

DISERTASI

**EFEK ANTIFIBROTIK EKSTRAK BUAH DELIMA (*Punica granatum L.*)
PADA FIBROSIS HATI**

(Studi Eksperimental pada Hewan Model Fibrosis Hati)



WIWIK MISACO YUNIARTI

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN
PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2012**

DISERTASI

**EFEK ANTIFIBROTIK EKSTRAK BUAH DELIMA (*Punica granatum L.*)
PADA FIBROSIS HATI**

(Studi Eksperimental pada Hewan Model Fibrosis Hati)



WIWIK MISACO YUNIARTI

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN
PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2012**

**EFEK ANTIFIBROTIK EKSTRAK BUAH DELIMA (*Punica granatum L.*)
PADA FIBROSIS HATI**

(Studi Eksperimental pada Hewan Model Fibrosis Hati)

DISERTASI

Untuk Memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi S3 Ilmu Kedokteran
Pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Dan Dipertahankan di Hadapan Panitia Ujian Doktor Tahap II
(Terbuka)

Oleh :

WIWIK MISACO YUNIARTI

090970112-D

**PROGRAM STUDI S3 ILMU KEDOKTERAN
PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2012**

Lembar Pengesahan

Naskah disertasi ini telah disetujui

Tanggal : 13 Agustus 2012

Oleh :

Promotor

Prof. Retno Handajani, dr., MS., PhD.

NIP 19481012 197603 2001

Ko Promotor I

Prof. Dr. Hernomo O. K., dr., SpPD(K)-GEH

NIP 19410624 196902 1002

Ko Promotor II

Dr. I Ketut Suidiana, MSi, Drs.

NIP 19550705 198003 1005

Disertasi ini telah diuji dan dinilai
oleh panitia penguji pada ujian tertutup (Tahap I)
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
pada tanggal 19 Juli 2012

Panitia Penguji,

Ketua : Prof. Dr. Harjanto J. M., dr., AIFM.

Anggota :

1. Prof. Retno Handajani, dr., MS., PhD
2. Prof. Dr. Hernomo Ontoseno K., dr., SpPD(K)-GEH
3. Dr. I Ketut Suidiana, MSi., Drs.
4. Prof. Dr. Aulanni'am, Drh., DES.
5. Dr. Hari Basuki Notobroto, M Kes., dr
6. Dr. Imam Susilo, dr., Sp PA (K)
7. Dr. M. Zainal Arifin, Drh., MS.

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Universitas Airlangga
Nomor : 125/H3.1.1/KD/2012
Tanggal : 17 Juli 2012

UCAPAN TERIMAKASIH

Bismillahirrahmanirrahim, Alhamdulillah rabbi'l alamin,

Puji syukur senantiasa saya panjatkan ke hadirat Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang, atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Disertasi ini dapat diselesaikan berkat dorongan, bimbingan, arahan, saran dan perbaikan dari banyak pihak. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati, perkenankan saya menghaturkan terimakasih yang tulus serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

Prof. Retno Handajani, dr., MS., PhD sebagai promotor dan guru saya atas dorongan, dukungan, bimbingan kesabaran serta keikhlasan dalam membimbing saya dalam penulisan disertasi ini. Saya haturkan terimakasih yang tak terhingga.

Prof. Dr. Hernomo O. K., dr., SpPD(K)-GEH dan Dr. I Ketut Sudiana, Msi., Drs sebagai ko-promotor yang telah dan senantiasa dengan penuh perhatian dan kesabaran memberikan dorongan dan semangat serta meluangkan waktu untuk membimbing dan menjadi tumpuan untuk konsultasi tentang rencana hingga terselesainya disertasi ini.

Ucapan terimakasih yang sebesar- besarnya juga saya haturkan kepada :

Prof. Dr. H. Fasich, Apt. selaku Rektor Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang telah diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Program Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., MKes., SpPD., K-EMD., FINASIM, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan segenap jajarannya, yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor pada Program Pascasarjana, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana, Prof. Dr. Hj. Sri Hajati, SH., MS., dan Prof. Dr. Suhariningsih, Ir., selaku Wakil Direktur Bidang Akademik, beserta seluruh pimpinan dan staf Program Pasacasarjana Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk menjadi mahasiswa Program Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Teddy Ontoseno, dr., Sp A (K), Sp JP., AKK selaku Ketua Program Studi Program Doktor Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga dan Prof. Dr. Harjanto J. M., dr., AIFM selaku mantan Ketua Program Studi Program Doktor Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Prof. Hj. Romziah Sidik, Drh., MSc., PhD dan segenap jajarannya, yang telah memberi dukungan, baik moril maupun materiil serta kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor pada Program Pascasarjana, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Harjanto J. M., dr., AIFM., Prof. Dr. Aulanni'am, Drh., DES., Dr. Hari Basuki Notobroto, M Kes., dr., Dr. Imam Susilo, dr., Sp PA (K), Dr. M. Zainal Arifin, Drh., MS. dan Junaidi Khotib, S.Si, Apt., M.Kes., Ph.D., sebagai penguji, yang telah banyak memberikan saran dan bimbingan yang sangat berharga mulai penyusunan naskah pra usulan penelitian hingga penyusunan naskah disertasi ini.

Para dosen yang sangat saya hormati, Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr., SpBK., Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS., Prof. Dr. Zainuddin Apt., Prof. Dr. Juliati Hood A., dr., MS., SpPA (K), FIAC., Prof. Dr. Sutjipto, dr., PhD., Prof. H. Kuntoro, dr., MPH., Dr.PH., Prof. Fedik A. Rantam, drh., Dr. Widodo J. Pujirahardjo, dr., MS., MPH., Dr.PH., Dr. F. Sustini., dr., MS., Dr. I Ketut Sudiana, MS., Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., MKes., dan Prof. Dr. Soedjarwo, MS., Drs. Apt.

Penulisan disertasi ini tidak mungkin selesai tanpa bantuan dan dukungan dari seluruh staf pengajar dan administrasi Bagian Klinik Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Terimakasih untuk kelonggaran pengaturan jadwal tugas dan kegiatan yang telah diberikan, selama saya mengikuti pendidikan Program Doktor pada Program Pascasarjana, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.

Terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional yang telah memberikan Beasiswa Pendidikan Pascasarjana demi kelancaran studi saya.

Kepada seluruh guru dan dosen saya, terimakasih yang tak terhingga atas limpahan ilmu pengetahuan dan wawasan yang telah diberikan dengan ikhlas dan tanpa mengenal lelah. Semoga rahmat dan hidayah Allah SWT senantiasa selalu menyertai Bapak dan Ibu sekalian.

Teman-teman angkatan 2009/2010 pendidikan Program Doktor Bidang Ilmu Kedokteran pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Selama ini kita telah saling menemani, memotivasi, mengingatkan dan memberi masukan yang semuanya saya rasakan selalu memberi nilai tambah dalam rangkaian penyusunan disertasi ini. Tanpa mengurangi rasa hormat saya, karena tidak dapat menyebutkan satu persatu, perkenankan saya mengucapkan terimakasih atas segala kebaikan yang telah terjalin selama ini.

Akhirnya, pada kesempatan ini saya ingin menyampaikan terimakasih, rasa hormat dan kasih sayang saya kepada :

Orangtua saya, ayahanda tercinta Soerojo (Alm) dan ibunda Aliyan serta mertua saya, ayahanda Soejono dan ibunda Sri Rahayu, yang telah mengasuh, mendidik, mengayomi, memberi tauladan yang baik dan senantiasa selalu berdo'a serta mendampingi saya dan keluarga hingga saat ini. Tidak lupa kepada seluruh saudara dan

keluarga besar saya ucapkan terimakasih yang tak terhingga. Terimakasih atas semua kebaikan dan doa yang telah diberikan.

Suami saya, Bambang Sektiari Lukiswanto tercinta, yang hingga saat ini mendampingi saya menjalani kehidupan, memberikan dorongan dan menanamkan semangat untuk tidak pernah berhenti menuntut ilmu. Kepada anak-anak tercinta Maruti Widihadiningtyas, Abimanyu Hadisuryo, Espridelavia Sektiara dan Eclatdeta Sektyairlangga, terimakasih atas begitu banyak rasa cinta dan pengorbanan yang telah kalian berikan selama ini. Ibu mohon maaf atas berkurangnya waktu kebersamaan selama Ibu menyelesaikan pendidikan. Namun, Ibu selalu berdo'a agar kalian berempat menjadi anak yang shaleh dan shalehah, berbakti kepada orang tua dan menjadi manusia yang bermanfaat. Aamiin....

Terimakasih saya sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu, memotivasi, mendukung hingga terselesaikannya disertasi ini.

Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi peningkatan kesejahteraan umat manusia khususnya bagi pengembangan dunia pendidikan dan kesehatan. Semoga Allah SWT melimpahkan taufik dan hidayahNya kepada semua pihak yang telah membantu penyelesaian disertasi ini. Aamiin Ya Rabbal Allamin.

Surabaya, Juli 2012

Penulis

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 efek antifibrotik ekstrak buah delima pada tikus putih sebagai hewan model fibrosis hati dengan teknik *bile duct ligation*. Pemeriksaan dilakukan terhadap ekspresi derajat nekroinflamasi, ekspresi IL-6, TGF- β 1, MMP-1, kolagen tipe I. Selain itu juga dilakukan pemeriksaan 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 derajat nekroinflamasi, ekspresi IL-6, TGF- β 1, MMP-1, kolagen tipe I dan derajat fibrosis hati.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah delima terstandar pada kelompok P3 dapat menghambat proses nekroinflamasi pada hewan model fibrosis hati sampai skor derajat nekroinflamasi yang terjadi mendekati kelompok P0 ($p > 0,05$). Derajat nekroinflamasi pada kelompok P3 berbeda nyata dengan kelompok P1 dan P2 ($p < 0,05$), tetapi kelompok P2 tidak berbeda nyata dengan kelompok P1 ($p > 0,05$).

Pemberian ekstrak buah delima terstandar (P3) dapat menghambat peningkatan ekspresi IL-6 yang diproduksi oleh sel-sel penyusun hati. Jumlah sel yang mengekspresikan IL-6 pada kelompok P3 mendekati jumlah sel yang mengekspresikan IL-6 pada kelompok kontrol. Ekspresi IL-6 pada kelompok P3 ($5,08 \pm 2,16$) berbeda secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok P0 ($0,00 \pm 0,00$), P1 ($31,06 \pm 2,67$) maupun P2 ($16,85 \pm 1,40$) ($p < 0,05$). Sebagaimana pemeriksaan terhadap ekspresi IL-6, ekspresi TGF- β 1 pada kelompok P3 ($4,40 \pm 2,27$) juga berbeda secara signifikan bila

dibandingkan dengan kelompok P0 ($0,00 \pm 0,00$), P1 ($34,68 \pm 1,80$) maupun P2 ($10,70 \pm 1,82$) ($p < 0,05$).

Hasil pemeriksaan preparat dengan teknik imunohistokimia menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah delima terstandart (P3) dapat menghambat peningkatan ekspresi MMP-1 pada sel-sel penyusun hati. Ekspresi MMP-1 pada kelompok P3 ($19,09 \pm 5,63$) berbeda secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok P0 ($0,00 \pm 0,00$) dan P1 ($34,24 \pm 1,85$) ($p < 0,05$), namun tidak dengan kelompok P2 ($19,30 \pm 2,62$) ($p > 0,05$). Pemberian ekstrak buah delima terstandart (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 terstandart 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.

Ellagic acid dapat menghambat peningkatan derajat fibrosis hati tanpa disertai dengan hambatan peningkatan derajat nekroinflamasi karena beberapa alasan. Pertama, EA memiliki aktivitas antiinflamasi, tetapi tidak sekuat ekstrak buah delima terstandart. Hal tersebut akan menyebabkan NF- κ B tetap teraktivasi, namun produksi *inhibitory apoptosis protein* lebih dominan daripada produksi sitokin proinflamasi. Hal ini akan menyebabkan hambatan peningkatan jumlah hepatosit yang mengalami apoptosis. Kedua, sedikitnya jumlah hepatosit yang mengalami apoptosis akan mengurangi ekstravasasi jumlah netrofil menuju parenkim hati. Hal ini dapat mencegah kerusakan parenkim hati lebih parah. Ketiga, *ellagic acid* memiliki kemampuan untuk menginduksi apoptosis HSCs.

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 ekstrak buah delima terstandart memberikan hasil yang lebih baik daripada pemberian EA. *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 menghambat peningkatan derajat nekroinflamasi, ekspresi IL-6, TGF- β 1, MMP-1, ketebalan kolagen tipe I dan derajat fibrosis hati pada hewan model fibrosis hati. Kondisi yang hampir sama juga terlihat pada hewan model fibrosis hati yang diberi EA, namun pada kelompok ini, hambatan peningkatan derajat fibrosis tidak disertai dengan hambatan peningkatan derajat nekroinflamasi.



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 antifibrotic 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 necroinflammation degree, expressions of IL-6, TGF-B1, MMP-1, collagen type 1. Furthermore, examination of 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 result of this study demonstrated that the administration of standardized pomegranate fruit extract in group P3 could inhibit the process of necroinflammation in an animal model for liver fibrosis to the the extent where the score of necroinflammation degree which occurred nearly equaled that in group P0 ($p>0,05$). The necroinflammation degree in group P3 significantly differed from groups P1 and P2 ($p<0,05$), but it was not significantly different between group P2 and P1 ($p<0,05$).

The administration of standardized pomegranate fruit extract (P3) could inhibit an increase of IL-6 expression which was produced by cells arranging the liver. The number of cells expressing IL-6 in group P3 nearly equaled the number of cells expressing IL-6 in the control group. The expression of IL-6 in group P3 ($5,08 \pm 2,16$) was significantly different from groups P0 ($0,00 \pm 0,00$), P1 ($31,06 \pm 2,67$) and P2 ($16,85$

$\pm 1,40$) ($p < 0,05$). As it was with the observation of IL-6 expression, TGF-B1 expression in group P3 ($4,40 \pm 2,27$) also differed significantly compared to the control groups P0 ($0,00 \pm 0,00$), P1 ($34,68 \pm 1,80$) and P2 ($10,70 \pm 1,82$) ($p < 0,05$).

The results of histologic examination using immunohistochemical technique showed that the administration of standardized pomegranate fruit extract (P3) could inhibit an increase in MMP-1 expression in cells arranging the liver. MMP-1 expression in group P3 ($19,09 \pm 5,63$) differed significantly compared to groups P0 ($0,00 \pm 0,00$) and P1 ($34,24 \pm 1,85$) ($p < 0,05$), but not from group P2 ($19,30 \pm 2,62$) ($p > 0,05$). The administration of standardized pomegranate fruit extract (P3) could inhibit an increase in collagen type 1 thickness 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.

Ellagic acid could inhibit an increase of fibrosis degree without inhibition of an increase of necroinflammation degree due to several reasons. First, EA possessed anti-inflammatory activity though not as strong as that of standardized pomegranate fruit extract. This would keep NF-kB to be activated, but the production of *inhibitory apoptosis protein* was more dominant than the production of proinflammatory cytokines. This would cause inhibition of an increase of hepatocyte number undergoing apoptosis. Second, the small number of hepatocytes undergoing apoptosis would decrease extravasation of neutrophils toward the liver parenchyme. This could prevent a more severe damage to the liver parenchyme. Third, *ellagic acid* possessed the ability to induce apoptosis of HSCs.

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, the administration of pomegranate fruit extract yielded better result compared to EA administration. *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.

In this research, it was proven that standardized pomegranate fruit extract possessed antifibrotic effect by inhibiting an increase of necroinflammatory degree, the expressions of IL-6, TGF-B1, MMP-1, collagen type 1 thickness and the degree of liver fibrosis in an animal model for liver fibrosis. A similar condition was also observed in an animal model for liver fibrosis treated with EA, however in this group, inhibition of an increase of fibrosis degree was not accompanied with inhibition of an increase of necroinflammation degree.



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 efek antifibrotik ekstrak buah delima pada fibrosis hati akibat obstruksi bilier pada tikus putih. Fibrosis hati diinduksi dengan teknik *bile duct ligation* (BDL). Pemeriksaan dilakukan terhadap derajat nekroinflamasi, ekspresi IL-6, TGF- β 1, MMP-1, 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 dilaparotomi 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 pada kelompok P3 dapat menghambat proses nekroinflamasi dan berbeda nyata dengan kelompok P1 dan P2 ($p < 0,05$), namun tidak berbeda dengan kelompok P0 ($p > 0,05$). Kelompok P2 juga tidak berbeda dengan kelompok P1 ($p > 0,05$). Ekspresi IL-6 dan TGF- β 1 juga mengalami hambatan peningkatan yang signifikan pada P3 bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya ($p < 0,05$). Ekspresi MMP-1 dan kolagen tipe I secara bermakna juga mengalami hambatan peningkatan 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 derajat nekroinflamasi, ekspresi IL-6, TGF- β 1, MMP-1, kolagen tipe I dan derajat fibrosis hati.

Kata kunci : antifibrotik, fibrosis hati, delima, *bile duct ligation* (BDL)

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 antifibrotic 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 degree of necroinflammation, expressions of IL-6, TGF-B1, MMP-1, type 1 collagen and the degree of liver fibrosis.

Method:

Thirty two male white mice (*Rattus norvegicus*), 2,5 months old weighing 160-190 grams were divided into four experimental groups. 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 one day after the last administration.

Result:

The result of this study demonstrated that the administration of standardized pomegranate fruit extract in group P3 could inhibit the process of necroinflammation and thus showed statistically significant difference compared to groups P1 and P2 ($p < 0,05$), but it was not significantly different from group P0 ($p > 0,05$). Group P2 also did not show statistically significant difference from group P1 ($p > 0,05$). The expressions of IL-6 and TGF-B1 in group P3 also experienced significant inhibition in their increase, compared to the other experimental groups ($p < 0,05$). The expressions of MMP-1 and collagen type 1 also experienced significant inhibition in their increase in groups P2 and P3, compared to group P1 ($p < 0,05$). 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 necroinflammatory degree, the expressions of IL-6, TGF-B1, MMP-1, collagen type 1 and the degree of liver fibrosis.

Keywords: antifibrotic, liver fibrosis, punica granatum extract, bile duct ligation (BDL)

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Lembar Prasyarat Gelar.....	iii
Lembar Persetujuan.....	iv
Lembar Penetapan Panitia Penguji.....	v
Ucapan Terimakasih.....	vi
Ringkasan.....	x
Summary.....	xiii
Abstrak.....	xvi
Abstract.....	xvii
DAFTAR ISI.....	xviii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xxiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxv
DAFTAR SINGKATAN.....	xxvi
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	7
1.3.1 Tujuan umum penelitian.....	7
1.3.2 Tujuan khusus penelitian.....	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	8
1.4.1 Manfaat teoritik penelitian.....	8
1.4.2 Manfaat praktis penelitian.....	9
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1 Fibrosis Hati.....	10
2.1.1 Struktur, sel penyusun dan fungsi hati.....	10
a. Struktur hati.....	11

b. Sel penyusun hati.....	13
c. Fungsi hati.....	15
2.1.2 Klasifikasi mekanisme jejas pada hati.....	17
a. Gangguan homeostasis kalsium.....	17
b. Jejas kanalikuler dan kolestasis.....	18
c. Bioaktivasi metabolik bahan kimia melalui aktivitas sitokrom P ₄₅₀	20
d. Stimulasi reaksi autoimun.....	21
e. Stimulasi apoptosis.....	22
f. Jejas mitokondria.....	23
2.1.3 Mekanisme fibrosis hati.....	23
a. Proses inflamasi dan peran sitokin pada fibrosis hati.....	24
(i) Inflamasi.....	24
(ii) Peran sitokin.....	26
b. Tahapan fibrosis hati.....	28
(i) Kerusakan epitel atau endotel.....	29
(ii) Pelepasan <i>transforming growth factor</i> - β 1.....	32
(iii) Rekrutmen sel inflamasi.....	35
(iv) Induksi pembentukan <i>reactive oxygen species</i>	36
(v) Aktivasi sel penghasil kolagen.....	37
(vi) Induksi aktivasi miofibroblas oleh matriks.....	41
c. Mediator fibrosis hati dan interaksi seluler.....	41
(i) Aktivasi HSCs.....	43
(ii) Peran sel <i>kupffer</i> dalam aktivasi HSCs.....	46
(iii) Peran sel hepatosit dalam aktivasi HSCs.....	47
(iv) Peran sel endotel sinusoid dan trombosit pada proses fibrogenesis.....	48
(v) Peran matriks ekstraseluler pada proses fibrogenesis.....	49
d. Marker fibrosis hati.....	50
(i) Kolagen.....	50
(ii) <i>Matrix metalloproteinases</i>	51
(iii) Sitokin.....	53

2.2 Delima (<i>Punica granatum L.</i>).....	56
2.2.1 Klasifikasi, nama lain dan komposisi delima.....	56
2.2.2 Pemanfaatan delima untuk kesehatan.....	58
a. Delima dan kanker.....	58
b. Delima dan <i>atherosclerosis</i>	59
c. Delima dan diabetes.....	60
d. Delima dan <i>chronic obstructive pulmonary disease</i>	60
e. Delima dan <i>osteoarthritis</i>	61
f. Delima dan kosmetika.....	62
2.2.3 Bahan aktif delima.....	62
2.3 Aktivitas Delima sebagai Antioksidan, Antiinflamasi dan Antikanker serta Antifibrotik.....	65
2.3.1 Aktivitas antioksidan.....	66
2.3.2 Aktivitas antiinflamasi dan antikanker.....	67
2.3.3 Aktivitas antifibrotik dan profibrogenik.....	69
2.3.4 Mekanisme lain.....	70
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	72
3.1 Kerangka Konseptual.....	73
3.2 Hipotesis Penelitian.....	77
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	79
4.1 Jenis/Rancangan Penelitian yang Digunakan.....	79
4.2 Unit Eksperimen, Replikasi dan Randomisasi.....	80
4.2.1 Unit eksperimen.....	80
4.2.2 Replikasi.....	81
4.2.3 Randomisasi.....	82
4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel.....	82
4.3.1 Variabel penelitian.....	82
4.3.2 Definisi operasional variabel.....	83

4.4 Bahan Penelitian.....	86
4.4.1 Bahan untu pembuatan hewan model.....	86
4.4.2 Bahan untuk perlakuan.....	86
4.4.3 Bahan untuk pemeriksaan laboratorium.....	86
4.5 Instrumen Penelitian.....	88
4.5 1 Instrumen untuk pembuatan hewan model.....	88
4.5.2 Instrumen untuk perlakuan.....	88
4.5.3 Instrumen untuk pemeriksaan laboratorium.....	88
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	88
4.6.1 Lokasi penelitian.....	88
4.6.2 Waktu penelitian.....	89
4.7 Pelaksanaan Penelitian.....	89
4 .7 1 Persiapan Penelitian.....	89
4.7.2 Perlakuan terhadap hewan percobaan.....	92
4.7.3 Pengambilan jaringan hati.....	93
4.7.4 Pemeriksaan jaringan hati.....	93
4.8 Prosedur Pengambilan atau Pengumpulan Data.....	95
4.9 Kerangka Operasional Penelitian.....	97
4.10 Cara Pengolahan dan Analisis Data.....	97
BAB 5 HASIL DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN.....	99
5.1 Karakteristik Subjek Penelitian.....	99
5.2 Gambaran Histopatologi Hati.....	99
5.2.1 Derajat nekroinflamasi.....	99
5.2.2 Ekspresi IL-6, TGF- β 1, MMP-1 dan kolagen tipe I.....	101
5.2.3 Derajat fibrosis hati.....	105
5.3 Analisis Hasil Penelitian.....	107
5.3.1 Derajat nekroinflamasi.....	107
5.3.2 Jumlah sel yang mengekspresi IL-6, TGF- β 1, MMP-1 dan kolagen tipe I.....	108
5.3.3 Derajat fibrosis hati.....	111

5.4 Korelasi antara derajat nekroinflamasi, ekspresi IL-6, TGF-β1, MMP-1, kolagen tipe I dan derajat fibrosis hati.....	112
5.4.1 Korelasi nekroinflamasi dengan IL-6.....	112
5.4.2 Korelasi nekroinflamasi dan IL-6 dengan TGF- β 1.....	112
5.4.3 Korelasi antara IL-6 dan TGF- β 1 dengan MMP-1.....	114
5.4.4 Korelasi MMP-1 dan TGF- β 1 dengan kolagen tipe I.....	115
5.4.5 Korelasi antara kolagen tipe I dengan derajat fibrosis.....	116
BAB 6 PEMBAHASAN.....	118
6.1 Efek Ekstrak Buah Delima terhadap Derajat Nekroinflamasi.....	119
6.2 Efek Ekstrak Buah Delima terhadap Ekspresi IL-6, TGF- β 1, MMP-1 dan Kolagen Tipe I.....	121
6.3 Efek Ekstrak Buah Delima Terstandar terhadap Derajat Fibrosis Hati.....	131
6.4 Temuan Baru.....	135
BAB 7 PENUTUP.....	136
DAFTAR PUSTAKA.....	137
LAMPIRAN.....	152