BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan untuk mengetahui efektifitas kurkumin sebagai zat yang dapat menurunkan kadar MMP-2 serum tikus wistar jantan model fibrosis hati yang diinduksi dengan karbon tetraklorida (CCl_4). Pada peneitian ini, tikus yang digunakan dibagi dalam 8 kelompok yaitu K-Negatif yang tidak diinduksi CCl_4 tetapi diinduksi dengan NaCl, K-Positif yang diinduksi dengan CCl_4 1 ml/kgBB secara intraperitoneal 2x dalam seminggu selama 9 minggu dan tanpa pemberian kurkumin, kelompok perlakuan KP-2, KP-5, KP-9 yang diinduksi CCl_4 hingga 9 minggu kemudian diberikan kurkumin selama 2 minggu, 5 minggu, dan 9 minggu dengan dosis 200 mg/kgBB, serta kelompok kontrol KK-2, KK-5, KK-9 yang diberikan induksi CCl_4 selama 9 minggu kemudian diberikan pelarut kurkumin yaitu CMC selama 2 minggu, 5 minggu, dan 9 minggu. Tikus yang diberikan CCl_4 dengan dosis 1 mg/kgBB dua kali dalam seminggu selama 9 minggu bertujuan untuk membuat tikus dalam kondisi fibrosis derajat 3 (F3). Hal ini sesuai dengan penelitian pendahuluan sebelumnya yang diberikan induksi CCl_4 selama 2 minggu mampu memperoleh kondisi fibrosis derajat 1 (F1), 5 minggu untuk memperoleh kondisi fibrosis derajat 2 (F2), dan 9 minggu untuk memperoleh kondisi fibrosis derajat 3 (F3).

Berdasarkan dari hasil uji analisis dengan menggunakan metode *One Way ANOVA* pada semua data, didapatkan angka signifikansi 0.001 ($P<0.05$) yang berarti bahwa terdapat perbedaan yang bermakna dari kadar MMP-2 serum pada semua kelompok. Hasil penelitian untuk kelompok tikus fibrosis hati kelompok K-

Positif didapatkan peningkatan kadar MMP-2 serum yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok tikus nomal K-Negatif yang tidak diinduksi CCl_4. Pada uji *Post Hoc Test* pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan kelompok perlakuan didapatkan hasil bahwa antara K-Positif dan K-Negatif memiliki nilai signifikansi 0.008 ($p<0.05$) dan sebanding dengan hasil pengukuran derajat fibrosis dengan skor metavir bahwa pada kelompok K-Negatif derajat fibrosis hati adalah dari 4 sampel 3 mempunyai derajat fibrosis F0 dan 1 sampel F1. Sedangkan pada K-Positif yang diinjeksi dengan CCl_4 mempunyai derajat fibrosis 3 sampel F3 dan 1 sampel F2. Hal ini didukung oleh teori bahwa karbon tetraklorida (CCl_4) merupakan salah satu zat yang hepatotoksik yang dapat tertimbun dalam lemak tubuh, hepar dan sumsum tulang belakang. CCl_4 dapat menyebabkan kerusakan hepar melalui mekanisme reaksi stress oksidatif dan mekanisme biokimia (Monika, 2012) yang artinya akan terus terjadi kerusakan di hepatosit sehingga menimbulkan inflamasi kronis yang akan mengarah pada fibrogenesis hati. Pada keadaan ini sel hepar akan mengeluarkan mediator-mediator inflamasi yang akan mengaktivasi *Hepatic Stellate Cell* (HSC) menjadi fenotip miofibroblast, yang akan mengekspresikan matriks ekstraseluler seperti kolagen (Tipe I, III, dan IV), proteoglikan dan glikoprotein sehingga terjadi penimbunan matriks ekstraseluler di ruang Disse (Meng *et al*, 2012). Sel HSC yang telah teraktivasi akan mengalami peningkatan secara terus-menerus, peningkatan aktivasi sel HSC ini mengekspresi MMP-2 secara berlebih (Friedman, 2007). Terjadinya fibrosis hati dipengaruhi oleh peningkatan aktivasi HSC dan matriks ekstraseluler (Rockey, 2000). Selain itu MMP-2 terlibat selama proliferasi HSC. Peningkatan kadar MMP-2 ini akan masuk kedalam sirkulasi vena porta sehingga menyebabkan kadar MMP-2 serum meningkat (Vaiant *et al*.,

2001). MMP-2 serum tidak hanya disekresikan oleh HSC tetapi dalam sirkulasi sistemik juga disekrsikan oleh sel makrofag, sel monosit, sel dendritik, sel limfosit, neutrofil, sel *epithelial*, sel *endothelial* dari mesensimal, dan sel-sel otot polos dalam keadaan *injury* (Liabakk NB *et al*., 1996) yang kemudian akan masuk dalam sirkulasi darah. Peningkatan kadar MMP-2 didukung pada penelitian *in vitro* yang telah menunjukkan karena aktivasi HSC yang telah diinduksi oleh CCl_4 dan penurunan MMP-2 karena ada hambatan dalam aktivasi HSC (Benyon RC, Hovell CJ, Da Gaca M et al., 1999). Hal tersebut berarti bahwa ketika ada paparan CCl_4 dapat mengaktivasi HSC dan MMP-2 akan dilepaskan secara berlebih sehingga jumlahnya akan berlebih. Pada penelitian ini, kadar MMP-2 serum dideteksi melalui pemeriksaan ELISA untuk menggambarkan kadar MMP-2 serum dari setiap perlakuan, serta membandingkan dengan berbagai derajat fibrosis hati yang terjadi pada setiap perlakuannya.

Hasil penelitian pada kelompok yang dilakukan pemberian kurkumin dengan dosis 200 mg/kgBB yang dilarutkan dengan CMC diberikan secara oral 1 cc pada tikus kelompok perlakuan (KP) pada setiap hari yaitu dengan lama pemberian 2 minggu, 5 minggu, dan 9 minggu pada uji *post hoc test* menunjukkan adanya progresifitas penurunan kadar MMP-2 serum secara signifikan, antara K-Positif (kelompok yang tidak diberikan kurkumin) dengan KP-2 pada pemberian selama 2 minggu dengan nilai signifikansi 0,000 ($p<0,05$), KP-5 pada pemberian selama 5 minggu dengan nilai signifikansi 0,013 ($p<0,05$) dan KP-9 pada pemberian selama 9 minggu dengan nilai signifikansi 0,000 ($p<0,05$). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa kurkumin dapat mencegah fibrogenesis hati akibat paparan karbon tetrakorida (CCl_4) karena adanya

pelemahan stress oksidatif dan menekan inflamasi pada tikus dengan mengekspresikan sitokin-sitokin pro inflamasi yang dapat menghambat aktivasi HSC secara *in vitro* (Zhang *et al*., 2014). Hasil pengukuran ini sebanding dengan derajat fibrosis pada kelompok perlakuan setelah pemberian kurkumin, KP-2 yaitu 2 sampel dengan derajat fibrosis F2 dan 2 sampel dengan derajat fibrosis F1, pada KP-5 yaitu 3 sampel dengan derajat fibrosis F2 dan 1 sampel dengan derajat fibrosis F3, sedangkan pada KP-9 yaitu 2 sampel dengan derajat fibrosis F0 dan 2 sampel F1. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin rendah kadar MMP-2 serum, semakin rendah derajat kerusakan hati. Hasil penelitian ini sesuai dengan dengan teori bahwa selama fibrogenesis hati ketika diinduksi dengan CCl_4 akan menstimulasi *quite* HSC menjadi *activated* HSC, transformasi ini berhubungan dengan proliferasi dan produksi matriks ekstraseluler yang berlebihan. Penghambatan proliferasi sel dan induksi apoptosis merupakan strategi potensial untuk memblokir aktivasi HSC yang berlebih untuk mencegah fibrosis hati dan pengobatan fibrosis hati (Zheng dan Chen, 2004). Teori lain menyebutkan bahwa MMP merupakan mediator kunci dari regenerasi hati. Karena MMP mempunyai efek langsung pada perbaikan matriks ekstraseluler yang merupakan bagian integral regenerasi jaringan. MMP mempromosikan angiogenesis dengan memfasilitasi migrasi endotel melalui matriks ekstraseluler terdegradasi. Selain itu MMP melepaskan faktor pertumbuhan pro-endotel dari matriks ekstraseluer (Rundhaug, 2003).

Pada penelitian Schizhong Zheng 2004 menunjukkan bahwa kurkumin dapat menghambat aktivasi HSC secara i*n vitro*, mengurangi proliferasi sel, menginduksi apoptosis dan menghambat ekspresi matriks ekstraseluler yang berlebihan. Kurkumin merupakan antioksidan kuat, yang mampu menghambat

peroksidasi lemak (Sreejayan, 1994), sintesis aktivasi NO (Brouet dan Ohshima, 1995), produksi oksigen reaktif (Joe dan Lokesh, 1994), aktivasi protein kinase C (Liu dan Lin, 1993), aktivasi NF-kB (Singh dan Aggarwal, 1995). Kurkumin sebagai suplemen diet juga untuk pencegahan kanker (Ruby *et al*., 1995) dan perlindungan hati (Chuang *et al*.,2000). Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa kurkumin menginduksi ekspresi gen PPARγ dan menstimulasi apoptosis HSC *activated* secara *in vitro*. Aktivasi PPARγ memiliki efek pada fisiologis dan patofisiologis yang beragam, termasuk stimulasi diferensiasi adiposit, aktivasi insulin, pengaturan metabolise lemak, penghambatan proliferasi sel dan induksi apoptosis (Houseknecht *et al*., 2002; Takashima *et al*., 2001; Tontonoz *et al*.,1997). Penelitian terbaru telah menunjukkan bahwa PPARγ ada dalam hati yang normal, namun tingkat PPARγ dan aktivasinya berkurang selama aktivasi HSC secara *in vitro* dan *in vivo* (Galli *et al*., 2000). Stimulasi aktivasi PPARγ dapat menghambat proliferasi HSC dan ekspresi kolagen α1 (Miyahara *et al*.,2000). Aktivasi PPARγ oleh kurkumin adalah langkah yang diperlukan, dan memberikan konstribusi terhadap induksi apoptois HSC dengan aktivasi merangsang caspase 3, meningkatkan pro apoptosis Bax dan mengurangi tingkat anti-apoptosis Bcl-2 di *activated* HSC secara *in vitro*. Selain itu aktivasi PPARγ oleh kurkumin juga mampu untuk menghambat ekspresi matriks ekstraseluler. Aktivasi PPARγ dimediasi oleh blokade TGF-β dengan menekan reseptor TGF-β (Zheng dan Chen, 2004). Penelitian yang lain menyebutkan bahwa mekanisme apoptosis HSC dapat melalui penghambatan NF-kB, NF-kB merupakan faktor yang dapat menstimulasi *activated* HSC (F.Oakley *et al*.,2005). Sehingga dengan apoptosis *activated* HSC dengan berbagai mekanisme mampu menurunkan kadar MMP-2 serum.

Hasil penelitian pada kelompok K-positif (diinduksi dengan CCl_4) dengan kelompok kontrol KK-2, KK-5, dan KK-9 (kelompok yang diinduksi dengan CCl_4 dan diberikan plasebo yaitu CMC) menunjukkan tidak ada beda secara bermakna. Hal tersebut mengartikan bahwa kadar MMP-2 serum pada kelompok kontrol sama dengan k-positif yang berarti tidak ada efek atau reaksi terhadap penurunan kadar MMP-2 serum. Pada kelompok kontrol yang hanya diberikan plasebo pelarut kurkumin yaitu CMC menunjukkan adanya penurunan kadar MMP-2 serum dibandingkan dengan kontrol positif. Hal ini dikarenakan CMC bersifat stabil terhadap lemak, tidak larut dalam pelarut organik dan bersifat sebagai pengikat. Pada penelitian Eka Pramyrtha pada tahun 2010 pemberian CMC pada tikus normal selama 30 hari tidak memberikan efek degenerasi dan kongesti pada penampang hati secara histologi. Hal tersebut mengartikan bahwa penurunan kadar MMP-2 serum pada kelompok kontrol dibandingkan dengan kontrol positif dikarenakan oleh resolusi spontan setelah induksi CCl_4 dihentikan sehingga masih diperlukan peneitian lebih lanjut. Perbaikan derajat fibrosis pada KK-9 terkait dengan resolusi spontan fibrosis hati dimana setelah induksi CCl_4 dihentikan tidak ada transformasi *quiete* HSC ke *activated* HSC dan akan terjadi peningkatan aktivitas kolagenolitik yang merupakan mekanisme utama dari resolusi fibrosis. Kolagen fibrilar (I dan III) diturunkan oleh MMP. Selama resolusi spontan fibrosis, aktivas MMP meningkat sehingga pada hasil penelitian ini kadar MMP-2 serum pada KK-9 meningkat, hal tersebut sehubungan dengan penurunan cepat ekspresi TIMP-1. Terjadi degradasi parsial kolagen fibrilar, sementara itu, perubahan interaksi antara HSC aktif dan matriks ekstraseluler akan menimbulkan apoptosis. Pembuangan HSC aktif dengan cara apoptosis

mendahului resolusi fibrosis (Bataller, Brenner, 2005; Leija, Reyes, Rodriquez, 2007; Iredale, 2007).

Dengan demikian, paparan kurkumin pada kelompok perlakuan KP-2, KP-5 dan KP-9 dapat menurunkan kadar MMP-2 serum secara signifikan melalui apoptosis HSC aktif dan sebanding dengan penurunan derajat fibrosis hati. Tetapi kelompok perlakuan yang paling efektif adalah KP-9 sebanding dengan rendahnya derajat fibrosis yang mendekati nilai normal.

6.2 Implikasi pada Bidang Kedokteran

Penelitian mengenai pengaruh pemberian kurkumin terhadap kadar MMP-2 serum pada tikus model fibrosis hati akibat induksi CCl_4 telah diketahui berdasarkan hasil penelitian ini. Dari analisa data didapatkan hasil yang signifikan terhadap perbedaan kadar MMP-2 serum pada kontrol positif (diinduksi CCl_4) terhadap kontrol negatif (tidak diinduksi CCl_4) dan pada kontrol positif terhadap kelompok perlakuan KP-2, KP-5, KP-9. Dengan demikian, kurkumin dapat dipertimbangkan penggunaannya sebagai salah satu strategi terapi fibrosis hati. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui pengaruh kurkumin dalam menurunkan kadar MMP-2 serum dan proses fibrosis hati melalui penelitian *clinical trial*.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Terdapat beberapa faktor yang menjadi keterbatasan peneliti dalam melaksanakan penelitian mengenai pengaruh pemberian kurkumin terhadap kadar MMP-2 serum pada tikus model fibrosis hati yang diinduksi CCl_4. Penelitian *in vivo* menggunakan hewan coba memiliki keterbatasan dalam

pemilihan hewan coba yang sesuai untuk penelitian karena adanya variasi genetik dalam satu spesies hewan. Hal ini dapat menyebabkan berbedanya respon hewan terhadap perlakuan yang diberikan. Efek dari induksi CCl4 yang dilakukan setiap 2 kali dalam seminggu selama 9 minggu menyebabkan beberapa hewan coba mati karena efek toksik dari CCl_4, penuruan MMP-2 serum dipengaruhi oleh banyak faktor yang berpotensi sebagai perancu dan sekresi MMP-2 serum dalam darah tidak hanya dihasilkan oleh HSC saja tetapi dapat dihasilkan oleh organ-organ yang mengalami inflamasi. Oleh karena itu, masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui peran spesifik MMP-2 serum dalam fibrosis hati.