

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Sebelum memberikan perlakuan pada masing – masing kelompok, 48 tikus terlebih dahulu diadaptasi terhadap lingkungan selama kurang lebih 7 hari. Setelah itu, tikus dibagi menjadi 8 kelompok menjadi Kelompok Kontrol Negatif (KN), Kelompok Kontrol Positif (KP), Kelompok Perlakuan 2 Minggu (KP2), Kelompok Perlakuan 5 Minggu (KP5), Kelompok Perlakuan 9 Minggu (KP9), Kelompok Kontrol 2 Minggu (KK2), Kelompok Kontrol 5 Minggu (KK5), dan Kelompok Kontrol 9 Minggu (KK9). Setelah itu, tiap kelompok akan diisi oleh 6 ekor tikus yang telah diseleksi dari kriteria inklusi dan eksklusi. Semua tikus akan diinduksi oleh Karbon Tetraklorida (CCl_4) sebanyak 2 kali seminggu selama 9 minggu, kecuali tikus pada kelompok KN. Induksi CCl_4 diberikan secara intraperitoneal (IP) dengan dosis 1cc/KgBB. Selama pemberian CCl_4 selama 9 minggu ini didapatkan 6 tikus yang mati, dengan rincian 1 tikus dari KK9 ditemukan dalam keadaan kepala sudah terkoyak, 1 tikus dari KK5 mengalami kejang – kejang setelah pemberian CCl_4 , dan 1 tikus lain dari KK5, 1 dari kelompok KP, dan 2 tikus dari KP5 ditemukan sudah mati ketika akan memberi makan dan minum tikus. Setelah 9 minggu, tikus dari kelompok KP dan KN dikorbankan dan diambil organ hatinya. Tikus yang tersisa selanjutnya diberikan kurkumin dengan dosis 200mg/KgBB untuk kelompok perlakuan dan plasebo pelarut kurkumin CMC Na untuk kelompok kontrol. Pemberian tersebut dilakukan selama 2 minggu, 5 minggu, dan 9 minggu. Selama 2 minggu pertama pemberian kurkumin/plasebo, terdapat 1 tikus yang mati tanpa ada tanda – tanda bekas luka pada KP9 dan 1

tikus dari KP2 mati sesaat setelah pemberian kurkumin. Setelah 2 minggu, tikus dari KP2 dan KK2 dikorbankan dan diambil organ hatinya. Lalu, dilanjutkan kembali pemberian kurkumin/plasebo untuk 3 minggu kedepan. Selama 3 minggu tersebut ditemukan 1 tikus mati dari KK9 ketika akan diberikan makan dan minum. Setelah 3 minggu, tikus dari KP5 dan KK5 dikorbankan dan diambil organ hatinya. Kemudian, dilanjutkan kembali pemberian kurkumin/plasebo untuk 4 minggu kedepan. Selama 4 minggu tersebut ditemukan 1 tikus mati dari KP9 ketika akan diberikan makan dan minum. Setelah 4 minggu, pemberian kurkumin/plasebo selesai untuk semua tikus yang tersisa dan dilakukan pembedahan terakhir untuk KP9 dan KK9.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat hubungan antara ekspresi IL – 17 jaringan terhadap derajat fibrosis pada tikus yang diinduksi CCl₄ dan diberikan kurkumin. CCl₄ adalah zat hepatotoksik yang dapat menyebabkan kerusakan pada hati (Rohmatin *et al.*, 2015). Hal ini dikarenakan ketika CCl₄ dimasukkan kedalam tubuh, zat ini akan dimetabolisme oleh sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) di dalam endoplasmik retikulum hati. Hasil metabolismenya adalah berupa radikal bebas triklorometil (CCl₃). Triklorometil dengan oksigen akan membentuk radikal triklorometilperoksi yang dapat menyerang lipid membran endoplasmik retikulum dengan kecepatan yang melebihi radikal bebas triklorometil. Selanjutnya, triklorometilperoksi menyebabkan peroksidasi lipid sehingga mengganggu homeostasis Ca²⁺ dan akhirnya menyebabkan kerusakan hepatosit (Panjaitan *et al.*, 2007). Hepatosit yang rusak akan melepaskan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan mediator fibrogenik, serta menginduksi sel darah putih oleh sel – sel yang terinflamasi (Adhika, 2009).

Jejas dan inflamasi yang terjadi pada sel-sel hati tersebut, akan mengaktivasi berbagai sel adaptif imunitas tubuh, terutama sel limfosit T CD₄⁺. Sel T CD₄⁺ yang naif ini yang akan berdiferensiasi menjadi Th 1, Th 2, Treg, dan Th17, tergantung pada sitokin utama yang memicu diferensiasi tersebut (Hammerich *et al.*, 2010). Pada diferensiasi sel T CD₄⁺ menjadi sel Th17 diinisiasi oleh aksi dari TGF- β , IL-6, dan IL-21 pada tikus, sedangkan pada manusia diinisiasi oleh TGF- β dan IL-23. Sitokin-sitokin ini memicu ekspresi dari *orphan nuclear receptor* (ROR γ t) pada tikus dan RORc pada manusia, yang diperlukan untuk perkembangan dari Th17 ini menghasilkan berbagai sitokin yaitu IL-17 dan IL-22 yang mempunyai efek proinflamasi yang poten (Meng *et al.*, 2012). IL – 17 secara aktif berperan dalam mengaktivasi *Hepatic Stelate Cell* (HSC) dan juga dapat menginduksi secara langsung pembentukan kolagen tipe 1 oleh HSC yang aktif melalui jalur STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) (Pellicoro *et al.*, 2014). Hal inilah yang menyebabkan terakumulasinya matrik ekstraseluler di jaringan hati yang didefinisikan sebagai fibrosis hati.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa CCl₄ terbukti menyebabkan fibrosis hati pada tikus hewan coba. Hal ini dapat dipastikan dengan membandingkan ekspresi IL – 17 jaringan dan derajat fibrosis pada hati tikus di dalam kelompok Kontrol Positif (KP) dan Kontrol Negatif (KN). Rata – rata ekspresi IL – 17 jaringan pada kelompok KP (30,7028 \pm 17,34756%) lebih tinggi dibandingkan dengan rata – rata ekspresi IL – 17 jaringan pada kelompok KN (16,9993 \pm 17,34756%). Dari segi derajat fibrosis, kelompok KP memiliki modus derajat F3 sedangkan kelompok KN memiliki modus derajat F0. Grafik perbandingan kelompok dapat dilihat pada gambar 5.11.

Pada kelompok perlakuan (gambar 5.12), dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara rata – rata ekspresi IL – 17 jaringan pada kelompok Kontrol Positif ($30,7028 \pm 17,34756\%$) dengan KP2 ($17,6803 \pm 0,57630\%$) dan KP5 ($18,2090 \pm 8,71423\%$). Signifikansi masing – masing perbandingan kelompok adalah 0,033 ($p > 0,05$) dan 0,04 ($p > 0,05$). Sedangkan, pada kelompok KP9 ($22,0995 \pm 6,69127\%$) tidak didapatkan perbedaan yang signifikan apabila dibandingkan dengan kelompok Kontrol Positif. Ditinjau dari derajat fibrosisnya, kelompok perlakuan mengalami penurunan derajat fibrosis seiring bertambah lamanya pemberian kurkumin. Hal ini bisa dilihat dari hasil penelitian, dimana kelompok Kontrol Positif memiliki derajat fibrosis F3, lalu KP2 dan KP5 memiliki derajat fibrosis F2, dan KP9 memiliki derajat fibrosis F1. Jika dilihat dari kedua sisi, maka terdapat penurunan ekspresi IL – 17 jaringan dan derajat fibrosis antara kelompok Kontrol Positif dengan KP2, lalu terdapat kenaikan sedikit ekspresi IL – 17 jaringan dan derajat fibrosis yang stagnan antara KP2 dan KP5, dan terdapat kenaikan ekspresi IL – 17 jaringan dan penurunan derajat fibrosis antara KP5 dan KP9. Hal ini membuktikan bahwa kurkumin terbukti efektif menurunkan derajat fibrosis, namun hanya efektif menurunkan ekspresi IL – 17 jaringan pada minggu kedua dan kelima saja.

Efek kurkumin dalam menurunkan ekspresi IL – 17 dan derajat fibrosis dengan berbagai cara. Kurkumin dapat bertindak sebagai antioksidan yang mampu menangkap ion superoksida dan memutus rantai antar ion superoksida (O_2^-) sehingga mencegah kerusakan sel hepar karena peroksidasi lipid dengan cara dimediasi oleh enzim antioksidan yaitu *superoxide dismutase* (SOD) dimana enzim SOD akan mengkonversi O_2^- menjadi produk yang kurang toksik. Kurkumin juga mampu meningkatkan *gluthation S – transferase* (GST) dan mampu

menghambat beberapa faktor proinflamasi seperti *nuclear factor – kb* (NF – kb) dan profibrotik sitokin. Aktivitas penghambatan pembentukan NF – kb merupakan faktor transkripsi sejumlah gen penting dalam proses imunitas dan inflamasi, salah satunya untuk membentuk TNF – α . Dengan menekan kerja NF – kb maka radikal bebas dari hasil sampingan inflamasi berkurang (Simanjuntak, 2012). Selain sebagai antioksidan, kurkumin juga dapat bertindak sebagai anti – fibrosis. Mekanisme kurkumin sebagai anti – fibrosis adalah dengan menginduksi ekspresi PPAR γ (*Peroxisome Proliferator – Activated Receptor*) pada *activated* HSC. Pada proses fibrogenesis, *quiescent* HSC akan meningkatkan ekspresi reseptor untuk PDGF dan EGF dan menurunkan ekspresi dari PPAR γ . Hal ini akan membuat *quiescent* HSC menjadi *activated* HSC. Dengan menginduksi PPAR γ , maka *activated* HSC akan apoptosis sehingga menghambat akumulasi matriks yang terjadi selama proses fibrogenesis (Zhou *et al.*, 2007). Selain itu, Kurkumin juga dapat menghambat jalur aktivasi *Janus Kinase – Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK-STAT) yang distimulasi oleh IL – 12 yang dihasilkan oleh sel dendritik atau makrofag. Dengan penghambatan tersebut, maka akan berefek pada tidak terjadinya proliferasi dan diferensiasi sel *T-Helper 1* (Th1), tidak terproduksinya *IFN- γ* , dan salah satunya adalah IL – 17 yang dihasilkan oleh Th17. Tentunya hal tersebut akan menyebabkan menurunnya produksi IL – 17 yang dihasilkan oleh Th17 (Aggarwal *et al.*, 2007).

Pada kelompok kontrol (gambar 5.13), dapat dilihat bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara rata – rata ekspresi IL – 17 jaringan pada kelompok Kontrol Positif ($30,7028 \pm 17,34756\%$) dengan kelompok kontrol minggu manapun. Perbedaan yang signifikan didapatkan pada perbandingan KK2 ($36,5638 \pm 2,56923\%$) dan KK9 ($19,9348 \pm 7,52283\%$) dengan signifikansi 0,008

($p > 0,05$). Sedangkan KK5 ($30,4590 \pm 6,14992\%$) tidak memiliki perbedaan yang signifikan ketika dibandingkan dengan kelompok kontrol yang lain. Ditinjau dari derajat fibrosisnya, kelompok kontrol mengalami derajat fibrosis yang fluktuatif seiring bertambah lamanya pemberian plasebo. Hal ini bisa dilihat dari hasil penelitian, dimana kelompok Kontrol Positif memiliki derajat fibrosis F3, lalu KP2 memiliki derajat fibrosis F2, lalu KP5 memiliki derajat fibrosis F3, dan KP9 memiliki derajat fibrosis F1. Jika dilihat dari kedua sisi, maka terdapat peningkatan ekspresi IL – 17 jaringan dan penurunan derajat fibrosis antara kelompok Kontrol Positif dengan KK2, lalu terdapat penurunan ekspresi IL – 17 jaringan dan peningkatan derajat fibrosis yang stagnan antara KK2 dan KK5, dan terdapat penurunan ekspresi IL – 17 jaringan dan penurunan derajat fibrosis antara KK5 dan KK9. Ini membuktikan bahwa tanpa pemberian kurkumin, derajat fibrosis dan ekspresi IL – 17 jaringan dapat menurun dengan sendirinya.

Menurunnya ekspresi IL – 17 jaringan dan derajat fibrosis pada kelompok kontrol merupakan mekanisme resolusi spontan fibrosis yang dilakukan oleh hati apabila zat yang membuat hati mengalami fibrosis dihilangkan. Ketika jejas yang membuat hati mengalami fibrosis dihilangkan, maka proses fibrogenesis akan terhambat dan hati akan melakukan resolusi pada jaringannya. Hal ini dapat terjadi dikarenakan HSC yang awalnya aktif menjadi apoptosis dan HSC yang apoptosis akan mencegah HSC yang aktif untuk melanjutkan proses fibrogenesis (Henderson dan Iredale, 2007). Selain apoptosis HSC, pada resolusi spontan juga terjadi penurunan *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* (TIMPs) yang dihasilkan oleh *myofibroblast* dan menyebabkan peningkatan *Matrix Metalloproteinases* (MMPs) yang dihasilkan oleh makrofag. Hal ini menyebabkan terjadinya degradasi matriks pada akumulasi matriks ekstraseluler pada hati yang jejas (Pellicoro *et al.*,

2014). Faktor penyebab fibrosis yang hilang juga jejas yang terjadi tidak berlanjut kembali sehingga mekanisme pengaktifan IL – 17 tidak lagi berlangsung. Oleh karenanya, terjadilah penurunan ekspresi IL – 17 jaringan dan juga derajat fibrosis.

Hasil perbandingan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol (gambar 5.14) membuktikan bahwa kurkumin lebih efektif dalam menurunkan ekspresi IL – 17 dan derajat fibrosis pada minggu ke 2 dan minggu ke 5. Hal ini dikarenakan terdapat perbedaan ekspresi IL – 17 jaringan yang signifikan antara KP2 dengan KK2 ($p=0,003$) dan KP5 dengan KK5 ($p=0,044$) dimana ekspresi IL – 17 didapatkan lebih rendah pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Dari segi derajat fibrosis juga didapatkan bahwa kelompok perlakuan memiliki derajat fibrosis yang lebih rendah daripada kelompok kontrol. Namun, pada pemberian kurkumin minggu ke 9 didapatkan ekspresi IL – 17 jaringan yang lebih tinggi pada kelompok perlakuan daripada kelompok kontrol walaupun keduanya memiliki derajat fibrosis yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa kurkumin tidak efektif dalam menurunkan ekspresi IL – 17 jaringan pada minggu ke 9 namun efektif dalam menurunkan derajat fibrosis.

Pemberian kelompok yang diberikan kurkumin menghasilkan ekspresi IL – 17 jaringan dan derajat fibrosis yang lebih baik apabila dibandingkan dengan kelompok Kontrol Positif dan kelompok yang diberikan plasebo. Hal ini dikarenakan efek kurkumin yang berkerja pada hati yang mengalami fibrosis disertai juga dengan mekanisme resolusi spontan yang dilakukan oleh jaringan hati itu sendiri. Sehingga, menghasilkan ekspresi IL – 17 jaringan dan derajat fibrosis yang lebih rendah dibandingkan kelompok lainnya. Namun, hal ini hanya berlaku pada minggu ke 2 dan minggu ke 5 saja.

Peningkatan ekspresi IL – 17 jaringan yang meningkat pada minggu ke 9 kemungkinan bisa disebabkan karena toksisitas kurkumin. Selain bertindak sebagai anti - oksidan, kurkumin juga bisa bertindak sebagai pro-oksidan dikarenakan salah satu struktur kimia kurkumin adalah 2 α,β *unsaturated ketones* yang dapat berikatan secara kovalen dengan struktur kimia grup –thiol, sehingga menyebabkan terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Burgos-Moron *et al.*, 2010). Penyebab inilah yang diduga meningkatkan ekspresi IL – 17 jaringan pada kelompok perlakuan minggu ke 9. Adanya ROS tentunya akan menyebabkan terjadinya jejas pada jaringan hati sehingga IL – 17 meningkat guna memperbaiki jejas pada hati sehingga membuat derajat fibrosis pada saat minggu ke 9 menjadi F1. Namun, IL – 17 yang meningkat ini bukan berasal dari sel Th17, melainkan dihasilkan oleh *gamma delta T cell* ($\gamma\delta$ T-Cell). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa $\gamma\delta$ T-Cell dapat bersifat sebagai hepatoprotektif dengan mensekresikan IL – 17 yang dapat menghambat sel *Natural Killer T* (NKT) yang hadir selama proses fibrogenesis. Namun, penelitian ini masih perlu diteliti lebih lanjut (Hammerich dan Tacke, 2014)

Hasil perbandingan ekspresi IL – 17 jaringan jika dibagi berdasarkan derajat fibrosisnya (gambar 5.11) akan terlihat bahwa pada F0 rata – rata ekspresi IL – 17 jaringannya sebesar 16,275%, pada F1 sebesar 19,3033%, pada F2 sebesar 29,233%, dan pada F3 sebesar 29,55571%. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi derajat fibrosisnya maka semakin tinggi juga ekspresi IL – 17 jaringan. Berdasarkan uji analisis dengan metode *One Way Anova*, didapatkan angka signifikansi sebesar 0,009 ($p < 0.05$). Setelah dilakukan uji *Post – Hoc*, didapatkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok F0 dengan kelompok F2 ($p = 0,007$), kelompok F0 dengan kelompok F3 ($p = 0,01$),

kelompok F1 dengan kelompok F2 ($p=0,019$), dan Kelompok F1 dengan kelompok F3 ($p=0,026$). Lalu, dilakukan uji korelasi untuk mengetahui hubungan antara ekspresi IL – 17 jaringan terhadap derajat fibrosis pada tikus yang diinduksi CCl_4 dan diberikan kurkumin. Hasil dari uji korelasi menunjukkan signifikansi sebesar 0,039 antara ekspresi IL – 17 jaringan terhadap derajat fibrosis. Nilai koefisien korelasi yang dapat dihitung adalah sebesar 0,367 ($>0,25 - 0,5$) dan positif. Nilai ini menunjukkan bahwa korelasi antara kedua variabel adalah korelasi yang cukup dan searah, yaitu semakin rendah ekspresi IL – 17 jaringan maka semakin baik derajat fibrosis hati.

Hasil uji regresi linier juga menunjukkan bahwa semakin tinggi ekspresi IL – 17 jaringannya, maka semakin buruk juga derajat fibrosisnya. Dari uji tersebut juga didapatkan persamaan sebagai berikut:

$$y = 3,79x + 18,16 \text{ atau Ekspresi IL – 17 jaringan} = 3,79 (\text{Derajat Fibrosis}) + 18,16$$

Dari persamaan itu, maka derajat fibrosis pada hati bisa digunakan sebagai prediksi dalam menentukan jumlah ekspresi IL – 17 jaringan pada hati yang mengalami fibrosis. Jika data dari penelitian ini dimasukkan ke dalam persamaan tersebut, maka akan didapatkan hasil yang bisa dilihat pada tabel 6.1

Tabel 6.1 Hasil persamaan dari uji regresi linier

Derajat Fibrosis	Ekspresi IL – 17 Jaringan Hati
0	18,16%
1	21,95%
2	25,74%
3	29,53%

Secara keseluruhan, hubungan antara ekspresi IL – 17 jaringan terhadap derajat fibrosis menunjukkan hasil yang signifikan, kuat, dan searah. Tetapi, terdapat hasil yang tidak sesuai dengan uji korelasi yang sudah dilakukan pada kelompok perlakuan minggu ke 9. Hal ini diduga akibat adanya faktor – faktor yang sudah diuraikan sebelumnya diatas. Keterbatasan pengecatan imunohistokimia yang dilakukan dan pembacaan interpretasi hasil diduga juga menjadi faktor terhadap data tersebut. Oleh karenanya, secara keseluruhan maka hipotesis adanya hubungan antara ekspresi IL – 17 jaringan hati dengan derajat perbaikan fibrosis pada tikus model fibrosis yang diberi kurkumin dinyatakan terbukti.

6.2 Keterbatasan Penelitian

Dalam penelitian ini dibutuhkan waktu perawatan dan pengerjaan sampel yang cukup lama. Selain itu, proses pengecatan H&E yang dirasa masih kurang spesifik dalam menentukan derajat fibrosis. Begitu juga dengan pengecatan imunohistokimia yang memiliki banyak faktor yang memengaruhi hasil walaupun sudah dilakukan sesuai dengan protokol yang ada.