima dalam bentuk bebas sebagai *ellagic acid-glycosides* atau terikat dalam bentuk *ellagitannins* (Seeram *et al.*, 2004). Setelah diberikan secara per oral kepada tikus, 15% EA diekskresikan dalam bentuk metabolitnya melalui urin dan feses. Rendahnya aktivitas dan konsentrasi EA dalam plasma disebabkan karena kelarutannya yang rendah dalam air. Selain itu juga diduga disebabkan karena EA mudah mengalami transformasi dan degradasi sebelum diabsorpsi. Metabolisme EA yang tidak larut dalam intestinal disebabkan oleh aktivitas mikroflora yang berada di dalam intestinal. Hasil metabolisme EA adalah *uroolithin A* dan B (Seeram, *et al.*, 2004).

Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa bioavailabilitas ekstrak buah delima lebih baik bila dibandingkan dengan pemberian senyawa tunggal secara individual. Hal ini menggambarkan pengaruh multi faktor dan efek sinergis berbagai senyawa yang terkandung dalam buah delima (Seeram *et al.*, 2005). Keberadaan *polyphenol* dalam buah delima dapat meningkatkan kelarutan dan absorpsi *ellagic acid* dalam saluran pencernaan. Selain itu, *polyphenol* yang terdapat dalam ekstrak buah delima juga memiliki kemampuan untuk menghambat metabolisme EA oleh mikroflora intestinal menjadi *urothilin A* dan B melalui aktivitas antibakterial yang dimiliki (Seeram *et al.*, 2006). Konsentrasi EA yang lebih tinggi menyebabkan hambatan proses aktivasi HSCs untuk mensintesis kolagen tipe I, sehingga menyebabkan penurunan derajat fibrosis pada hati.



## BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan :

Berdasarkan analisis hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa : ekstrak buah delima terstandar terbukti memiliki efek antifibrotik dengan cara menghambat :

1. peningkatan ekspresi kolagen tipe 1
2. perkembangan derajat fibrosis hati

pada hewan percobaan yang mengalami fibrosis hati yang diinduksi dengan teknik *bile duct ligation*.

### Saran :

1. Perlu penelitian lanjutan untuk mengevaluasi peran berbagai sitokin dan *growth factor* lain serta perilaku sel penyusun hati pada fibrosis hati.
2. Perlu penelitian lebih lanjut tentang pemanfaatan ekstrak buah delima terstandar, baik dalam optimalisasi bentuk sediaan maupun pemanfaatannya dalam uji preklinik maupun klinik bagi penderita fibrosis hati.
3. Melakukan penelitian lanjutan untuk menentukan kandungan senyawa lain dalam ekstrak buah delima terstandar yang memiliki kemampuan meningkatkan potensi dan aktivitas *ellagic acid*.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Aviram D and Dornfeld L, 2001. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduced systolic blood pressure. *Atherosclerosis* 158:195-198.
- Aviram M, Volkova N, Coleman R, Dreher M, Reddy MK, Ferreira D, Rosenblat M, 2008. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient (E0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. *J Agric Food Chem* 56 (3):56-63.
- Battaller R and Brenner DA, 2005. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115(2): 209-218.
- Beaussier M, Wendum D, Schiffer E, Dumont S, Rey C, Lienhart A, Housset C, 2007. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestasis injury. *J of Lab Invest* 87:3-14.
- Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ, 2003. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab Invest* 83: 655-663.
- Cerda B, Soto C, Albaladejo MD, Martinez P, Sanchez-Gascon F, Tomas-Baiberan F, Espin JC, 2006. Pomegranate juice supplementation in chronic obstructive pulmonary disease: a 5-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Nutr.* 60 (2):33-40.
- Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Singh RP, 2002. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *J Agri Food Chem* 50:23-28.
- Devipriya N, Srinivasan M, Sudheer A R and Menon V P, 2007. Effect of ellagic acid, a natural polyphenol on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance : a drug dose dependent study. *Singapore Med J Original article*, 48 (4) : 311-318.
- Esmaeelzadeh A, Tahbaz S, Gaieni I, 2006. Cholesterol-lowering effect of concentrated pomegranate juice consumption in type II diabetic patient with hyperlipidemia. *Int J Vitam Nutr Res* 76:147-151
- Gutierrez-Ruiz C, Robles-Diaz G, Kershenovich D, 2002. Emerging concepts in inflammation and fibrosis. *Archives of medical research* 33: 595-599.
- Guo C, Wei J, Yang J, 2008. Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subject. *Nutr Res* 28:72-77.
- Han, Y.P., 2006. Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21, S88-91.i

- Harrison SA, Torgerson S, Hayashi P, Ward J, Schenker S. Vitamin E and Vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:2485-2490
- Heidebaugh JJ and Sherbondy M, 2006. Cirrhosis and chronic liver failure. Part II : Complication and treatment. *Am Fam Physician* 74:765-74.
- Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 127:526-537, 2007.
- Huang T, Yang Q, Harada M, Li G, Yamahara J, Roufogalis B and Li Y, 2005. Pomegranate flower extract diminishes cardiac fibrosis in Zucker diabetic fatty rat : Modulation of cardiac endothelin-1 and nuclear factor kappa B pathway. *J of Cardiovasc Pharm* 46 (6): 856-862.
- Iradale JP, 2001. Stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 21:427- 436.
- Jia JD, Bauer M, Cho JJ, Ruehl M, Milani S, Boigk G, Riecken EO, Schuppan D. Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I) and TIMP-1. *J Hepatol* 2001; 35: 392-39834
- Jurenka J, 2008. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L.*): A Review. *Alternative medicine review*, 13(21) 128-144.
- Kahraman A, Bronk SF, Cazanave S, Werneburg NW, Mott JL, Contreras PC and Gores GJ, 2009. Matrix metalloproteinase inhibitor, CTS-1027, attenuates liver injury and fibrosis in the bile duct-ligated mouse. *Hepatology research* 39: 805-8 13.
- Kasai K, Yoshimura M, Koga T, Arai M, Kawasaki S, 2006. Effects of oral administration of ellagic acid-rich pomegranate extract on ultraviolet-induced pigmentation in the human skin. *J Nutr Sci Vitamol.* 52: 21-26.
- Khalil EA., 2004. Antidiabetic effect of an aqueous extract of pomegranate (*Punica granatum L.*) peels in normal and alloxan diabetic rats *Egyptian J Hosp Med*;16:92-99
- Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF, Brenner DA, 2006. Bone marrow-derived fibrocytes in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol* 45:429-438.
- Kisseleva T and Brenner D A, 2008. Fibrogenesis mechanism. *Exp Biol Med* 233(2) 109-122.
- Knittel T, Kobold D, Saile B, Grundmann A., Neubauer K, Piscaglia F, Ramadori G, 1999. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells : different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 117:1205-1221, 1999
- Kumar V, Abbas AK and Pausto N, 2005. Tissue renewal and repair: regeneration, healing and fibrosis. Elsevier Saunders, Philadelphia, pp 87-118.

- Kuwano K, Hagimoto N, Nakanishi Y, 2004. The role of apoptosis in pulmonary fibrosis. *Histopathol* 19:867-881.
- Lansky EP, Jiang W, Mo H, 2005. Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Invest New Drugs*, 23:11-20
- Lansky EP and Newman RA, 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 109:177-206.
- Liu SQ, Yu JP, Chen HL, Luo HS, Chen SM and Yu HG. Therapeutic Effects and Molecular Mechanisms of Ginkgo Biloba Extract on Liver Fibrosis in Rats. *The American Journal of Chinese Medicine*, Vol. 34, No. 1, 99-114, 2006.
- Malik A, Afaq F, Srfaras S, 2005. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc Nail Acad Sci* 102: 35-42.
- Malik A dan Mukhtar H. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit *Cell Cycle* 5: 45-51.
- Oh WY, Pyo S, Lee KR, Lee BK, Shin DH, Cho SI and Lee SM, 2003. Effect of *Holotrichia diomphalia* larvae on liver fibrosis and hepatotoxicity in rats. *J of Ethnophar.* 87: 175-180.
- Pantuck AJ, Leppert JT, Zomorodian N, 2006. Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 12:87-94.
- Parola M, Leonarduzzi G Robino G, Albano E, Poli G, Dianzani MU. On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Radic Biol Med* 20:351-359. 1996.
- Parola M and Pinzani M, 2009. Hepatic wound repair. *Fibrogenesis and Tissue repair* 2(4): 1-6.
- Quan TE, Cowper SE, Bucala R, 2006. The role of circulating fibrocytes in fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 8:145-150.
- Reeves HL and Friedman SL, 2002. Activation of HSC- A key issue in liver fibrosis. *Bioscience* 7: d808-826.
- Sartippour MR, Seeram NP, Rao JY, Moro A, Harris DM, Henning SM Firouzi A, Rettig MB, Aronson WJ, Pantuck AJ, Heber D, 2008. Ellagitannin-rich pomegranate extract inhibits angiogenesis in prostate cancer in vitro and in vivo. *Tnt J. Oncol* 32(2): 43-50.
- Schafer A, Chovanova Z, Muchova J, Sumegova K, Liptakova A, Durackova Z, Hogger P: Inhibition of COX-1 and COX-2 activity by plasma of human volunteers after ingestion of French maritime pine bark extract (Pycnogenol). *Biomed Pharmacother* 2005, 60(1):5-9.

- Schubert YS, Lansky EP, Neeman I, 1999. Antioxydant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol* 66:11-17
- Serram NP, Lee R and Heber D, 2004. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice *Clinica Chimica Acta* 348 (2004) 63–68
- Seeram N, Lee R, Hardy M and Heber D, 2005. Rapid large scale of ellagitannin pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. Separation and purification technology (41); 49 – 55.
- Seeram NP, Schulman RN, Heber D, 2006. Pomegranate Ancient Roots to Modern Medicine. 1<sup>st</sup> Ed. Taylor and Francis Group, New York, 2-99.
- Senoo H., Kojima N, Sato M, 2007. Vitamin A-storing cells (stellate cells). *Vitam Horm* 75:131-159.s
- Song F, Wisithphrom K, Zhou J, Windsor LJ, 2006. Matrix metalloproteinases : dependent and independent collagen degradation. *Front Biosci* 11:3100-3120.
- Soylu AR, Aydogdu N, Basaran UN, Altaner S, Tarcin O, Gedik N, Umit H, Tezel A, Dokmeci G, Baloglu H, Ture M, Kutlu K, Kaymak K. Antioxidants vitamin E and C attenuate hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats. *World J Gastroenterol* 2006 November 14; 12(42): 6835-6841
- Steen V, 2006. Targeted therapy for systemic sclerosis. *Autoimmun rev* 5:122-124.
- Suzuki N, Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K and Shimosegawa T. 2009. Ellagic acid inhibits pancreatic fibrosis in male wistar Bonn/Kobori rats. *Dig. Dis. Sci.* 54:802-810.
- Toklu HZ, Dumlu MU, Sehirli O, Ercan F, Gedik N, Gokmen V and Sener G, 2007. Pomegranate peel extract prevent liver fibrosis in biliary-obstructive rats. *J Pharm Pharmacol*, 59 (2): 1287-1295.
- Woessner, J.F., 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. *FASEB J.* 5, 2145–2154
- Xia JL, Dai C, Michalopoulos GK, Liu Y, 2006. Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Am J Pathol* 168:1500-1512.
- Yoon YH, Yi H, Grand BF, 2000. Surveillance Report 360: Liver Cirrhosis Mortality in United State, 1970-1999.
- Zhang BJ, Xu D, Guo Y, Ping J, Chen L and Wang H, 2008. Protection by and Antioxidant Mechanism of Berberine against Rat Liver Fibrosis Induced by Multiple

Hepatotoxic factors. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 35, 303–309.

Zeisberg M and Kalluri R, 2004. The role of epithelial to mesenchymal transition in renal fibrosis. *JMol Med* 82:175-181.

**LAMPIRAN 1****Biodata Peneliti**

1. Nama lengkap dengan gelar : Wiwik Misaco Yuniarti, drh., M Kes.
2. Umur/jenis kelamin/agama : 42 tahun/Perempuan/Islam.
3. Alamat/Bagian/Fakultas : Bagian Klinik Veteriner, Fakultas Kedokteran hewan, Universitas Airlangga.
4. Pangkat/golongan/NIP. : Penata / IVa / 19690601 199603 2001
5. Jabatan pokok : Lektor Kepala
6. Kesatuan/Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga.
7. Alamat kantor : Fakultas Kedokteran Hewan  
Kampus C Universitas Airlangga  
Jln Mulyorejo, Surabaya  
Telp.: 031-5927832; Fax : 031  
E-mail : wiwikmisaco@yahoo.com

## 8. Riwayat Pendidikan Tinggi :

No.	Macam Pendidikan	Tempat	Tahun Dari Sampai	Bidang spesialis	Titel/ Ijasah
1	Strata 1	FKH Unair	1987 - 1994	Profesi Dokter Hewan	Ijasah
2	Strata 2	Pascasarjana Unair	2004 - 2007	Mikrobiologi Kedokteran	Ijasah

## 9. Riwayat Penelitian

## RIWAYAT PENELITIAN

Tahun	Judul Penelitian	Ketua/anggota Tim	Sumber Dana
2004	Penggunaan Teknik Bile Duct Ligation pada Tikus Putih Jantan ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Strain Wistar untuk Membuat Hewan Model Sirosis Hepatik	Anggota	Mandiri
2004	Tehnik Pencegahan Adhesi Setelah Operasi Organ Visceral	Anggota	Mandiri
2005	Gambaran Ultrastruktur Endotel Aorta Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Sebagai Hewan Model Sirosis Setelah Diinduksi dengan Endotoksin	Ketua	Mandiri
2005	Gambaran Histopatologi Aorta Tikus Putih yang Mengalami Sirosis setelah Perlakuan Endotksin <i>Escherichia coli</i> O55 : B5.	Anggota	Mandiri
2006	Kadar Bilirubin Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Sebagai Hewan Model Sirosis Setelah Diinduksi dengan Endotoksin	Ketua	Mandiri
2006	Upaya Pencegahan Perlekatan Organ Viseral dan Proliferasi Fibroblas pada Kelinci dengan Pemberian Metilprednisolon, Difenhidramin atau Kombinasi Keduanya	Anggota	Mandiri
2006	Pengaruh Pemberian Suplementasi Kalsium Karbonat Dosis Tinggi pada Tikus Putih Ovariohisterektomi Terhadap Mineralisasi Ginjal.	Ketua	DIPA-PNPB Unai
2007	Gambaran Histopatologik Ginjal Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Pasca Ovariohisterektomi dengan Suplemen Kalsium Karbonat Dosis Tinggi.	Ketua	Mandiri



## 10. Riwayat Pekerjaan

1. Dosen Fakultas Kedokteran Gigi Hewan sejak Maret 1996.
2. Organisasi profesi :

Tahun	Jenis/ Nama Organisasi	Jabatan/jenjang keanggotaan
1998-sekarang	Perhimpunan Dokter Hewan Indonesia (PDHI)	Anggota
2005-sekarang	Asosiasi Dokter Hewan Praktisi Hewan Kecil Indonesia (ADHPHKI)	Anggota

## 11. Riwayat Publikasi

### a. Jurnal

Tahun	Judul	Penerbit/Jurnal
2005	Gambaran Ultrastruktur Endotel Aorta Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Sebagai Hewan Model Sirosis Setelah Diinduksi dengan Endotoksin.	Gambaran Ultrastruktur Endotel Aorta Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Sebagai Hewan Model
2006	Penggunaan Teknik Bile Duct Ligation pada Tikus Putih Jantan ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Strain Wistar untuk Membuat Hewan Model Sirosis Hepatik.	Disampaikan pada Kongres XV PDHI dan Konferensi Ilmiah Veteriner Nasional IX, Tanggal 11 – 14 Juli 2006.
2006	Kadar Bilirubin Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Sebagai Hewan Model Sirosis Setelah Diinduksi Dengan Endotoksin.	Media Kedokteran Hewan Vol 22 No. 1, Januari 2006, Hal 6-9.
2006	Upaya Pencegahan Perlekatan Organ Visceral dan Proliferasi Fibroblas dengan Pemberian Metilprednisolon, Difenhidramin HCl atau kombinasi keduanya.	Media Kedokteran Hewan, Vol 22 No. 1, Januari 2006, Hal 17-20. ISSN 2015-8930.
2008	Pengaruh Pemberian Suplementasi Kalsium Karbonat Dosis Tinggi pada Tikus Putih Ovariohisterektomi Terhadap Mineralisasi Ginjal.	Jurnal Veteriner, Vol 9 No. 2, Juni 2008, Hal 73-78. ISSN : 1411-8327.

2008	Gambaran Histopatologi Aorta Tikus Putih yang Mengalami Sirosis setelah Perlakuan Endotoksin <i>Escherichia coli</i> O55 : B5.	Jurnal Veteriner, Vol 9 No. 3, September 2008, Hal 135-140.
2008	Gambaran Histopatologik Ginjal Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Pasca ovariohisterektomi dengan Suplemen Kalsium Karbonat Dosis Tinggi.	Jurnal Penelitian Medika Eksakta. Vol 8 No. 1, April 2009. Hal 31-38. ISSN : 1411-6626.

**b. Makalah/Poster**

Tahun	Judul	Penyelenggara
2005	Teknik Pencegahan Adhesi setelah Operasi Organ Visceral	PDHI - Yogyakarta
2006	Penggunaan Teknik Bile Duct Ligation pada Tikus Putih Jantan ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Strain Wistar untuk Membuat Hewan Model Sirosis Hepatik.	PDHI - Jakarta

Surabaya, 29 Oktober 2012

Wiwik Misaco Yuniarti, M Kes., Drh.

NIP. 19690601 199603 2001



## LAMPIRAN 3

# Bio F

## XI'AN BIOF BIO-TECHNOLOGY CO., LTD CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name: Pomegranate extract Extract powder

Origin of Material: China

Part Used: Whole Fruit

Batch Number: BIOF20100811

Date of Manufacture: Aug 11, 2010

Quantity: 300Kg

Date of Analysis: Aug 12, 2010

ANALYSIS	SPECIFICATION	RESULTS	Remark
Appearance	Light Yellow Powder	Complies	Visual
Odor	CHARACTERISTIC	Complies	
Assay Ratio			
Ellagic acid	40%	40.5%	(HPLC)
Sieve Analysis	100% pass 80 mesh	Complies	
solubility	water soluble	Complies	
solubility rate	≥95%	Complies	
Loss on Drying	≤5%	3.73%	
Ash Content	≤2.00%	1.25%	
Sulphated Ash	≤5%	3.16%	
Extract Solvent	Water	Complies	
Sulphite Content	<100ppb	Complies	
Heavy Metal	<10ppm	Complies	
Pb	<0.5ppm	Complies	
Cadmium	<1ppm	Complies	
Lead	<3ppm		
Mercury	<3ppm	Complies	
Pesticide	<100ppb	Complies	
Microbiology			
Total Plate Count	≤1000cfu/g	Complies	
Yeast & Mold	≤100cfu/g	Complies	
E.Coli	Negative	Complies	
Salmonella	Negative	Complies	

Conclusion:

Conform with specification.

Packaging Description:

Sealed export grade drum &amp; double of sealed plastic bag.

Storage:

store in a cool dry place and keep away from strong light and heat.

Shelf life:

2 years when properly stored.

Quality Control:

Xiaoning Yang



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
*Animal Care and Use Committee (ACUC)***

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
“ ETHICAL CLEARANCE ”**

**No : 153-KE**

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,  
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :**

**PENELITIAN BERJUDUL** : Aktivitas Antifibrotik Ekstrak Buah Delima (*Punica granatum L.*) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) sebagai Hewan Model Fibrosis Hati

**PENELITI UTAMA** : Wiwik Misaco Yuniarti, drh, M.Kes.

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN** : Laboratorium Biokimia  
Fakultas Kedokteran  
Universitas Airlangga

**DINYATAKAN** : LAIK ETIK

Surabaya, 1 Nopember 2011

Mengetahui  
Dekan FKH-Unair,

Prof. Romziah Sidik, Ph.D., drh.  
NIP. 130687305

Ketua

Dr. E. Bimo Aksono, M.Kes., Drh.  
NIP. 132014464