

THE HEPAPROTECTOR EFFECT OF NEEM LEAF EXTRACT USING SGPT ACTIVITY TEST ON MALE WISTAR RATS INDUCED WITH HIGH DOSE PARACETAMOL

Eric Hartono¹, Sulistiana Prabowo²

¹General Practitioner, Hang Tuah University, Surabaya, East Java

²Department of Biochemistry, Hang Tuah University, Surabaya, East Java

Corresponding author:

Eric Hartono

General Practitioner, Hang Tuah University, Surabaya, East Java

Email: eric.hartono@hangtuah.ac.id

RETRACTED

Article Info:

Received: 30 Jan 2019

Revised: 05 Oct 2019

Accepted: 06 Oct 2019

Available online: 21 Oct 2019

Keywords: *paracetamol*,
Azadirachta indica, *SGPT*

DOI: [10.20956/nmsj.v4i2.5987](https://doi.org/10.20956/nmsj.v4i2.5987)

Abstract

Background: High dose paracetamol can cause oxidative stress through the metabolic pathway that produces NAPQI in large quantities and may cause to increase SGPT activity.

Method: Using 24 male Wistar rats, divided into 3 groups. The first group of rats fed with standard food, the second group of rats was given paracetamol orally, and the third group of rats was given neem's leaf extract and paracetamol 1 orally. At the end of experiment all animals were sacrificed and SGPT activity were measured on the 10th day with spectrophotometric method.

Result: There was also significant difference ($p = 0,021$) of SGPT activity between group of rats fed with high dose paracetamol ($1360,94 \pm 1509,08$ U/L) and group of rats fed with high dose paracetamol and neem's leaf extract ($138,76 \pm 34,36$ U/L).

Conclusion: neem's leaf extract 500mg/kg BW can act as hepatoprotector on Wistar rat.

PENDAHULUAN

Parasetamol (juga dikenal sebagai acetaminophen, N-asetil-p-aminophenol atau APAP) adalah analgesik ringan dan antipiretik yang umum digunakan dalam berbagai formulasi resep dan dapat dibeli bebas di apotek. Ini dianggap sebagai analgesik lini pertama untuk banyak pasien dengan penyakit hati kronis (chronic Liver Disease), terutama karena kekhawatiran tentang efek samping non-steroid anti-inflamasi (NSAID) dan obat turunan opioid. Namun hubungannya dengan peningkatan enzim hati seperti SGOT dan SGPT (ALT & AST), yang merupakan penanda kerusakan hati, maka masih tidak jelas batas dosis aman penggunaan jangka panjangnya terutama pada orang yang memiliki penyakit liver kronis.^{1,2}

Sementara penggunaan tes fungsi hati (Liver Function Test) dan penanda pengganti lainnya untuk hasil klinis sering diperlukan, SGPT khususnya sebagai penanda pengganti dari kerusakan hati karena enzim ini berfluktuasi sepanjang hari pada individu yang sehat, berhubungan dengan aktivitas seseorang, bersamaan asupan vitamin dan beberapa obat lainnya.³ Hal ini juga dapat terjadi pada penyakit lain seperti diabetes dan gagal jantung.³ Oleh karena itu peningkatan kecil atau tidak signifikan belum berkorelasi kuat dengan hepatotoksitas. Hal ini berbeda dengan konsentrasi transaminase yang sangat tinggi yang terlihat pada pasien dengan cedera hati yang diinduksi obat, atau yang sering disebut *drug induced liver injury* (DILI).

Laporan kasus DILI pada orang yang menggunakan dosis 'terapi' parasetamol sebagian besar pada pasien yang konsumsi jangka panjang, puasa, kurang gizi, kurang berat badan atau memiliki penyakit demam yang bersamaan.⁴⁻⁶

Pemberian acetaminophen melalui rute intravena telah semakin luas dan telah digunakan sebagai agen antipiretik dan analgesik yang aman dan efektif.⁽⁷⁾ Dosis terapi parasetamol maksimum yang direkomendasikan adalah 4 g / hari pada orang dewasa dan 50-75 mg / kg / hari pada anak-anak. Konsumsi satu dosis lebih dari 7 g pada orang dewasa dan 150 mg / kg pada anak dianggap berpotensi beracun pada hati dan ginjal karena metabolit yang sangat aktif, N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI).⁸ Overdosis acetaminophen adalah salah satu toksisitas terkait obat (*drug toxicity*) yang paling sering dilaporkan ke Toxic Center. APAP adalah penyebab utama gagal hati akut di Amerika Serikat.^{8,9} Untuk mengurangi risiko hepatotoksitas, FDA (Food and Drug Association) mengharuskan produsen membatasi jumlah asetaminofen dalam pil 325 mg, dan semua formulasi yang mengandung obat memiliki peringatan kotak hitam untuk potensi kerusakan hati.

ALT (SGPT) dan AST (SGOT) adalah enzim-enzim yang dibuat didalam sel-sel hepar yang berkaitan dengan fungsi hati dan konversi glukosa dan biasanya ditemukan di mitokondria sel hati. Mereka bekerja sebagai transaminase. Tingkat yang berbeda dari enzim ini dapat menunjukkan perbedaan kondisi dan penyebab. Ini mungkin termasuk penyakit kantung empedu, hepatitis, fatty liver, sirosis, mononucleosis, alkoholisme, obat-obatan, merusakkan otot jantung, cedera otot rangka, dan penyakit keganasan. Hepar menggunakan enzim-enzim ini untuk metabolisme asam amino dan untuk membuat protein. Ketika sel-sel hepar rusak atau mati, misalnya karena oksidan yang tinggi, ALT dan AST bocor ke dalam aliran darah dan menyebabkan aktivitas mereka meningkat dalam darah^{10,11}

Salah satu obat herbal yang bekerja sebagai hepatoprotektor adalah daun Mimba. Mimba (*Azadirachta indica*) merupakan tanaman yang terdapat di daerah tropis, termasuk Indonesia, hingga negara sub tropis. Mimba sering digunakan untuk pengobatan tradisional masyarakat Indonesia karena pada semua bagian tanaman mimba mengandung senyawa yang bermanfaat sebagai obat antipiretik, antihipertensi, antidiabetes, dan antiinflamasi.

Menurut Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Depkes RI) tahun 1993, daun mimba mengandung berbagai senyawa fitokimia antioksidan flavonoid (*Quercetin*) dan limonoid (*Azadirachtin-A*) yang berfungsi sebagai hepatoprotektor karena mampu meredam pembentukan radikal bebas dengan cara *direct scavenging* radikal bebas dan mampu menghambat kerja sitokrom P450 sehingga menurunkan produksi metabolit NAPQI.

Berdasarkan latar belakang di atas, peneliti ingin melakukan penelitian dengan judul pengaruh pemberian ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* Juss.) terhadap aktivitas SGPT tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar yang telah diinduksi parasetamol dosis tinggi

Penelitian ini bertujuan untuk Mengetahui apakah pemberian ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* Juss.) menurunkan aktivitas SGPT tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang diinduksi parasetamol dosis tinggi.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di dalam laboratorium (penelitian eksperimental laboratoris). Metode penelitian yang digunakan adalah *post test only control group design*. Dalam metode penelitian ini digunakan 3 kelompok tikus putih galur Wistar yaitu Kelompok kontrol negative (kelompok tikus putih galur Wistar yang tidak diberi perlakuan apapun), Kelompok kontrol positif (kelompok tikus putih galur Wistar yang diberi parasetamol dosis tinggi yang tidak mendapat ekstrak daun mimba), dan Kelompok perlakuan (kelompok tikus putih galur Wistar yang diberi parasetamol dosis tinggi dan diberi ekstrak daun mimba). Pada ketiga kelompok tikus tersebut dilakukan pengukuran aktivitas SGPT pada akhir penelitian.

Sampel yang dipakai adalah tikus Wistar jantan berumur 10-12 minggu dengan berat badan awal antara 150-200 gram sebanyak 24 ekor yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Hang Tuah Surabaya. Pemilihan sampel penelitian dilakukan dengan menggunakan metode *simple random sampling*. *Simple random sampling* merupakan suatu cara pengambilan sampel dari anggota populasi secara acak tanpa memperhatikan strata (tingkatan) yang ada di dalam anggota populasi tersebut. Hal ini dilakukan apabila anggota populasi dianggap homogen (sejenis).

Pengambilan sampel acak sederhana dapat dilakukan dengan cara undian.

Parasetamol 1750 mg/kg BB tikus dilarutkan ke dalam larutan CMC-Na 1% yang akan diberikan per oral dengan menggunakan sonde oral. Kemudian parasetamol diberikan ke tikus sesuai dengan berat masing-masing tikus.

Pada kelompok perlakuan, tikus diberikan oral per sonde pakan standar, air PDAM yang difilter, dan ekstrak daun mimba 500mg/kgBB selama 10 hari. Pada hari ke-9, 2 jam setelah pemberian ekstrak kelopak daun mimba kelompok perlakuan diberi parasetamol dosis 1750 mg/kgBB. Dosis ekstrak daun mimba pada tikus dengan berat badan 200 g = 500 mg/kg BB x 200 g = 100 mg.

Pada hari ke 10, hewan coba dikorbankan dan dilakukan pemeriksaan aktivitas SGPT dengan metode spektrofotometri.

Data yang diperoleh tidak berdistribusi normal sehingga uji signifikansi diperoleh melalui uji Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji post hoc test yaitu Mann-Whitney test.

HASIL

Tabel 1. Rerata Aktivitas SGPT kelompok hewan coba

	Rerata SGPT (U/L)	Standar Deviasi
K (-)	83,99	35,5829
K (+)	1360,94	1509,0896
PM	138,76	34,3657

Keterangan:

K(-) : Kelompok hewan coba yang diberi pakan standar

K(+): Kelompok hewan coba yang diberi parasetamol dosis tinggi

PM : Kelompok hewan coba yang diberi parasetamol dosis tinggi dan ekstrak daun mimba

Dari data tersebut dapat dilihat bahwa terjadi peningkatan rerata aktivitas SGPT pada kelompok hewan coba yang diberi parasetamol dosis tinggi tanpa ekstrak daun mimba, bila dibandingkan dengan hewan coba yang diberi pakan standar. Penurunan rerata aktivitas SGPT terjadi pada kelompok hewan coba yang diberi parasetamol dosis tinggi dengan ekstrak daun mimba, bila dibandingkan dengan kelompok hewan coba yang

diberi parasetamol dosis tinggi tanpa ekstrak daun mimba.

Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan parameter Saphiro-Wilk karena besar sampel kurang dari 50. Berdasarkan hasil analisis menunjukkan ada kelompok $p < 0.05$ ($p=0.006$) sehingga dapat disimpulkan bahwa distribusi data tidak normal. Oleh karena distribusi data tidak normal, maka harus dilakukan transformasi data untuk menormalkan distribusi data tersebut dengan proses transformasi data. Hasil menunjukkan signifikansi semua kelompok $p > 0.05$, sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa distribusi data adalah normal

Hasil uji homogenitas varian menunjukkan signifikansi $p = 0,002$. Karena nilai $p < 0,05$ maka dapat diambil kesimpulan bahwa varians tidak homogen. Syarat uji ANOVA adalah distribusi data harus normal dan varians data harus homogen. Karena hasil uji homogenitas varians tetap tidak homogen, maka uji ANOVA tidak dapat digunakan. Oleh karena itu, dilakukan uji Kruskal Wallis yang merupakan uji alternatif dari uji ANOVA.

Tabel 2 Hasil Uji Kruskal-Wallis

Ranks			
hasil	kelompok	N	Mean Rank
	Kelompok K-	8	5.50
	Kelompok K+	8	19.00
	Kelompok Perlakuan	8	13.00
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}

	hasil
Chi-Square	14.640
df	2
Asymp. Sig.	.001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: kelompok

Berdasarkan hasil uji Kruskal-Wallis pada **Tabel 2** diperoleh nilai $p = 0,001$. Oleh karena nilai $p < 0,05$ maka dapat diambil kesimpulan bahwa paling tidak terdapat perbedaan hasil SGPT antara dua kelompok.

Untuk mengetahui kelompok mana yang mempunyai perbedaan bermakna maka dilakukan analisis Post Hoc dengan Uji Mann-Whitney.

Berdasarkan hasil analisis Post Hoc maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas SGPT kelompok hewan coba yang diberi pakan standar dengan aktivitas SGPT kelompok hewan coba yang diberi parasetamol dosis tinggi ($p = 0,002$), terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas SGPT kelompok hewan coba yang diberi pakan standar dengan aktivitas SGPT kelompok hewan coba yang diberi parasetamol dosis tinggi ($p = 0,006$) dan terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas SGPT kelompok hewan coba yang diberi parasetamol dosis tinggi dengan aktivitas SGPT kelompok hewan coba yang diberi parasetamol dosis tinggi dan ekstrak daun mimba ($p = 0,021$).

PEMBAHASAN

Aktivitas SGPT merupakan salah satu enzim aminotransferase yang sering digunakan sebagai indikator adanya penyakit hati dan merupakan suatu monitor yang akurat untuk perkembangan atau memburuknya penyakit hati. Enzim ini terdapat di intraseluler dan akan dilepaskan ke dalam sirkulasi darah apabila terdapat kerusakan parenkim hati atau nekrosis sel hati secara akut sehingga aktivitas SGPT akan meningkat dalam darah. Kebanyakan peningkatan aktivitas SGPT disebabkan oleh disfungsi hati sehingga enzim ini sangat sensitif dan spesifik untuk penyakit hepatoseluler.¹⁰

Peningkatan aktivitas SGPT yang terjadi pada kelompok hewan coba yang diberi parasetamol dosis tinggi disebabkan oleh mekanisme jejas akibat zat toksik parasetamol yang menyebabkan pembentukan metabolit reaktif yaitu NAPQI melalui jalur metabolisme oksidasi oleh enzim sitokrom P450. Selanjutnya NAPQI akan didetoksifikasi oleh glutation untuk membentuk *acetaminophen-GSH konjugat*. NAPQI yang dihasilkan akan semakin banyak sehingga terjadi depleksi total glutation hepar karena digunakan untuk detoksifikasi terus menerus. Jumlah NAPQI yang dihasilkan semakin banyak sementara glutation menjadi jenuh sehingga tidak dapat menetralkan metabolit tersebut. Hal ini mengakibatkan metabolit berikatan secara kovalen pada kelompok sistein protein untuk membentuk *acetaminophen-protein adducts*.

Ikatan kovalen pada protein selular tersebut menyebabkan hilangnya aktivitas atau fungsi sel hepar sehingga akhirnya menjadi kematian sel dan lisis. Selain itu, NAPQI juga menyebabkan inhibisi mitokondria respiratori sehingga energi yang dihasilkan menurun dan lama-kelamaan sel

akan kehilangan fungsinya dan lisis. Kerusakan sel hepatosit dapat menyebabkan peningkatan aktivitas SGPT pada kelompok hewan coba yang diberi parasetamol dosis tinggi.

Hasil penelitian menunjukkan rerata aktivitas SGPT pada kelompok hewan coba yang diberi parasetamol dosis tinggi dan ekstrak daun mimba mengalami penurunan secara bermakna dibanding dengan kelompok hewan coba yang hanya diberi parasetamol dosis tinggi saja.

Penurunan ini disebabkan karena ekstrak daun mimba mengandung beberapa senyawa fitokimia yaitu flavonoid dan limonoid (Kalaivani *et al.*, 2009). Senyawa ini memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi sehingga metabolit reaktif parasetamol yaitu NAPQI tidak berikatan dengan makromolekul hepar.¹²

Flavonoid dan limonoid dapat menghambat peroksidasi lipid dengan cara menghambat enzim sitokrom P450 yang akhirnya dapat menghambat pembentukan NAPQI agar tidak semakin bertambah lagi (Henderson *et al.*, 2000). Kedua senyawa fitokimia tersebut juga dapat memaksimalkan dan mempercepat pengikatan NAPQI yang sudah terbentuk oleh cadangan GSH tubuh yang masih tersisa dengan cara meningkatkan enzim GST (Buck, 2003). Selain itu yang terpenting, flavonoid berfungsi mengikat radikal bebas yang terbentuk akibat penumpukan NAPQI. Flavonoid membawa gugus hidroksil yang dimana nantinya atom H pada gugus tersebut akan diberikan pada radikal bebas membentuk gugus radikal fenoksil flavonoid (FLO*) yang selanjutnya akan terjadi *radical coupling reaction*, sehingga menyebabkan radikal bebas dapat diubah menjadi senyawa yang tidak reaktif dan tidak merusak tubuh. Ekstrak daun mimba dapat menghambat kerusakan oksidatif hepar sehingga dapat menurunkan aktivitas SGPT.^{13,14}

Selain itu berbagai senyawa fitokimia antioksidan ekstrak daun mimba berfungsi sebagai hepatoprotektor karena mampu meredam pembentukan radikal bebas dengan cara *direct scavenging* yaitu menurunkan pembentukan ROS yang mempunyai efek toksis pada membran fosfolipid dan menyebabkan spektrum luas dari kerusakan sel sehingga akan mengurangi terjadinya stress oksidatif. Sebagai hasilnya sel hepar akan tetap membaik dan aktivitas SGPT darah akan menurun

Dari hasil penelitian ini didapatkan peningkatan aktivitas SGPT pada kelompok hewan coba yang

diberi parasetamol dosis tinggi yang menandakan adanya kerusakan hati, serta penurunan aktivitas SGPT pada kelompok hewan coba yang diberi ekstrak daun mimba yang menunjukkan adanya efek protector dari ekstrak tersebut. Menurunnya aktivitas SGPT pada kelompok yang diberikan ekstrak daun mimba mungkin disebabkan karena adanya kandungan flavonoid dan limonoid pada ekstrak daun mimba yang dapat menghambat kerja enzim sitokrom P450 dan meningkatkan glutathion sehingga dapat mencegah kerusakan sel hati.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis data, terdapat perbedaan bermakna ($p = 0,002$) antara rerata aktivitas SGPT kelompok hewan coba yang diberi pakan standar (83,99 U/L) dengan kelompok hewan coba yang diberi parasetamol dosis tinggi (1360,94 U/L). Selain itu terdapat perbedaan bermakna ($p = 0,021$) rerata aktivitas SGPT antara kelompok hewan coba yang diberi parasetamol dosis tinggi (1360,94 U/L) dengan kelompok hewan coba yang diberi parasetamol dosis tinggi dan ekstrak daun mimba (138,76 U/L), sehingga dapat disimpulkan seperti di bawah ini:

Pemberian parasetamol dosis 1750 mg/kgBB pada hari ke-10 meningkatkan secara bermakna aktivitas SGPT kelompok hewan coba yang berarti terjadi kerusakan hati akibat pemberian parasetamol dosis tinggi.

Pemberian ekstrak daun mimba selama 10 hari pada tikus yang diberi parasetamol dosis tinggi menurunkan secara bermakna aktivitas SGPT pada hewan coba yang menunjukkan bahwa ekstrak daun mimba dapat berfungsi sebagai hepatoprotektor terhadap pemberian parasetamol dosis tinggi.

Dari hasil penelitian ini, maka peneliti merasa perlu dilakukan penelitian lebih lanjut efek hepatoprotektor ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* Juss.) pada manusia beserta dengan dosisnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Imani F, Motavaf M, Safari S, Alavian SM. The therapeutic use of analgesics in patients with liver cirrhosis: A literature review and evidence-based recommendations. *Hepatitis Monthly*. 2014.
2. Dwyer JP, Jayasekera C, Nicoll A. Analgesia for the cirrhotic patient: A literature review and recommendations. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. 2014.
3. Giboney PT. Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient. *American Family Physician*. 2005.
4. Gumbrevičius G, Sveikata A, Sveikatiene R, Stankevičius E. Paracetamol and simvastatin: A potential interaction resulting in hepatotoxicity. *Med*. 2012;
5. Moling O, Cairon E, Rimenti G, Rizza F, Pristerá R, Mian P. Severe hepatotoxicity after therapeutic doses of acetaminophen. *Clin Ther*. 2006;
6. Al-Bassam W, Warrillow SJ. Acute liver failure. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*. 2018.
7. Ubaldo CDC, Hall NS, Le B. Postmarketing review of intravenous acetaminophen dosing based on food and drug administration prescribing guidelines. *Pharmacotherapy*. 2014.
8. Hodgman MJ, Garrard AR. A Review of Acetaminophen Poisoning. *Critical Care Clinics*. 2012.
9. Graham GG, Davies MJ, Day RO, Mohamudally A, Scott KF. The modern pharmacology of paracetamol: Therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology*. 2013.
10. Oh RC, Hustead TR. Causes and evaluation of mildly elevated liver transaminase levels. *Am Fam Physician*. 2011;
11. Bayupurnama P. *Hepatitis Imbas Obat*. Buku Ajar Penyakit Dalam Jilid I. 2006;
12. Kalaivani T, Mathew L. Free radical scavenging activity from leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. ex Delile, an Indian medicinal tree. *Food Chem Toxicol*. 2010;

13. Drewnowski A, Henderson SA, Shore AB. Taste responses to naringin, a flavonoid, and the acceptance of grapefruit juice are related to genetic sensitivity to 6-n-propylthiouracil. *Am J Clin Nutr.* 1997;
14. Puspitasari A, Sudarso, Dhiani BA. Aktivitas antijamur ekstrak metanol soxhletasi dan maserasi daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap *Candida albicans*. *Pharmacy.* 2009;