

## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Sebelum memberikan perlakuan pada masing-masing kelompok, 48 tikus ini terlebih dahulu diadaptasi terhadap lingkungan selama kurang lebih 7 hari. Setelah itu tikus dibagi menjadi 8 kelompok yaitu 1 kontrol negatif, 1 kontrol positif, 3 kelompok perlakuan dengan perbedaan pada lama pemberian kurkumin (2 minggu, 5 minggu, dan 9 minggu), dan 3 kelompok kontrol dari masing-masing lama pemberian. Tiap kelompok terdiri dari 6 tikus yang telah diseleksi dari kriteria inklusi dan kriteria eksklusi. Semua tikus, kecuali tikus pada kontrol negatif, akan diinduksikan dengan karbon tetraklorida (CCI<sub>4</sub>) selama 9 minggu agar mengalami fibrosis hati. Induksi karbon tetraklorida itu sendiri dilakukan secara intraperitoneal dengan dosis pada masing-masing tikus sebesar 1 ml/kgBB. Selama pemberian CCI<sub>4</sub> dengan durasi 9 minggu ini, telah terdapat 6 tikus yang mati, 1 tikus dari KK9 ditemukan dalam keadaan kepala sudah terkoyak, kemungkinan karena berkelahi dengan sesama tikus, 1 tikus dari KK5 ditemukan kejang-kejang dan meninggal sesaat setelah diinjeksikan CCI<sub>4</sub>, 1 tikus lain dari KK5, 1 dari kontrol positif, dan 2 tikus dari KP5, ditemukan sudah dalam keadaan meninggal ketika akan memberi makan dan minum tikus. Setelah 9 minggu, tikus dari kontrol negatif dan kontrol positif dikorbankan dan diambil serum dan organ-organ yang dibutuhkan. Pada saat inilah dimulai pemberian kurkumin pada kelompok perlakuan dengan dosis sebesar 200 mg/KgBB. Sedangkan pada kelompok kontrol hanya diberikan plasebo pelarut kurkumin CMC Na. Selama 2 minggu pertama pemberian kurkumin / plasebo, terdapat 1

tikus ditemukan meninggal tanpa ada tanda-tanda bekas luka pada KP9 dan 1 tikus pada KP2 meninggal sesaat setelah pemberian kurkumin, kemungkinan karena sonde salah masuk ke paru-paru. Setelah 2 minggu, tikus pada KP2 dan KK2 dikorbankan dan diambil serum serta organ-organ yang diperlukan. Kemudian, pemberian kurkumin dilanjutkan lagi selama 3 minggu, setelah pemberian selama 3 minggu, tikus-tikus pada KP5 dan KK5 dibedah dan diambil yang diperlukan. Selama 3 minggu ini, ditemukan 1 tikus yang mati pada KK9 ketika akan memberikan pakan dan minum. Kemudian pemberian kurkumin dilanjutkan kembali selama 4 minggu. Selama periode ini, ditemukan 1 tikus yang mati dari KP9 saat akan memberi pakan dan minum. Setelah pemberian kurkumin selesai, dilakukan pembedahan terakhir pada KP9 dan KK9.

Berdasarkan dari hasil uji analisis dengan menggunakan metode *One Way ANOVA*, didapatkan angka signifikansi sebesar 0,000 yang berarti bahwa terdapat perbedaan yang bermakna dari hasil ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati tikus pada kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol, baik kontrol positif maupun kontrol perlakuan. Pada kontrol positif, ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati lebih tinggi dibandingkan dengan ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati pada kontrol negatif dengan selisih yang jauh berbeda (Gambar 5.2). Karbon tetraklorida dapat menyebabkan nekrosis sentrizonal dan steatosis. Karbon tetraklorida merusak hepatosit dengan cara mengubah permeabilitas membran plasma, lisosom, dan mitokondria. Biotransformasi karbon tetraklorida memproduksi metabolit yang bersifat hepatotoksik, yaitu radikal bebas *trichloromethyl* yang sangat reaktif, yang akan dikonversikan menjadi *peroxytrichloromethyl* (Williams dan Burk, 1990). ROS yang dihasilkanlah yang memberikan kontribusi terhadap *onset* dan progresi

fibrosis (Poli, 2000). Hal itu dapat menjelaskan bahwa CCl<sub>4</sub> yang diberikan pada tikus kontrol positif berperan dalam meningkatkan ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati.

Dari hasil penelitian ini (Gambar 5.3) dapat diketahui bahwa kelompok perlakuan selama 2 minggu memiliki rerata ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati yang lebih rendah (4,3 sel) dibandingkan rerata ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati pada kelompok kontrol positif (36,825 sel). Rerata ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati kelompok perlakuan selama 2 minggu ini pun juga lebih rendah dibandingkan dengan rerata ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati kelompok kontrol selama 2 minggu (65,375 sel) (Gambar 5.4). Hasil ini mengartikan bahwa pemberian kurkumin memang memberikan efek mempercepat penurunan ekspresi TGF- $\beta$  dalam jaringan hati karena pada kelompok kontrol positif maupun kelompok kontrol 2 minggu tidak diberikan larutan kurkumin. Namun, berdasarkan rerata ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati, kurkumin memberikan efek terapi yang maksimal jika hanya diberikan selama 2 minggu, karena pada minggu ke-5 dan ke-9 ekspresi TGF- $\beta$  kembali meningkat. Walaupun demikian, kelompok perlakuan 2 minggu dibandingkan dengan kelompok kontrol 2 minggu tidak berbeda secara signifikan. Dalam kondisi ini, pemberian kurkumin optimal selama 2 minggu untuk menurunkan ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati dan mencapai target penyembuhan pada fibrosis hati.

Pada data hasil penelitian di tikus kelompok perlakuan 5 minggu (Gambar 5.3), rerata ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati tikus pada kelompok perlakuan selama 5 minggu (7,575) lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan 2 minggu namun tetap lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol positif secara signifikan ( $p=0,000$ ). Berdasarkan rerata ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati tikus kelompok 5 minggu, kelompok perlakuan memiliki rerata ekspresi lebih rendah dibandingkan

kelompok kontrol (94,525 sel) secara signifikan ( $p=0,000$ ) (Gambar 5.5). Artinya, bahwa pada perlakuan selama 5 minggu, terapi kurkumin ini tidak efektif untuk terus menurunkan ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati karena terjadi peningkatan dibandingkan kelompok perlakuan 2 minggu. Walaupun demikian, kelompok yang diberikan kurkumin selama 5 minggu memiliki ekspresi TGF- $\beta$  yang lebih rendah dibandingkan kelompok yang hanya diberikan plasebo.

Pada kelompok perlakuan selama 9 minggu, dari hasil pembacaan data penelitian (Gambar 5.3), dapat ditemukan bahwa, rerata ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati pada kelompok perlakuan selama 9 minggu (22,225 sel) lebih rendah dibandingkan dengan rerata ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati tikus kelompok kontrol positif (36,825 sel), kemudian ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati kelompok perlakuan 9 minggu ini pun juga memiliki nilai yang sedikit lebih rendah jika dibandingkan dengan ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati tikus kelompok kontrol 9 minggu (Gambar 5.5) (22,525 sel) dengan angka signifikansi sebesar 1,000 yang berarti bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati pada tikus model fibrosis hati kelompok perlakuan selama 9 minggu dengan kelompok kontrolnya. Berdasarkan penghitungan ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati seluruh kelompok, didapatkan kelompok KP2 yang memiliki ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati yang paling sedikit selisihnya dengan kontrol negatif (tikus yang tidak fibrosis), yakni sebesar 0,1 sel. Dosis kurkumin yang digunakan dalam penelitian ini apabila dikonversikan dengan dosis manusia berdasarkan tabel konversi perhitungan dosis Laurence dan Bacharach, 1964 (Lampiran 2) adalah 32 mg/kgBB.

Pada saat terjadi kerusakan jaringan hati ketika diberikan injeksi karbon tetraklorida ( $CCl_4$ ), sel parenkim hati akan merespon kerusakan tersebut dengan

melakukan regenerasi sel dalam responnya terhadap inflamasi dan deposisi dari sel matriks ekstraseluler, sedangkan pada kasus fibrosis hati yang masih awal, akan terjadi perbaikan dari hati secara spontan (Bataller dan Brenner, 2005). Kurkumin memiliki efek antifibrosis, karena pemberian kurkumin pada tikus dengan fibrosis hati yang diinduksi dengan CCl<sub>4</sub>, secara signifikan mengurangi aktivitas serum aspartat aminotransferase, alkali fosfatase, dan alanine aminotransferase, serta memperbaiki jaringan hati secara arsitektur histologisnya (Fu, *et al.* 2008). Seperti yang telah diketahui, stress oksidatif memiliki kontribusi yang penting dalam inisiasi dan progresi beberapa penyakit hati, dimana NF- $\kappa$ B merupakan salah satu faktor regulator transkripsi inflamatorik yang sangat berperan pada penyakit hati. NF- $\kappa$ B yang dapat meregulasi berbagai sitokin proinflamatorik dan profibrotik memiliki peran yang penting dalam mitigasi penyakit hati. Efek antiinflamasi kurkumin sebagian dimediasi melalui inhibisi aktivitas I $\kappa$ B kinase sehingga terjadi supresi aktivasi NF- $\kappa$ B (Anand *et al.*, 2008). NF- $\kappa$ B yang terinaktivasi dapat menyebabkan ekspresi siklooksigenasi-2 (COX-2) berkurang (Irving *et al.*, 2011; Shang *et al.*, 2010).

Kurkumin mengaktivasi PPAR-  $\gamma$ , menghambat ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*), meningkatkan konten GSH (Glutation) seluler, dan menghambat ekspresi *toll-like receptor-4* sehingga menyebabkan downregulasi NF- $\kappa$ B pada sel stellata hati (Chen dan Zheng, 2008). Prosedur tersebut menghasilkan supresi ekspresi gen reseptor TGF- $\beta$  dan supresi ekspresi gen cTGF (*Connective Tissue Growth Factor*). Hasilnya adalah penurunan produksi matriks ekstraseluler dari sel stellata hati yang teraktivasi dan perbaikan pada injuri hati (Zheng dan Chen, 2006). Jika dilihat dari lama pemberian larutan kurkumin, dari pemberian kurkumin 2 minggu, 5 minggu, dan 9 minggu, terjadi

penurunan ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati pada kelompok perlakuan 2 minggu dibandingkan kelompok kontrol positif. Hal ini membuktikan bahwa larutan kurkumin, zat yang diharapkan sebagai terapi fibrosis hati, memang mampu mempercepat perbaikan fibrosis hati ditinjau dari penurunan ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati.

Pada kelompok perlakuan yang diberikan kurkumin selama 5 dan 9 minggu, tampak ekspresi TGF- $\beta$  jaringan hati meningkat kembali. Terdapat beberapa kemungkinan yang menyebabkan hal itu. Kemungkinan pertama adalah pemberian kurkumin pada rentang waktu tersebut telah berlebihan hingga mencapai kadar toksik. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, kurkumin dengan konsentrasi tinggi dapat menyebabkan aberasi kromosom, kematian sel astrosit, efek teratogenik, dan toksisitas reproduktif (Ganiger *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Burgos-Morón *et al.*, 2010; Romero-Hernández *et al.*, 2013). Kurkumin juga dapat bersifat hepatotoksik pada dosis tinggi pada tikus, namun tidak pada manusia, karena manusia dapat menoleransi kurkumin dengan dosis tinggi (Deshpande *et al.*, 1998; Ireson *et al.*, 2001). Namun sejauh ini, hanya sedikit penelitian mengenai toksisitas kurkumin pada hewan dan manusia (Rivera-Espinoza dan Muriel, 2009). Selain itu, studi mengenai toksisitas jangka panjang kurkumin juga masih perlu dilakukan sebelum dapat diaplikasikan pada manusia (Gupta *et al.*, 2013).

Selain itu, dalam keadaan hati normal TGF- $\beta$  dapat ditemukan terutama pada sel kupffer. Ekspresi TGF- $\beta$  pada sel kupffer 9 kali lebih tinggi daripada sel stellata hati (De Bleser *et al.*, 1997). Pada hepar yang sedang mengalami regenerasi setelah terjadi kerusakan, TGF- $\beta$  tetap ada dan diperkirakan tidak berkaitan dengan proses fibrogenesis, dan hepatosit dari hepar yang sedang

mengalami regenerasi tersebut dapat mengaktifkan TGF- $\beta$  laten (Bissell *et al.*, 1995). Dari uraian tersebut, dapat diketahui bahwa TGF- $\beta$  tidak hanya berperan pada proliferasi sel stellata dan produksi matriks ekstraseluler dalam fibrogenesis, namun juga dalam regenerasi hepatosit setelah terjadi kerusakan. Proses memblok aktivitas TGF- $\beta$  dengan berbagai cara memang terbukti menghambat proses fibrosis pada model-model eksperimen. Namun, TGF- $\beta$  juga memiliki fungsi penting sebagai imunomodulator dan memiliki efek antiproliferatif pada sel epitel, termasuk hepatosit. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Date dkk. pada tahun 2000, pada proses regenerasi hepar terdapat proliferasi hepatosit dan peningkatan ekspresi TGF- $\beta$ , padahal TGF- $\beta$  berperan sebagai agen antiproliferasi. Diperkirakan penurunan reseptor TGF- $\beta$  I dan II hepatosit setelah injuri akibat CCl<sub>4</sub> merupakan penyebab penurunan inhibisi pertumbuhan hepatosit yang dimediasi oleh TGF- $\beta$ . Hal tersebut yang mungkin dapat menjelaskan kondisi proliferasi hepatosit yang mungkin berkorelasi dengan peningkatan ekspresi TGF- $\beta$  dan deposisi matriks ekstraseluler, yakni kembalinya jumlah ekspresi reseptor TGF- $\beta$  ke jumlah yang normal pada saat regenerasi hati sehingga sensitivitas hepatosit terhadap TGF- $\beta$  meningkat dan pada titik tertentu ketika hati telah beregenerasi, TGF- $\beta$  akan memberi sinyal antiproliferasi. Pengamatan tersebut memang menimbulkan masalah untuk dipelajari lebih lanjut mengenai bagaimana hepatosit meregulasi reseptor TGF- $\beta$  dalam proses fibrosis dan regenerasi (Date *et al.*, 2016).

TGF- $\beta$  yang juga berperan banyak dan penting pada fisiologi hepar memang menjadi penyulit dalam menentukan skenario regulasinya yang pasti. Setiap tahunnya fungsi regulator TGF- $\beta$  terus ditemukan, sehingga terdapat kemungkinan perlakuan yang diberikan memberi pengaruh pada target-target

lain dalam regulasi TGF- $\beta$ . Dengan demikian, berbagai macam sel yang responsif terhadap TGF- $\beta$  dengan fungsi yang berbeda-beda perlu dipertimbangkan dalam penentuan target terapi. Peran TGF- $\beta$  yang kompleks menyebabkan sulitnya menganalisis korelasi antara ekspresi dengan manifestasi klinis yang dihasilkan pada fibrogenesis (Fabregat *et al.*, 2016).

Faktor-faktor yang dapat memengaruhi penelitian ini adalah pemrosesan imunohistokimia yang luaran hasilnya tergantung oleh banyak faktor, seperti keterampilan dan pengalaman dalam interpretasi hasil (Alves *et al.*, 1999). Oleh karena itu, luaran proses imunohistokimia harus diinterpretasikan dengan perhatian. Spesimen terfiksasi yang disimpan terlalu lama juga dapat kehilangan antigenisitasnya (Yaziji dan Barry, 2006).

## 6.2 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan penelitian ini antara lain tidak dapat mengetahui ekspresi TGF- $\beta$  awal sebelum diberi perlakuan, sehingga hanya dapat menggunakan kelompok kontrol sebagai pembandingnya. Selain itu, kelemahan dalam teknik imunohistokimia yakni luarannya sangat dipengaruhi oleh alat dan bahan, pemotongan jaringan, pengecatan preparat dan media penyimpanan. Metode imunohistokimia juga memiliki keterbatasan yang hanya memberikan gambaran sebatas ekspresi protein yang spesifik serta tidak dapat diketahui kadar pastinya.