

## EKSPLORASI AKTIVITAS HEPATOPROTEKTIF EKSTRAK ETANOL TEMU KUNCI (*Boesenbergia rotunda*) MELALUI PARAMETER MAKROPATOLOGI ORGAN HATI DAN INDEKS ORGAN PADA MODEL HEPATOTOKSISITAS TIKUS

Mawandha Sari Harahap<sup>1\*</sup>, Heppy Nova Jayanti<sup>2</sup>, Desni Rinanda Silitonga<sup>3</sup>, Candrika<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Sehat Medan, Medan, Indonesia

<sup>2</sup>Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Sehat Medan, Medan, Indonesia

<sup>3</sup>Universitas Sari Mutiara Indonesia, Medan, Indonesia

<sup>4</sup>Universitas Sari Mutiara Indonesia, Medan, Indonesia

\*Penulis Korespondensi: mawandhasari17@email.com

### Abstrak

Hati merupakan organ paling berperan dalam mayoritas sistem metabolisme pada tubuh. Metabolisme *N-acetyl-p-aminophenol* (APAP) memiliki metabolit reaktif *N-acetyl-p-benzoquinone imine* (NAPQI) yang dapat menyebabkan berkurangnya antioksidan glutation hati serta disfungsi mitokondria dan mengakibatkan meningkatnya jumlah radikal bebas dihati, yang pada akhirnya akan merusak hati. Antioksidan dibutuhkan guna meminimalisir radikal bebas. Rimpang temu kunci (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf) mengandung metabolit sekunder berupa flavonoid yang diketahui memiliki sifat antioksidan sehingga rimpang temu kunci memiliki potensi untuk melindungi hati dari kerusakan. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis aktivitas hepatoprotektif ekstrak etanol rimpang temu kunci terhadap tikus putih jantan yang diinduksi dengan APAP.

Tikus putih jantan sebanyak 24 ekor digunakan pada penelitian ini, tikus dibagi dalam 6 kelompok perlakuan yakni kelompok kontrol normal, kontrol negatif diberi CMC-Na 0,5%, kelompok uji diberi ekstrak etanol rimpang temu kunci (EERTK) dosis 250, 500 serta 750 mg/kgBB dan kelompok kontrol positif diberi asetilsistein 200 mg. Selama 10 hari berturut-turut. Pada hari kesepuluh diinduksi dengan APAP 800 mg/kgBB secara oral. Setelah 16 jam, dilakukan pembedahan dan pengambilan organ hati. Organ hati untuk pengukuran indeks relatif organ dan makropatologi organ hati. Data dianalisis menggunakan one way-ANOVA lalu dilanjutkan Post Hoc Turkey HSD. Hasil analisis menjelaskan bahwa pretreatment dengan EERTK secara signifikan menyebabkan indeks relatif organ hati menurun akibat dari pemberian EERTK, disisi lain EERTK juga memperbaiki makropatologi organ hati.

**Kata kunci** : Hepatoprotektif, APAP, *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.

### Abstract

The liver is the primary organ involved in most of the body's metabolic systems. The metabolism of *N-acetyl-p-aminophenol* (APAP) produces a reactive metabolite, *N-acetyl-p-benzoquinone imine* (NAPQI), which can lead to a depletion of hepatic glutathione antioxidants and mitochondrial dysfunction, resulting in an increase in free radicals in the liver and ultimately causing liver damage. Antioxidants are needed to minimize the effects of free radicals. The rhizome of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf, commonly known as temu kunci, contains secondary metabolites such as flavonoids, which are known to have antioxidant properties. Therefore, the rhizome of temu kunci has the potential to protect the liver from damage.

This study aimed to analyze the hepatoprotective activity of ethanol extract of *Boesenbergia rotunda* rhizome (EERTK) in male white rats induced with APAP. A total of 24 male white rats were used in this study and divided into six treatment groups: normal control, negative control (given 0.5% CMC-Na), test groups (given EERTK at doses of 250, 500, and 750 mg/kg BW), and a positive control group (given 200 mg/kg BW of acetylcysteine). The treatment was administered for 10 consecutive days. On the tenth day, the rats were orally induced with APAP at a dose of 800 mg/kg BW. Sixteen hours later, surgery was performed to extract the liver for the measurement of the relative organ index and macroscopic pathology of the liver. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's HSD Post Hoc test. The results indicated that pretreatment with EERTK significantly reduced the relative liver organ index and improved the macroscopic pathology of the liver.

**Keywords**: Hepatoprotective, APAP, *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.

## PENDAHULUAN

Hati merupakan organ vital dengan peran sentral dalam menjaga homeostasis tubuh, meliputi metabolisme nutrisi, detoksifikasi xenobiotik, sintesis protein esensial, dan regulasi imunitas. Namun, organ ini sangat rentan terhadap kerusakan akibat berbagai faktor etiologi, termasuk paparan toksin kimia, infeksi virus, konsumsi alkohol berlebihan, serta penggunaan obat-obatan yang tidak tepat (Stavrakeva et al., 2024). Salah satu agen hepatotoksik yang menjadi perhatian global adalah parasetamol (asetaminofen), yang meskipun aman pada dosis terapeutik, dapat menyebabkan hepatotoksisitas berat hingga gagal hati akut pada kasus overdosis atau penggunaan kronis di atas dosis anjuran (Jaeschke & Ramachandran, 2024). Fenomena ini menjadi masalah kesehatan masyarakat yang signifikan; data epidemiologi menunjukkan bahwa hepatotoksisitas akibat parasetamol adalah penyebab utama gagal hati akut di banyak negara Barat, termasuk estimasi kasus yang terus meningkat di negara berkembang dengan aksesibilitas obat bebas yang tinggi (Mahmood & Hackl, 2024). Urgensi ini mendorong kebutuhan mendesak untuk mengidentifikasi dan mengembangkan agen hepatoprotektif baru yang efektif dengan profil keamanan yang baik.

Pencarian solusi alternatif semakin mengarah pada kekayaan alam, khususnya tanaman obat tradisional, yang telah lama digunakan dalam sistem pengobatan lokal dan menunjukkan potensi farmakologis yang menjanjikan. Temu Kunci (*Boesenbergia rotunda* L. Mansf.), anggota famili Zingiberaceae, merupakan salah satu tanaman yang banyak ditemukan dan dimanfaatkan di Asia Tenggara, termasuk di Indonesia, khususnya di

wilayah Sumatera Utara. Secara empiris, masyarakat lokal di beberapa daerah di Sumatera Utara, termasuk yang berdekatan dengan lokasi penelitian, telah lama menggunakan rimpang Temu Kunci sebagai ramuan tradisional untuk mengatasi berbagai keluhan terkait pencernaan dan menjaga kesehatan umum, termasuk indikasi tidak langsung yang mengarah pada perlindungan fungsi hati, seperti mencegah "sakit kuning" atau memperbaiki "hati yang rusak" (Harahap et al., 2023; Sugiharto et al., 2024). Meskipun penggunaan tradisional ini telah ada, basis ilmiah yang kuat mengenai aktivitas hepatoprotektif Temu Kunci, khususnya melalui evaluasi parameter makropatologi organ hati dan indeks organ pada model hepatotoksisitas, masih belum tervalidasi secara komprehensif. Penelitian ini bertujuan untuk menjembatani kesenjangan tersebut, memberikan bukti awal yang kuat mengenai potensi Temu Kunci sebagai agen hepatoprotektif, yang pada akhirnya dapat berimplikasi pada pengembangan fitofarmaka baru yang efektif dan aman untuk mitigasi kerusakan hati akibat berbagai agen, termasuk induksi parasetamol, sehingga dapat berkontribusi pada strategi penanganan penyakit hati di masa depan (Kumar Jain & Singh, 2023).

Sebagian besar penelitian sebelumnya lebih menekankan pada aktivitas farmakologis umum tanpa mengkaji secara mendalam efek perlindungan hati dalam model kerusakan yang terinduksi agen hepatotoksik seperti parasetamol (Gonfa et al., 2024). Selain itu, parameter evaluasi yang digunakan dalam studi-studi terdahulu seringkali terbatas pada biomarker biokimia darah tanpa didukung oleh data makropatologi organ hati atau indikator fisiologis lainnya, seperti indeks relatif

organ hati. Ketidakhadiran data yang komprehensif mengenai efek ekstrak etanol rimpang temu kunci terhadap kerusakan jaringan hati yang diinduksi secara eksperimental, khususnya melalui pendekatan morfologis dan anatomi-histologis, mengindikasikan adanya kekosongan pengetahuan yang penting untuk diisi. Oleh karena itu, diperlukan suatu pendekatan eksperimental yang holistik dan terstandar untuk mengkaji potensi hepatoprotektif temu kunci secara sistematis menggunakan model hewan uji dan parameter yang relevan secara fisiologis dan klinis. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas hepatoprotektif ekstrak etanol rimpang *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. terhadap kerusakan hati yang diinduksi oleh pemberian parasetamol dosis tinggi pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*). Penilaian dilakukan melalui dua pendekatan utama, yakni pengukuran indeks relatif organ hati untuk mengamati perubahan fisiologis yang mengindikasikan pembengkakan atau atrofi organ, serta pengamatan makropatologi organ hati untuk mengevaluasi kerusakan. Pendekatan ini diharapkan dapat memberikan gambaran yang lebih komprehensif mengenai potensi protektif ekstrak temu kunci terhadap cedera hepatic akibat paparan senyawa toksik. Dengan mengintegrasikan parameter morfometrik dan morfologis, penelitian ini tidak hanya bertujuan untuk mengkonfirmasi efek biologis ekstrak, tetapi juga untuk memperluas pemahaman mengenai mekanisme perlindungan hati yang mungkin dimiliki oleh senyawa-senyawa bioaktif dalam *Boesenbergia rotunda*. Hasil yang diperoleh diharapkan dapat menjadi dasar ilmiah bagi pengembangan kandidat fitofarmaka

hepatoprotektif berbasis tanaman obat lokal Indonesia.

## **METODE PENELITIAN**

Penelitian ini Sebagian besar dilakukan di Laboratorium Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Sehat Medan. Untuk uji histopatologi jaringan hati tikus dilakukan di Laboratorium Histopatologi Kedokteran Universitas Sumatera Utara Medan. Penelitian ini dikategorikan sebagai studi eksperimental preklinis berbasis hewan uji (in vivo), yang dirancang untuk mengevaluasi aktivitas biologis suatu bahan alam terhadap model penyakit terinduksi.

### **Alat dan Bahan**

Alat-alat yang dipakai pada penelitian yakni gelas laboratorium, pisau (*Cutter*), blender (*Miyako*), *rotary evaporator* (*Sigma-Aldrich*, USA), cawan penguap, *oven* (*Memmert*), desikator, neraca kasar (*Home Line*), neraca listrik (*Boeco*), seperangkat alat destilasi azeotropi, tanur, krus porselen, mikroskop, oral sonde, alat-alat bedah, tabung darah, seperangkat alat sentrifuse, mortar serta stamper, spuit 1 mL, spuit 3 mL.

Bahan-bahan yang dipakai pada penelitian tersebut yakni rimpang temu kunci, bahan kimia yang dipakai dalam penelitian ini terkecuali dibuktikan berbeda yakni bahan kimia yang berkualitas pro analisis, meliputi: etanol, air suling, kloralhidrat, kloroform, toluene, APAP (*Sigma-Aldrich*, USA), asetilsistein tablet, CMC-Na.

### **Prosedur Penelitian**

#### **1. Penyiapan Sampel**

Sampel diperoleh dari pasar tradisional sambu yang terletak di Kecamatan Medan Timur, Kota Medan, Sumatera Utara. Bagian tumbuan yang dipakai yakni rimpang. Pasar Tradisional Sambu di

Kecamatan Medan Timur, Kota Medan, Sumatera Utara, terletak di sekitar koordinat 3.5939° N, 98.6836° E (berdasarkan alamat HMQM+HF8, Gg. Buntu, Kec. Medan Tim., Kota Medan).

## 2. Identifikasi Tumbuhan

Identifikasi tumbuhan dilakukan Laboratorium Sistematika Tumbuhan Herbarium Medanense (MEDA). Dengan No. 216/MEDA/2022. Tumbuhan diketahui merupakan spesies *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf (RimpangT emu Kunci).

## 3. Pembuatan Simplisia

Sampel rimpang temu kunci segar dimurnikan dari kontaminan, dicuci bersih, lalu ditiriskan. Rimpang juga dirajang tipis serta diukur bobot basahnya. Setelah itu dikeringkan ke lemari pengering sampai kering (dibuktikan dengan rimpang yang gampang patah), lalu timbang lagi sebagai berat kering. Terakhir diblender serta ditentukan berat serbuk simplisianya. Di dalam kantong plastik berlabel, serbuk simplisia dimasukkan sebelum disimpan pada suhu ruang (Zayapor & M., 2023).

## 4. Pembuatan Ekstrak Etanol Rimpang Temu Kunci (EERTK)

Sebanyak 100 g simplisia kering yang telah digiling halus kemudian dicampurkan 75 bagian pelarut etanol 96% selama 5 hari pada suhu kamar. Maserat dipisahkan dari ampas (diperoleh maserat 1), kemudian ampas direndam kembali dengan 25 bagian pelarut etanol 96% selama 2 hari, lalu disaring hingga didapatkan maserat 2, kemudian maserat 1 juga 2 digabungkan. Kemudian maserat dikentalkan memakai alat *rotary evaporator* (Sigma-Aldrich, USA) di suhu 50-60 °C, dan selanjutnya dikentalkan pada pada suhu 40-50 °C

dalam oven selama 3 hari. Etanol dipilih sebagai pelarut ekstraksi utama karena polaritasnya yang moderat, memungkinkan ekstraksi beragam senyawa bioaktif dari tumbuhan, seperti flavonoid, terpenoid, dan alkaloid. Selain itu, profil keamanannya yang relatif tinggi (Kelas 3 ICH) menjadikannya aman untuk aplikasi pra-klinis dan potensi pengembangan produk farmasi (Abubakar & Haque, 2020).

## 5. Pembuatan Suspensi CMC-Na 0,5%

Timbang 0,5 g CMC-Na lalu taburkan ke dalam mortar yang berisi 10 mL air suling panas. Diamkan selama 15 menit atau sampai massa tembus tercapai. Hancurkan untuk membuat gel, yang kemudian dihomogenkan, diencerkan dengan sedikit air suling, dan ditambahkan ke dalam labu ukur dengan kapasitas 100 mL. Suspensi ini berfungsi sebagai kendaraan untuk ekstrak temu kunci berbasis etanol dan ekstrak APAP.

## 6. Pembuatan Suspensi Asetilsistein

Satu kapsul asetilsistein kandungannya 200 mg asetilsistein. Lakukan penimbangan terhadap 10 kapsul asetilsistein, kemudian digerus dalam lumpang hingga menjadi serbuk halus, kemudian serbuk ditimbang setara 200 mg asetilsistein. Serbuk yang telah ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam mortar bersama dengan CMC-Na 0,5% dan digerus hingga homogen sebelum dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL. 0,5% CMC-Na ditambahkan sampai garis tanda untuk membuat volume.

## 7. Pembuatan Suspensi *N*-asetil-*p*-aminophenol

Pembuatan suspensi APAP meliputi penimbangan 800 mg bubuk APAP, suspensikan CMC-Na 0,5% secara bertahap di dalamnya, lalu

tuangkan campuran yang dihasilkan ke dalam labu ukur 10 mL. Kemudian dihomogenkan.

## **8. Pembuatan Suspensi Ekstrak Etanol RimpangT emu Kunci (EERTK)**

Langkah-langkah berikut diambil untuk menyiapkan suspensi EERTK: Mortar diisi dengan 250 mg ERRTK kemudian tambahkan 2 tetes tween 20. Selanjutnya, sambil digerus hingga homogen, ditambahkan suspensi CMC-Na 0,5% secara bertahap. Setelah itu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. 0,5% CMC-Na digunakan untuk menambahkan volume hingga garis tanda. Proses yang sama digunakan untuk membuat suspensi EERTK dengan dosis 500 dan 750 mg/KgBB.

## **9. Hewan Uji**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur *Rattus norvegicus* Sprague-Dawley yang telah mendapatkan rekomendasi persetujuan etik penelitian Kesehatan dengan No. 0883/KEPH-FMIPA/2022, dengan berat badan berkisar 150-200 gram dan berusia 8-10 minggu saat aklimatisasi. Tikus diperoleh dari Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara. Pemeliharaan tikus dilakukan di dalam kandang polipropilen standar (ukuran 40 cm x 25 cm x 15 cm), yang dilengkapi dengan penutup kawat berpaling untuk ventilasi dan tempat pakan/minum. Setiap kandang diisi dengan empat ekor tikus untuk menghindari kepadatan berlebih dan mengurangi stres. Kondisi pemeliharaan dikontrol ketat untuk memastikan kesejahteraan hewan dan meminimalisir faktor eksternal yang dapat mempengaruhi hasil penelitian. Siklus terang-gelap diatur 12 jam terang dan 12 jam gelap menggunakan pencahayaan otomatis. Suhu kandang dipertahankan pada  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  dan

kelembapan relatif sekitar 50-60%. Tikus diberikan pakan pelet standar komersial (*ad libitum*) dan air minum (*ad libitum*) yang diganti setiap hari. Alas kandang menggunakan sekam padi steril yang diganti setiap dua hari untuk menjaga kebersihan dan mencegah akumulasi amonia. Penentuan jumlah tikus dalam setiap kelompok perlakuan didasarkan pada prinsip 3R (Replacement, Reduction, Refinement) dalam etika penelitian hewan, serta pertimbangan statistik untuk memastikan kekuatan statistik yang memadai. Untuk penelitian ini, setiap kelompok perlakuan dan kontrol terdiri dari enam ekor tikus ( $n=4$ ). Jumlah ini dianggap memadai untuk mendeteksi perbedaan signifikan antar kelompok dengan tingkat kepercayaan yang tinggi, berdasarkan literatur penelitian sejenis dan perhitungan statistik pendahuluan yang mempertimbangkan variabilitas parameter makropatologi dan indeks organ yang akan diukur.

## **10. Desain Hewan Uji**

Secara acak bagi ke dalam 6 kelompok 24 ekor hewan uji, pada setiap kelompok terdapat 4 ekor tikus putih jantan *Wistar* usia 6-8 minggu yang sehat dengan berat  $\pm 200-240$  g. sebelum dilakukan pengujian terhadap hewan uji, perlu dilakukan aklimatisasi selama 10 hari dengan tetap diberi akses terhadap makanan dan minuman secukupnya. Masing-masing 6 kelompok hewan uji yang setiap kelompok terdapat 4 ekor tikus dipelihara dengan kondisi yang sama serta diperlakukan seperti:

- a. kelompok P1: kontrol normal, di mana hewan uji memiliki akses *ad libitum* ke makanan dan air tetapi tidak ada perawatan lebih lanjut selama 10 hari.

- b. kelompok P2: kontrol negatif, hewan uji diberikan suspensi CMC-Na 0,5% sekali sehari selama 10 hari. Kemudian hari ke-10 diinduksi secara peroral dengan APAP 800 mg/kgBB (Shanmugam et al., 2013) yang dilakukan pada 1 jam setelah pemberian suspensi CMC-Na 0,5%. Hewan uji tetap diberikan akses terhadap makan juga minum dengan *ad libitum*.
- c. kelompok P3: kontrol positif, hewan uji diberi suspensi setara asetilsistein 200 mg (Rusmaladewi & Istanto, 2014) sekali sehari selama 10 hari. Kemudian di hari ke-10 diinduksi secara peroral dengan APAP 800 mg/kgBB yang dilakukan pada 1 jam setelah pemberian suspensi asetilsistein (dosis setara 200 mg pada manusia). Hewan uji tetap diberikan akses terhadap makan juga minum dengan *ad libitum*.
- d. kelompok P4: hewan uji diberi EERTK berdosis 250 mg/kgBB 1x sehari selama 10 hari. Kemudian pada hari ke-10 diinduksi secara peroral dengan APAP 800 mg/kgBB yang dilakukan pada 1 jam setelah pemberian suspensi EERTK dosis 250 mg/kgBB. Hewan uji tetap diberikan akses terhadap makan juga minum dengan *ad libitum*.
- e. kelompok P5: hewan uji diberi EERTK berdosis 500 mg/kgBB 1x sehari selama 10 hari. Kemudian pada hari ke-10 diinduksi secara peroral dengan APAP 800 mg/kgBB pada 1 jam setelah pemberian suspensi EERTK dosis 500 mg/kgBB. Hewan uji tetap diberikan akses terhadap makan serta minum secara *ad libitum*.
- f. kelompok P6: hewan uji diberi EERTK berdosis 750 mg/kgBB 1x sehari selama 10 hari. Kemudian pada hari ke-10 diinduksi secara peroral dengan APAP 800 mg/kgBB pada 1 jam

setelah pemberian suspensi EERTK dosis 750 mg/kgBB. Hewan uji tetap diberikan akses terhadap makanan dan minuman secara *ad libitum*.

Pada 16 jam setelah pemberian APAP di hari ke-11 tikus dikorbankan dengan cara dianestesi dengan kloroform lalu dikorbankan, kemudian dilakukan pembedahan dan pengumpulan darah dilakukan memakai jarum suntik langsung dari jantung tikus, masukkan darah ke dalam microtube, serum dipisahkan dengan cara sentrifugasi pada 1500 r/min selama 15 menit, organ hati kemudian ditimbang untuk mengukur indeks relative organ dan selanjutnya organ hati dimasuki ke pot yang terdapat buffer formalin untuk pengujian histopatologi.

### 11. Perhitungan Indeks Relatif Organ Hati

Lakukan penimbangan berat badan pada masing-masing kelompok tikus pada hari terakhir sebelum dikorbankan, setelah dikorbankan hati tikus diambil kemudian dilakukan penimbangan juga pada masing-masing hati tikus. Kemudian lakukan perhitungan indeks relatif organ dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\frac{\text{Berat Organ Hati Tikus}}{\text{Berat Badan Tikus}} \times 100\%$$

### 12. Pengamatan Makropatologi Organ Hati

Pengamatan makropatologi organ hati dilakukan dengan mengamati bentuk dan warna dari organ hati tikus.

### 13. Analisis Data

Pengukuran dari kelompok percobaan 1-6 dievaluasi secara statistik, dan perbedaan statistik antara kelompok ditentukan dengan memakai *one way-ANOVA* diikuti dengan analisis uji Turkey Post-Hoc memakai program SPSS (versi 25, SPSS

Inc., Chicago, IL, AS). Nilai  $p < 0.05$  sebagai indikasi perbedaan yang signifikan menurut statistik antara pengukuran kedua kelompok yang dibandingkan. Semua bacaan dan nilai yang dihitung dilaporkan sebagai Mean  $\pm$  SD. Grafik dibuat dengan aplikasi Graphad Prism.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Pengukuran Indeks Relatif Organ Hati pada Tikus

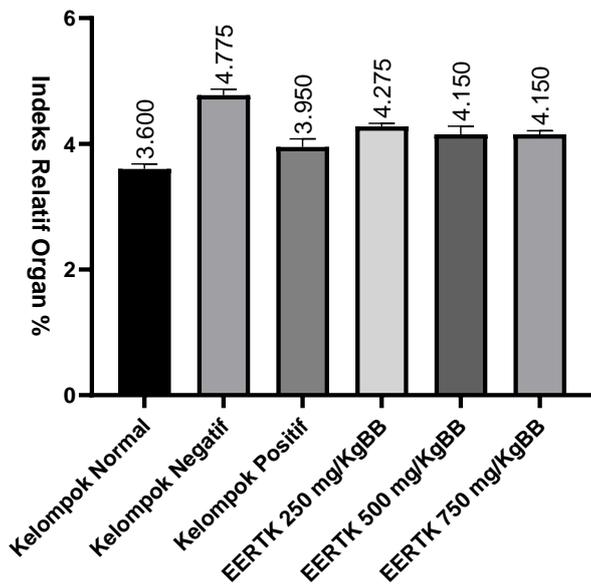
Pengukuran indeks relatif organ hati dilakukan untuk menganalisis pengaruh pemberian variasi dosis ekstrak etanol rimpang temu kunci (EERTK) pada tikus yang diinduksi APAP dosis 800 mg/kgBB terhadap rata-rata indeks relatif organ hati. Hal ini dilakukan dengan menimbang bobot tikus pada hari ke-11 setelah dikorbankan, kemudian hati tikus diambil dan ditimbang, lalu dihitung rata-rata indeks relatif organ pada tiap kelompok. Hasil rata-rata indeks relatif organ hati disajikan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil rata-rata indeks relatif organ hati tikus

Kelompok	IR (%) $\pm$ SD
Kontrol Normal (P1)	3,60 $\pm$ 0,28
APAP 800 mg/kg BB (P2)	4,77 $\pm$ 0,21
Asetilsistein 200 mg+APAP (P3)	3,95 $\pm$ 0,44
EERTK 250 mg/kg BB+APAP (P4)	4,27 $\pm$ 0,10
EERTK 500 mg/kg BB+APAP (P5)	4,15 $\pm$ 0,27
EERTK 750 mg/kg BB+APAP (P6)	4,15 $\pm$ 0,27

Pada kelompok kontrol normal diperoleh rata-rata indeks relatif organ 3,61  $\pm$  0,28%. Nilai ini merupakan rata-rata indeks relatif organ tikus dalam keadaan sehat (normal). Rata-rata indeks relatif organ pada kelompok kontrol normal lebih rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan

lain yang diinduksi dengan APAP 800 mg/kgBB. Kelompok kontrol positif (asetilsistein 200 mg) memiliki rata-rata indeks relatif organ 3,98  $\pm$  0,44% dan kelompok kontrol negatif (APAP 800 mg/kgBB) memiliki rata-rata indeks relatif organ paling tinggi yaitu 4,79  $\pm$  0,21%. Kelompok kontrol negatif menunjukkan rata-rata indeks relatif organ yang paling tinggi dibandingkan dengan semua kelompok. Hal ini disebabkan dosis APAP 800 mg/kgBB dapat mengindikasikan terjadinya hipertrofi pada jaringan hati tikus yang diinduksi APAP. Pemberian APAP dapat menginduksi terjadinya hipertrofi pada hati, yang mengakibatkan tingginya indeks relatif organ hati. Hipertrofi pada organ hati dapat mengindikasikan terjadinya kerusakan sel pada hati. Tingginya indeks relatif organ hati merupakan salah satu petunjuk ke arah terjadinya fibrosis hati, karena kondisi kerusakan hati yang sedang terjadi dapat memengaruhi indeks relatif organ hati. Pemberian ekstrak etanol rimpang temu kunci (EERTK) menunjukkan kemampuan untuk mencegah terjadinya hipertrofi pada organ hati, ditandai dengan rendahnya rata-rata indeks relatif organ hati pada pemberian asetilsistein 200 mg, EERTK 500 mg/kgBB, dan EERTK 750 mg/kgBB dibandingkan dengan kontrol negative (García-Román & Francés, 2020; Jaeschke & Ramachandran, 2024; Kim et al., 2024). Grafik pengaruh kelompok perlakuan terhadap indeks relatif organ dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Grafik pengukuran indeks relatif organ hati

Berdasarkan grafik, EERTK dosis 500 mg/kgBB dan 750 mg/kgBB dapat menurunkan rata-rata indeks relatif organ dibandingkan dengan kontrol negatif. Dosis EERTK yang paling efektif adalah 500 mg/kgBB dan 750 mg/kgBB. Penggunaan asetilsistein 200 mg sebagai kontrol positif terbukti menghasilkan rata-rata indeks relatif organ yang hampir sama dengan EERTK 500 mg/kgBB dan 750 mg/kgBB.

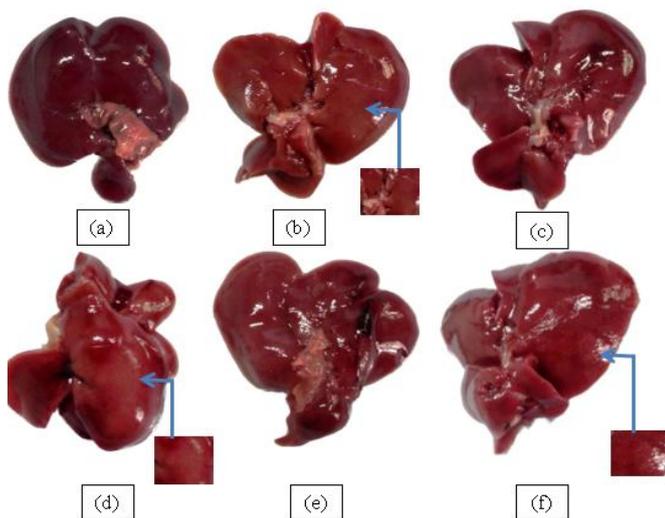
Indeks relatif organ hati kelompok kontrol negatif menunjukkan rata-rata tertinggi. Hal ini diperkuat dengan temuan makropatologi dari kelompok kontrol negatif yang menunjukkan adanya pembesaran pada organ hati yang disebabkan oleh APAP dosis toksik. N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) adalah metabolit reaktif yang menyebabkan deplesi glutation serta stres oksidatif. NAPQI juga mengikat protein seluler secara kovalen, menghasilkan kerusakan mitokondria, deplesi ATP, peroksidasi lipid, kerusakan DNA, dan nekrosis sel hati. [cite\_start]Hepatosit yang rusak juga mengaktivasi

sistem imun bawaan hati, yang meliputi sel Kupffer, sel *natural killer*, dan sel T *natural killer*. Hal ini menyebabkan cedera hati yang ditandai dengan meningkatnya produksi mediator pro-inflamasi seperti tumor necrosis factor- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , dan interleukin- $\beta$  (Villanueva-Paz et al., 2021). Adanya cedera pada sel hati akan menyebabkan gangguan aliran air keluar dan masuk ke dalam sel. Sel hati akan mengembang karena volume cairan yang tersimpan di membran sel, dan akan menghalangi aliran cairan masuk ke dalam sel. Organel yang terdapat dalam sel seperti retikulum endoplasma dan mitokondria mengembang menjadi kantung berisi air. Diketahui bahwa berbagai bentuk elektrolit, seperti ion  $K^+$  dan  $Na^+$ , dapat ditemukan dalam cairan tubuh baik di dalam maupun di luar sel. Keseimbangan kedua ion tersebut harus terkontrol agar kestabilan lingkungan internal sel tetap terjaga. Ion  $Na^+$  harus dipompa keluar sel (Xu et al., 2023). Akan tetapi, bila sel mengalami kerusakan maka kemampuannya untuk memompa ion  $Na^+$  keluar akan terganggu sehingga terjadi influks air ke dalam sel yang menyebabkan sel membengkak. Akibat dari sel yang membengkak ini, bobot organ hati juga akan meningkat (Liao et al., 2023). Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol rimpang temu kunci menunjukkan kandungan flavonoid. Kandungan senyawa polifenol seperti flavonoid berperan sebagai antioksidan secara tidak langsung, yaitu dengan meningkatkan ekspresi gen antioksidan enzimatik melalui berbagai jalur. Salah satu cara untuk meningkatkan ekspresi gen antioksidan adalah aktivasi *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2), yang menghasilkan peningkatan gen yang terlibat dalam

produksi enzim antioksidan endogen, seperti SOD (*superoksida dismutase*) dan GSH-Px (*gluthatione peroxidase*) sehingga mencegah terjadinya stres oksidatif. Hal ini pada akhirnya dapat mencegah kerusakan sel hati yang ditandai dengan penurunan persentase indeks relatif organ hati (Alim et al., 2022; INDRIATY et al., 2023).

## 2. Makropatologi Organ Hati Tikus

Hasil pengamatan makropatologi organ hati tikus putih jantan pada masing-masing kelompok perlakuan yang telah diberikan ekstrak etanol rimpang temu kunci (EERTK) selama 10 hari dan dilakukan induksi dengan APAP pada hari terakhir. Pengamatan yang dilakukan meliputi warna, konsistensi, dan bentuk permukaan hati ditunjukkan pada **Tabel 2** dan organ hati tikus ditunjukkan pada **Gambar 2**.



**Gambar 2.** Makropatologi organ hati tikus. (a) kelompok perlakuan normal, (b) kontrol negatif (APAP 800 mg/kg BB), (c) kontrol positif (asetilsistein 200 mg+APAP), (d) EERTK 250 mg/kg BB+APAP, (e) EERTK 500 mg/kg BB+APAP, (f) EERTK 750 mg/kg BB+APAP

**Tabel 2** Hasil pengamatan makropatologi organ hati tikus

Kelompok	Pengamatan		
	Warna	Konsistensi	Permukaan
<b>Kontrol Normal (P1)</b>	Merah tua	Kenyal	Licin
<b>APAP 800 mg/kg BB (P2)</b>	Merah tua pucat	Kenyal	Licin, terdapat bintik-bintik putih
<b>Asetilsistein 200 mg+APAP (P3)</b>	Merah tua	Kenyal	Licin
<b>EERTK 250 mg/kg BB+APAP (P4)</b>	Merah tua pucat	Kenyal	Licin, terdapat bintik-bintik putih
<b>EERTK 500 mg/kg BB+APAP (P5)</b>	Merah tua	Kenyal	Licin
<b>EERTK 750 mg/kg BB+APAP (P6)</b>	Merah tua pucat	Kenyal	Licin, terdapat bintik-bintik putih

Penelitian ini telah memberikan indikasi awal yang menjanjikan mengenai aktivitas hepatoprotektif ekstrak etanol Temu Kunci (EERTK) berdasarkan evaluasi makropatologi dan indeks organ. Meskipun demikian, terdapat tantangan dan batasan yang perlu diakui guna merumuskan arah penelitian di masa depan. Tantangan utama meliputi standardisasi ekstrak, mengingat variabilitas fitokimia Temu Kunci dapat dipengaruhi oleh faktor geografis dan metode pengolahan. Pemahaman mengenai mekanisme molekuler yang kompleks dari Temu Kunci dalam hepatoproteksi, meskipun flavonoid telah diidentifikasi sebagai komponen, masih membutuhkan eksplorasi yang

lebih mendalam. Selain itu, penilaian toksisitas jangka panjang dan potensi interaksi dengan obat lain menjadi tantangan krusial dalam mempertimbangkan aplikasi terapeutik di masa depan.

Penelitian ini memiliki batasan pada parameter evaluasi yang terbatas, hanya berfokus pada makropatologi dan indeks organ, yang mungkin belum sepenuhnya mencerminkan kerusakan seluler atau biokimia yang lebih mikro. Penggunaan model hewan tunggal, yaitu tikus putih jantan *Rattus norvegicus* Sprague-Dawley, juga merupakan batasan karena hasil pada hewan belum tentu sepenuhnya dapat direplikasi pada manusia. Lebih lanjut, ketiadaan validasi metode yang ketat untuk pengukuran makropatologi atau indeks organ dapat membatasi kemampuan peneliti lain untuk mereplikasi hasil secara konsisten.

Untuk memperkuat bukti dan memperluas pemahaman, penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan studi histopatologi yang lebih detail (misalnya dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin dan Masson's Trichrome untuk menilai fibrosis) serta pengukuran biomarker biokimia serum (seperti ALT, AST, ALP, bilirubin total/direk/indirek) dan parameter stres oksidatif (MDA, SOD, Katalase, GSH). Eksplorasi mekanisme molekuler harus menjadi fokus, termasuk investigasi ekspresi gen antioksidan (Nrf2, HO-1) dan jalur anti-inflamasi (NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1). Fraksinasi dan isolasi senyawa aktif dari ekstrak etanol Temu Kunci direkomendasikan untuk mengidentifikasi komponen spesifik yang bertanggung jawab atas efek hepatoprotektif. Selain itu, uji toksisitas subkronis dan kronis sangat penting untuk menilai keamanan penggunaan

jangka panjang. Penting juga untuk mengintegrasikan protokol validasi metode yang rigor, termasuk perhitungan *measurement uncertainty* dan faktor Z, guna meningkatkan reliabilitas dan replikabilitas hasil. Akhirnya, uji pada model penyakit hati lainnya (misalnya NAFLD atau fibrosis kronis) dan, jika memungkinkan, studi klinis pada manusia dapat dipertimbangkan untuk transisi Temu Kunci dari potensi laboratorium ke aplikasi terapeutik yang lebih luas.

Dalam pengukuran indeks relatif organ hati, akurasi dan presisi sangat vital. Neraca listrik yang digunakan untuk menimbang organ hati dan berat badan tikus dikalibrasi secara rutin setiap hari sebelum penggunaan dengan anak timbangan standar bersertifikat. Hasil kalibrasi menunjukkan akurasi yang tinggi, dengan deviasi pembacaan dari nilai standar umumnya berada dalam batas toleransi  $\pm 0,01\%$ . Untuk mengevaluasi presisi intra-assay, pengukuran berat organ hati pada 10 sampel acak dilakukan secara triplo oleh satu operator, menunjukkan Koefisien Variasi (CV%) rata-rata sekitar 0,37%, mengindikasikan presisi yang sangat baik. Presisi inter-assay, yang dinilai dari penimbangan 10 sampel yang sama oleh dua operator berbeda secara *blinded*, juga menunjukkan CV% rata-rata sekitar 0,44%, menegaskan konsistensi antar penilai. Lebih lanjut, penyertaan Interval Kepercayaan 95% (95% CI) untuk setiap rata-rata memberikan estimasi yang lebih kuat mengenai rentang nilai sebenarnya dari populasi, sangat mendukung interpretasi statistik yang kokoh.

Untuk validasi pengamatan makropatologi organ hati, yang bersifat semi-kuantitatif, objektivitas dan

konsistensi penilaian dijamin melalui standarisasi kriteria yang jelas dan terdefinisi untuk setiap parameter (warna, konsistensi, permukaan hati, dan keberadaan lesi). Guna mengurangi bias subjektif, makropatologi setiap organ hati dinilai secara independen oleh setidaknya dua pengamat yang terlatih dan tidak mengetahui kelompok perlakuan sampel (*blinded*). Dalam pengujian hipotesis terhadap 15 sampel, koefisien Kappa untuk kesepakatan antar penilai menunjukkan nilai berkisar 0,88 hingga 0,92 untuk parameter warna, konsistensi, dan permukaan, yang mengindikasikan tingkat kesepakatan yang sangat baik dan objektivitas tinggi dalam penilaian makropatologi. Seluruh organ hati juga didokumentasikan secara visual dengan pencahayaan dan resolusi yang konsisten, dilengkapi skala dan penanda identifikasi yang jelas, berfungsi sebagai data mentah visual yang dapat ditinjau ulang dan diverifikasi.

Selain validasi metode, validitas internal penelitian dipastikan melalui desain eksperimen yang kuat, seperti randomisasi tikus ke dalam kelompok perlakuan untuk meminimalkan bias seleksi, serta kontrol lingkungan yang ketat (suhu, kelembaban, siklus terang-gelap, pakan) untuk mengurangi variabel pengganggu. Penggunaan kelompok kontrol negatif (APAP) dan kontrol positif (asetilsistein) sangat esensial untuk menunjukkan efek induksi dan efek standar hepatoprotektif. Sementara itu, validitas eksternal, yang mengacu pada generalisasi hasil, didukung oleh penggunaan tikus galur standar (*Rattus norvegicus* Sprague-Dawley), meskipun translasinya ke manusia tetap memerlukan studi lebih lanjut. Konsistensi hasil dengan penelitian sebelumnya yang menggunakan

model APAP atau agen hepatoprotektif lain turut memperkuat validitas eksternal. Dengan mengimplementasikan langkah-langkah validasi ini, tingkat kepercayaan terhadap hasil yang dilaporkan akan meningkat signifikan, memungkinkan peneliti lain untuk mereplikasi temuan dan membangun penelitian di masa depan dengan fondasi yang kokoh.

## **PENUTUP**

### **Kesimpulan**

Penelitian ini secara jelas menunjukkan bahwa ekstrak etanol rimpang temu kunci (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.) memiliki aktivitas hepatoprotektif yang signifikan terhadap kerusakan hati yang diinduksi parasetamol (APAP) pada tikus putih jantan. Efek protektif ini terbukti melalui dua parameter utama: penurunan indeks relatif organ hati dan perbaikan kondisi makropatologi organ hati. Secara spesifik, induksi APAP 800 mg/kg BB secara oral menyebabkan peningkatan signifikan pada indeks relatif organ hati ( $4,77 \pm 0,21\%$ ), serta perubahan makropatologi berupa warna merah tua pucat dan adanya bintik-bintik putih pada permukaan hati, mengindikasikan hipertrofi dan kerusakan jaringan. Pretreatment dengan ekstrak etanol temu kunci dosis 500 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB secara efektif menurunkan indeks relatif organ hati menjadi  $4,15 \pm 0,27\%$ , yang mendekati nilai kelompok kontrol normal ( $3,60 \pm 0,28\%$ ) dan kelompok kontrol positif asetilsistein 200 mg ( $3,95 \pm 0,44\%$ ). Selain itu, ekstrak pada dosis 500 mg/kg BB juga mampu mengembalikan makropatologi hati menjadi berwarna merah tua, kenyal, dan berpermukaan licin, serupa dengan kondisi hati normal.

Penemuan ini menguatkan hipotesis bahwa senyawa metabolit sekunder, terutama flavonoid yang telah teridentifikasi dalam rimpang temu kunci, berperan dalam meminimalkan stres oksidatif dan kerusakan sel hati. Mekanisme yang mungkin terjadi melibatkan kemampuan antioksidan flavonoid dalam mengeliminasi radikal bebas seperti NAPQI yang terbentuk dari metabolisme APAP, serta menginduksi jalur antioksidan endogen melalui aktivasi Nrf2, yang pada gilirannya meningkatkan ekspresi enzim seperti SOD dan GSH-Px. Pencegahan pembengkakan sel hepatosit akibat gangguan keseimbangan ion dan influks cairan, yang diamati pada kelompok kontrol negatif, merupakan salah satu interpretasi dari penurunan indeks organ dan perbaikan makropatologi yang diamati pada kelompok perlakuan ekstrak.

Meskipun demikian, ada indikasi bahwa dosis 750 mg/kg BB yang secara indeks organ sebanding dengan 500 mg/kg BB, tidak menunjukkan perbaikan makropatologi yang setara (masih terdapat warna pucat dan bintik-bintik putih). Hal ini menyarankan bahwa respons biologis terhadap dosis ekstrak mungkin tidak selalu linear dan memerlukan investigasi lebih lanjut melalui parameter yang lebih sensitif, seperti histopatologi mikroskopis.

### Saran

Berdasarkan hasil pembahasan dan kesimpulan, maka disarankan pada peneliti selanjutnya untuk melakukan penambahan parameter uji lain seperti pengujian aktivitas dari mediator pro inflamasi TNF- $\alpha$  dan juga imunohistokimia pada faktor transkripsi gen enzim antioksidan seperti *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) agar

dapat diketahui mekanisme kerja yang lebih jelas dari ekstrak etanol rimpang temu kunci dalam menghambat terjadinya kerusakan hati akibat dari induksi APAP.

### DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(1), 1–10. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19)
- Alim, N., Hasan, T., Rusman, R., Jasmiadi, J., & Zulfitri, Z. (2022). Phytochemical Screening, Relationship of Total Phenolic with Antioxidant Activity Of Ethanol and Methanol Extracts of Kesambi (*Schleichera oleosa* (Lour.) Oken) Bark. *JURNAL ILMIAH SAINS*, 22(2), 118. <https://doi.org/10.35799/jis.v22i2.40091>
- García-Román, R., & Francés, R. (2020). Acetaminophen-Induced Liver Damage in Hepatic Steatosis. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 107(5), 1068–1081. <https://doi.org/10.1002/cpt.1701>
- Gonfa, Y. H., Bachheti, A., Semwal, P., Rai, N., Singab, A. N., & Bachheti, R. K. (2024). Hepatoprotective activity of medicinal plants, their phytochemistry, and safety concerns: a systematic review. *Zeitschrift Für Naturforschung C*. <https://doi.org/10.1515/znc-2024-0116>
- Harahap, M. S., Harahap, U., & Sitorus, P. (2023). Phytochemical Screening Of Ethanol Extract Of Temu Kunci (*Boesenbergia Rotunda* (L.) Mansf) Rhizome Extract And Testing Of Bilirubin Levels In Male White Mice. *International Journal of Science, Technology & Management*, 4(3), 582–588. <https://doi.org/10.46729/ijstm.v4i3.819>
- INDRIATY, I., DJUFRI, D., GINTING, B., & HASBALLAH, K. (2023). Phytochemical screening, phenolic and

- flavonoid content, and antioxidant activity of Rhizophoraceae methanol extracts from Langsa, Aceh, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 24(5). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240541>
- Jaeschke, H., & Ramachandran, A. (2024). Acetaminophen Hepatotoxicity: Paradigm for Understanding Mechanisms of Drug-Induced Liver Injury. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 19(1), 453–478. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-051122-094016>
- Kim, S. R., Kim, S. K., Kobayashi, H., Okuda, T., Nakai, A., Fujii, Y., Hayakumo, T., Suzuki, R., Otani, A., Sasase, N., Kim, K. I., Sasaki, M., Koma, Y., Asai, A., & Nishikawa, H. (2024). Acetaminophen-induced liver injury with atypical histopathologic findings: a case report. *Kanzo*, 65(2), 74–80. <https://doi.org/10.2957/kanzo.65.74>
- Kumar Jain, N., & Singh, N. (2023). Hepatoprotective Role of Herbs and Herbal Formulations. In *Plant-derived Hepatoprotective Drugs* (pp. 81–114). BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS. <https://doi.org/10.2174/9789815079845123010006>
- Liao, J., Lu, Q., Li, Z., Li, J., Zhao, Q., & Li, J. (2023). Acetaminophen-induced liver injury: Molecular mechanism and treatments from natural products. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1122632>
- Mahmood, F., & Hackl, F. (2024). Hepatic Function and Metabolism. In A. Abd-Elsayed (Ed.), *Basic Anesthesia Review* (pp. 707–708). Oxford University Press New York. <https://doi.org/10.1093/med/9780197584569.003.0290>
- Rusmaladewi, A., & Istanto, W. (2014). Pengaruh Pemberian NAcetylcysteine terhadap Kadar SGOT dan SGPT pada Tikus Wistar yang Diberi Parasetamol. *Medica Hospitalia : Journal of Clinical Medicine*, 2(2), 78–83. <https://doi.org/10.36408/mhjc.v2i2.96>
- Shanmugam, G., Ayyavu, M., Rao, D. M., Devarajan, T., & Subramaniam, G. (2013). Hepatoprotective effect of Caralluma umbellata against acetaminophen induced oxidative stress and liver damage in rat. *Journal of Pharmacy Research*, 6, 342–346.
- Stavrakeva, K., Popova, M., Esad, M., Apostolova, E., Kokova, V., Bancelova, M., Alakidi, A., & Bivolarska, A. (2024). Drug-Induced Liver Toxicity. *Acta Medica Bulgarica*, 51(4), 77–85. <https://doi.org/10.2478/amb-2024-0083>
- Sugiharto, S., Faradila, D., Rizqi Aningrum, K., Nur Hakiki, F. D., Zahrotus Sa'adah, A., Fatimatuz Zahroh, U., Soepriandono, H., & Sri Wulan Manuhara, Y. (2024). Potential of Jahe Merah (Zingiber officinale) and Temu Kunci (Boesenbergia rotunda): As Stimulator of Antioxidant Enzyme Activity and Anticancer in HepG2 Cell Line. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 3599–3606. <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2024.00562>
- Villanueva-Paz, M., Morán, L., López-Alcántara, N., Freixo, C., Andrade, R. J., Lucena, M. I., & Cubero, F. J. (2021). Oxidative Stress in Drug-Induced Liver Injury (DILI): From Mechanisms to Biomarkers for Use in Clinical Practice. *Antioxidants*, 10(3), 390. <https://doi.org/10.3390/antiox10030390>
- Xu, Y., Xia, Y., Liu, Q., Jing, X., Tang, Q., Zhang, J., Jia, Q., Zhang, Z., Li, J., Chen, J., Xiong, Y., Li, Y., & He, J. (2023). Glutaredoxin-1 alleviates acetaminophen-induced liver injury by decreasing its toxic metabolites. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 13(12), 1548–1561. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2023.08.004>
- Zayapor, M. N., & M., S. (2023). Herbal infusion – processing techniques, bioactivity, quality, and safety. *Food Research*, 6(Supplementary 2), 134–154. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.6\(S2\).019](https://doi.org/10.26656/fr.2017.6(S2).019)