

**HUBUNGAN EKSPRESI IL-17 PADA LIMFOSIT JARINGAN HATI
DENGAN DERAJAT FIBROSIS HATI TIKUS WISTAR JANTAN
(*RATTUS NORVEGICUS*) YANG DIPAPAR DENGAN KARBON
TETRAKLORIDA (CCL₄)**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



Oleh :

LIDYA DIANTIKA

115070100111064

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2014

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

HUBUNGAN EKSPRESI IL-17 PADA LIMFOSIT JARINGAN HATI DENGAN DERAJAT FIBROSIS HATI TIKUS WISTAR JANTAN (*RATTUS NORVEGICUS*) YANG DIPAPAR DENGAN KARBON TETRAKLORIDA (CCL4)

Oleh :

Lidya Diantika

NIM : 115070100111064

Telah diuji pada :

Hari : Senin

Tanggal : 8 Desember 2014

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

dr. Imam Sarwono, Sp. PA
NIP. 19521111 198002 1 001

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III/Pembimbing II

dr. Supriono, Sp.PD-KGEH
NIP. 19660517 199803 1 004

Dr. dr. Nurdiana, M.Kes
NIP. 19551015 198603 2 001

Mengetahui,
Ketua Program Studi

Prof.Dr.dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H., M.Sc., Sp.Par.K
NIP. 19520410 198002 1 001

ABSTRAK

Diantika, Lidya. 2014. **Hubungan Ekspresi IL-17 Pada Limfosit Jaringan Hati Dengan Derajat Fibrosis Hati Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*) Yang Dipapar Dengan Karbon Tetraklorida (CCl₄). Tugas Akhir**, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) dr.Supriono,Sp.PD-KGEH. (2) Dr. dr. Nurdiana, M. Kes.

Fibrosis hati merupakan masalah kesehatan yang banyak menimbulkan dampak kematian. Sebagian besar kematian disebabkan oleh stadium akhir dari fibrosis itu. Hal ini disebabkan karena fibrosis hati merupakan keadaan yang jarang disadari karena tidak menimbulkan gejala dalam kurun waktu lama. Padahal, fibrosis hati merupakan keadaan yang *reversible* dan masih bisa diobati. Oleh karena itu, *screening* dan penentuan derajat fibrosis sangat diperlukan untuk mencegah perkembangan fibrosis hati. Di lain sisi, IL-17, yang disekresikan oleh sel Th-17, pada keadaan inflamasi kronis diprediksi berkontribusi terhadap proses fibrosis hati.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara ekspresi IL-17 pada limfosit jaringan hati dengan derajat fibrosis hati pada tikus yang diinduksi karbon tetraklorida (CCl₄) dosis 1 mL/kgBB dengan lama paparan 2 minggu, 5 minggu, dan 9 minggu, untuk mendapat derajat fibrosis yang berbeda. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode *Randomized Post Test Only Control Group*. Hewan coba dibagi menjadi empat kelompok perlakuan, dengan derajat fibrosis yang berbeda yaitu fibrosis derajat 0, derajat 1, derajat 2, dan derajat 3. Diakhir perlakuan, ekspresi IL-17 pada limfosit jaringan dan derajat fibrosis hati dibandingkan. Dari hasil penelitian didapatkan rata-rata ekspresi IL-17 pada limfosit jaringan hati senilai 0,34 pada kelompok kontrol, 0,69 pada kelompok fibrosis derajat 1, 2,77 pada kelompok fibrosis derajat 2, dan 4,98 pada kelompok fibrosis derajat 3. Sehingga didapat kesimpulan, terdapat hubungan korelasi positif antara ekspresi IL-17 pada limfosit jaringan hati dengan derajat fibrosis hati dengan $p=0,083$.

Kata Kunci : Fibrosis hati, Interleukin-17, Karbon Tetraklorida (CCl₄)

ABSTRACT

Diantika, Lidya. 2014. **Correlation Of Expression Interleukin-17 (IL-17) In Liver Tissue Lymphocytes Associated With The Stages Of Hepatic Fibrosis in Male Rats (*Rattus norvegicus*) Induced By Carbon Tetrachloride (CCl₄)**. Final Assigment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr.Supriono,Sp.PD-KGEH. (2) Dr. dr. Nurdiana, M. Kes.

Liver fibrosis is one of the health problem which has a big number of events leading to death. Most of the death incidents are caused by the end stage of the liver fibrosis. This phenomenon is because of the fact that liver fibrosis is usually asymptomatic. However, liver fibrosis is a reversible and curable condition. Because of that, screening and determination of the fibrosis stage is needed to prevent the development of fibrosis. On the other side, IL-17, secreted by Th-17 cell, in a recurrent exposure of injury predicted to contribute to the fibrosis process.

This research aim to know the correlation between IL-17 liver tissue lymphocytes expression with the stages of liver fibrosis in rats induced by carbon tetrachloride(CCl₄) 1mL/kgBB with different exposure terms (2 weeks, 5 weeks, and 9 weeks), to get diferrent stages of liver fibrosis . This is an experimental research with *Randomized Post Test Only Control Group* method. The experimental rats divided into 4 groups differ by the fibrosis stage, which are, fibrosis stage 0, stage 1, stage 2, and stage 3. At the the end of the research, the expression of IL-17 in liver tissue lymphocytes is compared to the stages of liver fibrosis. The result from this research is that there is an increase in IL-17 expression as, 0,34 in control group, 0,69 fibrosis stage 1 group, 2,77 in fibrosis stage 2 group, and 4,98 in fibrosis stage 3 group. It is concluded, that there is a positive correlation between the expression of IL-17 in liver tissue and the stages of liver fibrosis with $p = 0,083$.

Keywords : Liver fibrosis, Interleukin-17, Carbon Tetrachloride (CCl₄)

DAFTAR ISI

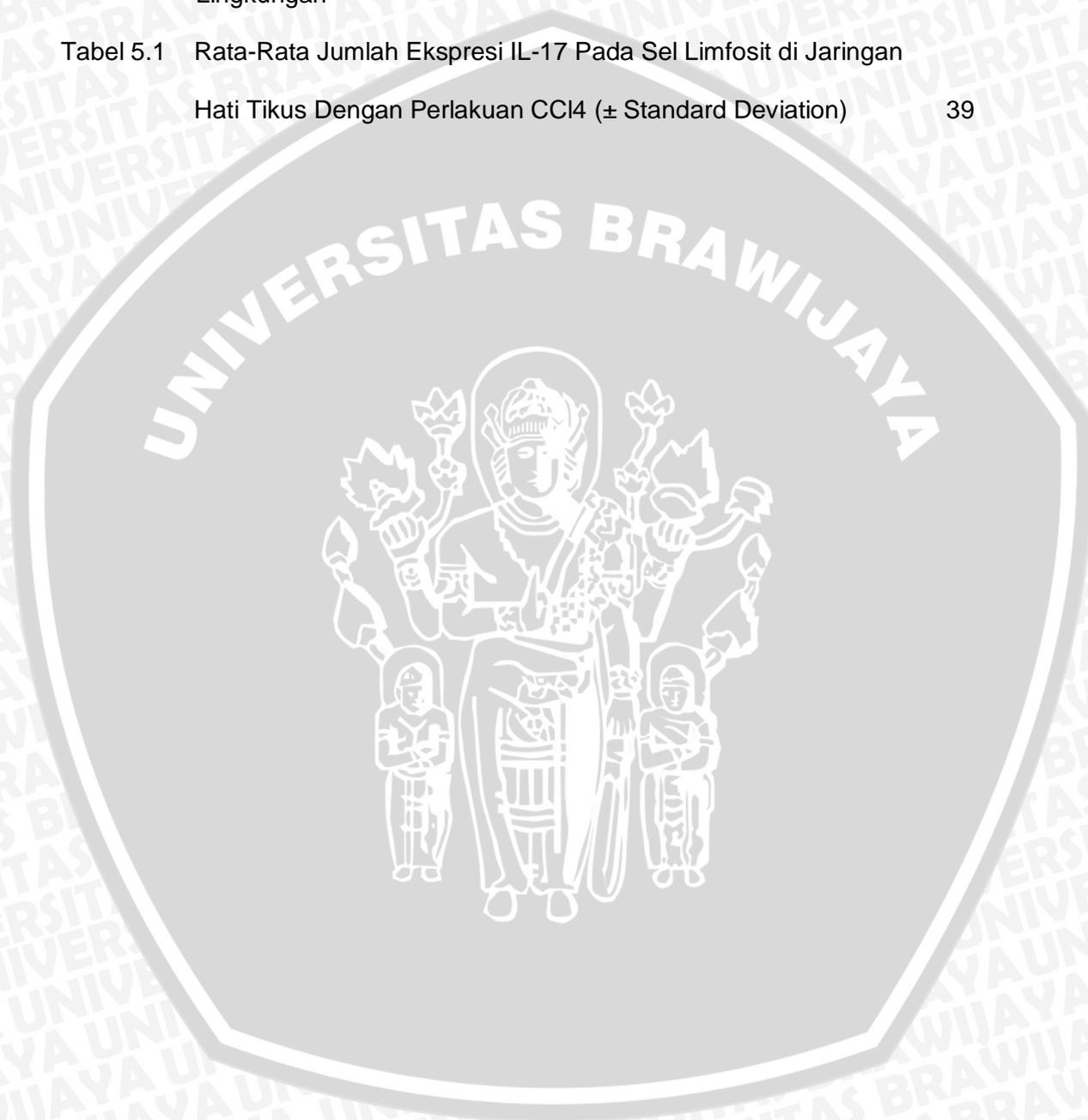
	Halaman
Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	v
Abstract	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Tabel	ix
Daftar Gambar	x
Daftar Lampiran	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.4.1 Manfaat Akademik	3
1.4.2 Manfaat Praktis	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Fibrosis Hati	5
2.1.1 Pengertian Fibrosis Hati	5
2.1.2 Etiologi Fibrosis Hati	6
2.1.3 Molekular Patogenesis dari Fibrosis Hati	8
2.1.4 Penentuan Derajat Fibrosis Hati	9
2.2 Interleukin 17	13
2.2.1 Tinjauan Umum Interleukin 17 (IL-17)	13
2.2.2 Hubungan IL-17 dan Fibrosis Hati	15
2.3 Karbon Tetraklorida	16
2.3.1 Toksisitas Pada Manusia	16
2.3.2 Toksisitas Pada Hewan Coba	17
2.3.3 Hepatotoksisitas	18
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	19
3.2 Hipotesis Penelitian	21
BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1 Rancangan Penelitian	22
4.2 Populasi dan Sampel	24
4.2.1. Populasi	24
4.2.2. Sampel	24
4.2.3. Kriteria Sampel	25
4.2.3.1. Kriteria Inklusi	25



	4.2.3.2.	Kriteria Eksklusi.....	26
	4.2.3.3.	Kriteria <i>Drop Out</i>	26
4.3		Variabel Penelitian.....	26
	4.3.1	Variabel Bebas (Independent).....	26
	4.3.2	Variabel Tergantung (Dependent).....	26
	4.3.3	Variabel Kontrol.....	26
4.4		Waktu dan Tempat Penelitian.....	27
4.5		Alat dan Bahan Penelitian.....	27
4.6		Definisi Operasional.....	28
4.7		Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data.....	29
	4.7.1	Pengelolaan dan Pemeliharaan Tikus Putih.....	29
	4.7.2	Pembuatan dan Pemberian Larutan CCl ₄	30
	4.7.3	Pembedahan dan Pengambilan Sampel.....	31
	4.7.4	Pengukuran Ekspresi IL-17 Pada Limfosit Jaringan Hati.....	31
	4.7.5	Pengukuran Histopatologi Fibrosis Hati.....	33
4.8		Bagan Alur Penelitian.....	34
4.9		Uji Analisis Data.....	35
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA			
5.1		Hasil Penelitian.....	36
	5.1.1	Hasil Derajat Fibrosis Hati.....	36
	5.1.2	Hasil Ekspresi Sitokin IL-17.....	37
5.2		Analisa Data.....	39
	5.2.1	Uji Normalitas Data.....	39
	5.2.2	Uji Homogenitas Varian.....	40
	5.2.3	Uji One Way ANOVA.....	40
	5.2.4	Uji <i>Post Hoc Multiple Comparison</i>	40
	5.2.5	Uji Korelasi.....	41
BAB VI PEMBAHASAN.....			42
BAB VII PENUTUP			
	7.1	Kesimpulan.....	46
	7.2	Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA.....			47
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....			50
LAMPIRAN.....			51

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Penyebab Fibrosis Hati Dipengaruhi Oleh Faktor Genetic Dan Lingkungan	8
Tabel 5.1	Rata-Rata Jumlah Ekspresi IL-17 Pada Sel Limfosit di Jaringan Hati Tikus Dengan Perlakuan CCl ₄ (\pm Standard Deviation)	39



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Ilustrasi Patogenesis Fibrosis Hati	9
Gambar 2.2. Gambaran Jaringan Hati Normal (Fibrosis Derajat 0)	11
Gambar 2.3 Ilustrasi Gambaran Fibrosis Hati Pada Berbagai Derajat	12
Gambar 2.4 Jalur Diferensiasi Sel T	14
Gambar 2.5 Jalur Efek dari Interleukin 17 Terhadap Sel-Sel di Hati	16
Gambar 5.1 Kontrol Fibrosis Derajat 0	37
Gambar 5.2 Fibrosis Derajat I	37
Gambar 5.3 Fibrosis Derajat II	37
Gambar 5.4 Fibrosis Derajat III	37
Gambar 5.5 Ekspresi Sitokin IL-17 Pada Sitoplasma Sel Limfosit di Jaringan Hati	38

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hati merupakan organ parenkim terbesar dan merupakan organ yang sangat penting dalam mempertahankan metabolisme dan fungsi tubuh. Fungsi hati meliputi metabolisme energi dan substrat interkonversi, sintesis protein, solubilisasi, transport, dan penyimpanan. Selain fungsi homeostasis, hati memiliki peran utama dalam proteksi terhadap zat asing, karena peranannya dalam detoksifikasi serta ekskresi produk sisa metabolik dan xenobiotik ke saluran empedu. Hal ini menyebabkan hati menjadi organ yang sangat rentan mengalami kerusakan oleh adanya gangguan metabolik, toksik, mikroba dan sirkulasi (Hariyanto, 2013). Kerusakan hati yang terjadi dapat meliputi kerusakan struktur maupun gangguan fungsi hati.

Fibrosis hati merupakan salah satu masalah kesehatan di dunia yang banyak menimbulkan dampak kematian. Kematian ini sebagian besar disebabkan oleh stadium akhir dari fibrosis yaitu sirosis hati dan kanker hati (Naveau *et al*, 2009). Hal ini disebabkan fibrosis hati merupakan keadaan yang masih jarang disadari karena tidak menimbulkan gejala dalam kurun waktu lama. Padahal, fibrosis hati itu sendiri merupakan keadaan yang *reversible* dan masih bisa diobati. Oleh karena itu, *screening* dan penentuan derajat fibrosis sangat diperlukan untuk mencegah perkembangan fibrosis hati menjadi sirosis hati atau kanker hati.

Patogenesis fibrosis hati merupakan proses yang sangat kompleks yang melibatkan *Hepatic Stellate Cell* (HSC), sel Kupffer, leukosit, mediator, sitokin, *growth factors*, *inhibitor*, serta berbagai jenis kolagen. Sel Kupffer dan *Hepatic Stellate Cell* berperan penting dalam proses fibrogenesis hati. Aktivasi dari sel Kupffer yang terjadi pada proses fibrosis hati ini akan melepaskan beberapa mediator pro inflamasi, antara lain : TNF- α , TGF- β , IL-6. Selain itu, proses lain yang merupakan proses utama pada terjadinya fibrosis hati adalah proses *Hepatic Stellate Cells* yang teraktivasi menjadi fenotip miofibrogenik fibroblast, yang akan meningkatkan matriks ekstraseluler dan akan tertimbun di ruang Disse (Meng *et al*, 2012).

IL-17 adalah sitokin yang disekresi oleh sel T-helper, yang mulai mendapat perhatian sejak penemuannya di tahun 2005 sebagai subset baru dari T-helper. Sejak saat itu, IL-17 mulai banyak dievaluasi perannya dalam imunofisiologi. IL-17 tercatat terlibat dalam proses imun terutama dalam memicu dan memediasi respon pro inflamasi (Hammerich *et al*, 2011). Pada penelitian-penelitian terdahulu, ditemukan adanya peranan sel Th-17 dalam proses inflamasi. Selain itu, ditemukan pula adanya kontribusi IL-17 dalam inflamasi hati, dimana didapatkan ekspresi IL-17 yang meningkat pada pasien hepatitis B kronis. Infiltrasi IL-17 di hati juga didapatkan pada pasien hepatitis C yang sedang berkembang menuju fibrosis hati (Meng *et al*, 2012). Hal ini menunjukkan bahwa IL-17 mungkin mempunyai kontribusi pada patogenesis dan progresi kerusakan hati (Du *et al*, 2013).

Dengan adanya studi-studi terdahulu yang menunjukkan adanya peningkatan ekspresi IL-17 pada keadaan inflamasi hati, penelitian ini ingin mengetahui apakah terdapat hubungan ekspresi IL-17 pada limfosit jaringan hati

dengan derajat fibrosis hati, yang pada penelitian ini diinduksi oleh paparan non virus, yaitu zat poten hepatotoksik karbon tetraklorida (CCl₄).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ada hubungan positif antara ekspresi Interleukin-17 pada limfosit jaringan hati dengan derajat fibrosis hati tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang dipapar dengan karbon tetraklorida (CCl₄)?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui hubungan antara ekspresi Interleukin-17 pada limfosit jaringan hati dengan derajat fibrosis hati tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang dipapar dengan karbon tetraklorida (CCl₄).

1.3.2 Tujuan Khusus

Untuk mengetahui apakah ekspresi Interleukin-17 pada limfosit jaringan hati dapat menggambarkan derajat fibrosis hati tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang dipapar dengan karbon tetraklorida (CCl₄).

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

1. Memberikan informasi mengenai hubungan ekspresi Interleukin-17 pada limfosit jaringan hati dengan derajat fibrosis hati pada tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang dipapar dengan karbon tetraklorida (CCl₄)

2. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai pedoman atau gambaran awal untuk melakukan penelitian lebih lanjut terhadap peran Interleukin-17 pada proses fibrosis hati.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Membantu para praktisi kesehatan untuk memprediksi derajat fibrosis hati dengan mengukur ekspresi Interleukin-17 pada jaringan hati.



BAB 2**TINJAUAN PUSTAKA****2.1 Fibrosis Hati****2.1.1 Pengertian Fibrosis Hati**

Fibrosis hati merupakan akumulasi berlebih protein matriks ekstraseluler termasuk kolagen, yang terjadi pada kebanyakan penyakit hati kronis. Aktivasi sel stellata hati merupakan hal utama yang terjadi pada fibrosis hati (Anom dan Wibawa, 2010). Pada keadaan injuri hati, HSC menjadi aktif dan berubah seperti fenotip myofibroblast, yang berkontraksi, berproliferasi, dan bersifat fibrogenik. Pada keadaan ini, kolagen dan matriks ekstraselular lainnya terbentuk secara berlebih dan akan mengakibatkan terjadinya jaringan sikatrik pada parenkim hati. Fibrosis hati ini merupakan hal yang dinamik dan reversibel, yang merupakan hasil keseimbangan dari fibrogenesis dan kerusakan dari degradasi matriks yang dihasilkan tadi (Ismail, 2011).

2.1.2 Etiologi Fibrosis Hati

Hampir seluruh penyakit kronis pada hati mempunyai gambaran fibrosis hati dengan gambaran karakteristik berupa rusaknya parenkim hati dan terjadinya inflamasi (Mormone *et al*, 2011). Namun sayangnya, onset fibrosis hati biasanya tidak terdeteksi dan mortalitas biasanya terjadi setelah proses sirosis hati. Pada kebanyakan pasien, progresi menjadi sirosis terjadi setelah interval 15-20 tahun, namun fibrosis hati berkembang cepat pada beberapa keadaan klinis, seperti episode berulang hepatitis alkoholik akut berat, hepatitis subfulminan dan kolestasis fibrosis pada pasien dengan reinfeksi hepatitis virus

C (HCV) (Anom dan Wibawa, 2010). Fibrosis merupakan suatu hasil dari faktor-faktor patogen dan keterpaparan yang lama terhadap zat yang toksik pada hati seperti konsumsi alkohol dalam waktu lama, kolestasis, penyakit autoimun pada hati, kelebihan zat besi ataupun tembaga, virus hepatitis kronis, adanya penyakit non-alcoholic fatty liver (NAFLD) (Baranova *et al*, 2011), serta dipengaruhi oleh factor genetik. Berikut adalah penyebab utama terjadinya fibrosis hati dan penjelasannya.

1. Alkohol

Konsumsi alkohol adalah faktor pencetus terjadinya penyakit hati paling banyak didunia. Alkohol dapat menyebabkan terjadinya *fatty liver*, *alcoholic hepatitis*, fibrosis atau sirosis, dan hepatoseluler karsinoma (Mormone *et al*, 2011). Proses dari pemecahan ethanol menghasilkan dua agen faktor fibrosis, yaitu asetaldehid dan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Asetaldehid merupakan hasil metabolisme dari alkohol yang dapat meningkatkan sekresi dari *transforming growth factor-β1* (TGF-β1) dan menginduksi ekspresi dari reseptor TGF-β tipe II pada *hepatic stellate cell* (HSC), yang merupakan kunci dari produksi kolagen pada hati. Sedangkan keterpaparan hepatosit pada ROS yang dihasilkan oleh metabolisme alkohol membuat HSC sensitif terhadap berbagai faktor-faktor pro inflamasi dan dapat memicu produksi dari mediator inflamasi yang berkontribusi terhadap proses fibrosis hati (Baranova *et al*, 2011).

2. Hepatitis virus kronik

Infeksi virus kronis seperti virus hepatitis B dan virus hepatitis C dapat memicu terjadinya fibrosis hati. Patogenesis terjadinya fibrosis pada infeksi virus kronis ini merupakan multifaktorial, seperti gabungan

pengaruh dari virus yang menginfeksi, faktor host-spesifik, stress oksidatif, meningkatnya penumpukan besi, dan meningkatnya laju apoptosis dari sel hepatosit, yang keseluruhannya dapat diakibatkan oleh pengaruh dari protein dan replikasi dari virus yang menginfeksi (Baranova *et al*, 2011).

3. Penyakit autoimun pada hati

Fibrosis hati pada keadaan autoimun disebabkan oleh adanya leukosit antigen kelas II pada hepatosit yang menyebabkan *cell-mediated immune response* terhadap hati dari *host* dan menimbulkan fibrosis hati (Mormone *et al*, 2011).

4. Kelainan metabolik seperti hemakromatosis dan Wilson's disease

Pada hemakromatosis hereditas, penyerapan dan akumulasi yang berlebihan dari besi pada jaringan dan organ, termasuk hati, berhubungan dengan mutasi dari HFE (*high-iron gen*). Sedangkan pada Wilson's disease, atau biasa disebut degenerasi hepatolentikular, adalah kelainan genetik yang mengarah pada akumulasi tembaga (*copper*) pada hati dan menyebabkan mutasi pada APTase (ATP7B) yang bertugas membawa tembaga (Mormone *et al*, 2011).

5. Cholestasis

Pada cholestasis, tersumbatnya saluran empedu dapat menyebabkan portal fibrosis kronis (Baranova *et al*, 2011).

Faktor-faktor pencetus ini bisa menyebabkan fibrosis secara tunggal ataupun kombinasi dengan faktor lainnya serta dipengaruhi faktor genetik, yang dapat menimbulkan efek kumulatif.

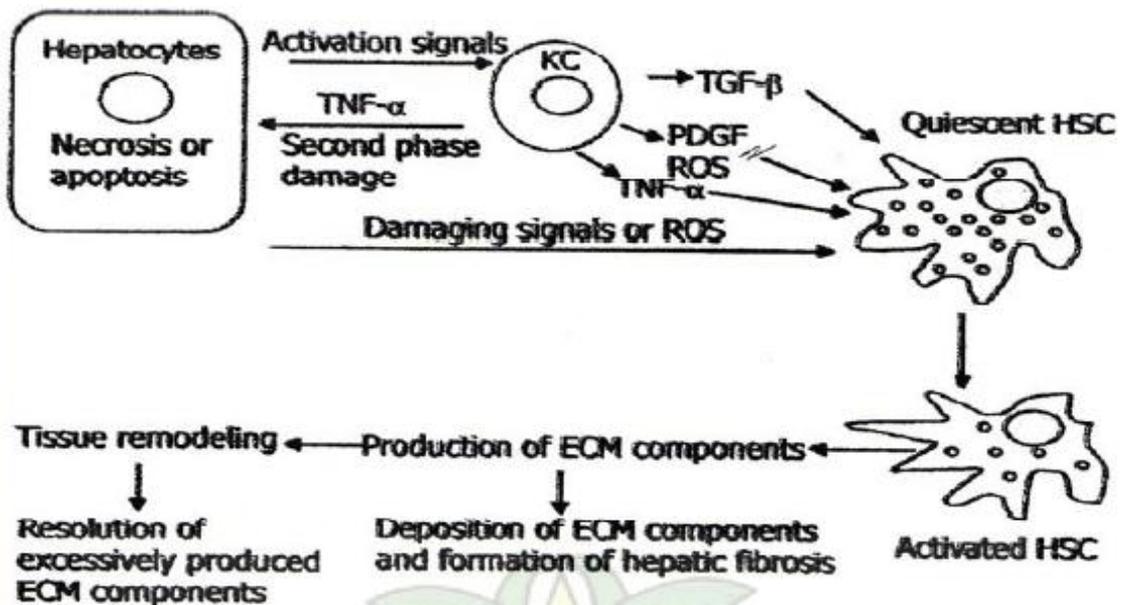
Tabel 2.1 Penyebab fibrosis hati dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan (Anom dan Wibawa, 2010)

Jenis penyakit hati	Candidate genes	Candidate genes (full name)	Faktor nongenetik
Infeksi virus hepatitis C	<i>HFE</i>	Hereditary hemochromatosis gene	Konsumsi alkohol Koinfeksi HIV dan/atau virus hepatitis B Usia saat terjadi infeksi akut Transplantasi hati Diabetes mellitus Tidak berespon terhadap terapi
	Angiotensinogen	Angiotensinogen	
Diinduksi alkohol	<i>TGF-β1</i>	Transforming growth factor β1	Konsumsi alkohol Episode hepatitis alkoholik
	<i>TNF-α</i>	Tumor necrosis factor α	
	<i>ApoE</i>	Apolipoprotein E	
	<i>MEH</i>	Microsomal epoxide hydroxylase	
	<i>MCP-1</i>	Monocyte chemoattractant protein type 1	
	<i>MCP-2</i>	Monocyte chemoattractant protein type 2	
	<i>Factor V</i>	Factor V (Leiden)	
	<i>IL-10</i>	Interleukin 10	
	<i>IL-1β</i>	Interleukin 1 β	
	<i>ADH</i>	Alcohol dehydrogenase	
	<i>ALDH</i>	Aldehyde dehydrogenase	
<i>NASH</i>	<i>CYP2E1</i>	cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	Usia Beratnya obesitas Diabetes mellitus Hipertrigleserida
	<i>TNF-α</i>	Tumor necrosis factor α	
	<i>CTLA-4</i>	Cytotoxic T lymphocyte antigen type 4	
	<i>TAP2</i>	Transporter-associated antigen-processing type 2	
	<i>MnSOD</i>	Manganese superoxide dismutase	
	<i>HFE</i>	Hereditary hemochromatosis gene	
	<i>Angiotensinogen</i>	Angiotensinogen	
Sirosis bilier primer	<i>TGF-β1</i>	Transforming growth factor β1	Hepatitis autoimun tipe II Tidak berespon terhadap terapi
	<i>IL-1β</i>	Interleukin 1β	
	<i>TNF-α</i>	Tumor necrosis factor α	
Hepatitis autoimun	<i>ApoE</i>	Apolipoprotein E	Hepatitis autoimun tipe II Tidak berespon terhadap terapi
	<i>HLA-II</i>	Human leukocyte antigen type II haplotypes	

2.1.3 Molekular Patogenesis dari Fibrosis Hati

Pada keadaan fibrosis hati, prosesnya terjadi dalam beberapa tahap. Dengan adanya hepatosit yang rusak atau mati, akan terjadi kebocoran enzim lisosom dan pelepasan matriks ekstrasel. Keadaan ini akan mengaktifkan sel Kupffer di sinusoid hati yang akan mengeluarkan berbagai faktor pertumbuhan dan sitokin. Sitokin ini akan mengubah monosit menjadi makrofag aktif, memicu proliferasi fibroblast, dan mengubah sel HSC menjadi fenotip miofibroblast (Hajar, 2012). HSC yang teraktivasi menjadi fenotip miofibroblast inilah yang akan meningkatkan produksi matriks ekstraseluler, yang berakibat pada

penimbunan kolagen (Tipe I, III, dan IV), proteoglikan (dekorin, biglikan, lumikan, agrekan), dan glikoprotein (fibronektin, laminan, tenaskin, dan unduin) di ruang Disse. Ilustrasi patogenesis fibrosis hati dapat dilihat pada gambar 2.1



Gambar 2.1 Ilustrasi patogenesis fibrosis hati (Bataller R., dan Brenner DA., Overview of Liver fibrosis)

2.1.4 Penentuan Derajat Fibrosis Hati

Derajat suatu penyakit diukur untuk melihat sudah seberapa jauh perubahan atau abnormalitas yang terjadi pada suatu keadaan sakit dibandingkan dengan keadaan alaminya (Goodman, 2007). Penanda fibrosis yang ideal bersifat spesifik, berbasis biologis, non-invasif, mudah diulang pada semua pasien, berhubungan baik dengan beratnya penyakit, serta tidak dipengaruhi oleh komorbiditas dan obat. (Anom dan Wibawa, 2010)

Sampai saat ini *gold standard* untuk menentukan derajat keparahan dari fibrosis hati adalah biopsi hati (Ismail, 2011). Pada dasarnya biopsi hati mempunyai dua fungsi utama. Fungsi utama dari biopsi hati merupakan bagian yang penting dalam evaluasi pasien dengan berbagai penyakit hati, yaitu dapat

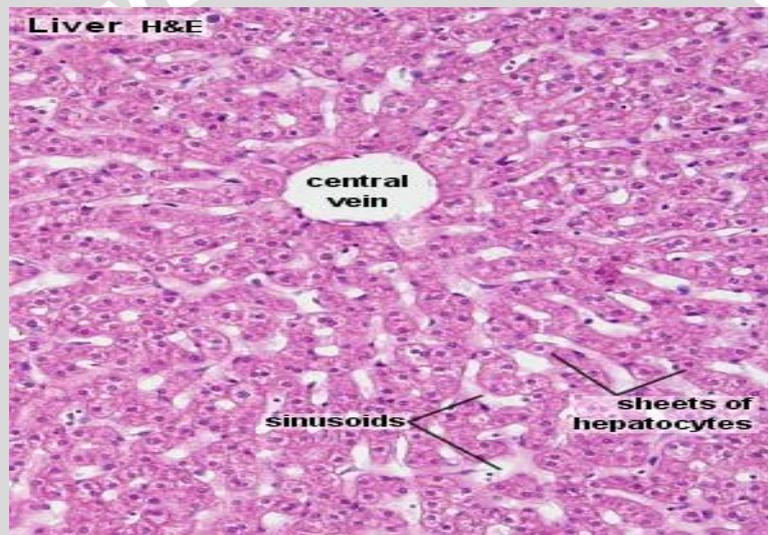
menegakkan diagnosis penyakit hati. Selain itu, biopsi hati juga biasanya digunakan untuk menilai derajat dari keparahan penyakit tersebut, seperti derajat terbentuknya sikatriks, progresifitasnya untuk menjadi sirosis, dan berbagai komplikasi klinik lain yang mungkin terjadi (Goodman, 2007). Kelemahan dari biopsi hati adalah potensi dari komplikasi sesudah tindakan (mortalitas dan komplikasi pendarahan), ketidaknyamanan pasien, rasa nyeri, biaya (Hajar, 2012) serta fakta bahwa biopsi hanya mengambil 1/50.000 hati sehingga sejumlah kesalahan dalam pengambilan sampel tidak dapat dihindari (Anom dan Wibawa, 2010).

Dewasa ini, ada tiga metode yang paling sering digunakan dalam menilai derajat fibrosis hati berdasarkan biopsi tersebut, yaitu skor Metavir, Ishak, dan Desmet/Scheuer (Anom dan Wibawa, 2010). Metode tersebut merupakan metode sederhana untuk menentukan derajat fibrosis hati dengan beberapa kategori. Masing-masing metode menilai perkembangan progresif periportal, fibrosis septal, dan pembentukan nodul. Perbedaan utama adalah adanya dua stadium sirosis pada skor Ishak (stadium 5 dan 6), sedangkan pada Metavir hanya satu (f4) (Anom dan Wibawa, 2010). Sedangkan, penentuan derajat fibrosis hati menggunakan kriteria *Histological Grading and Staging of Chronic Hepatitis for Fibrosis established by the 10th World Digestive Disease Academic Conference in Los Angeles in September 1994*, (Li et al., 2012) dimana:

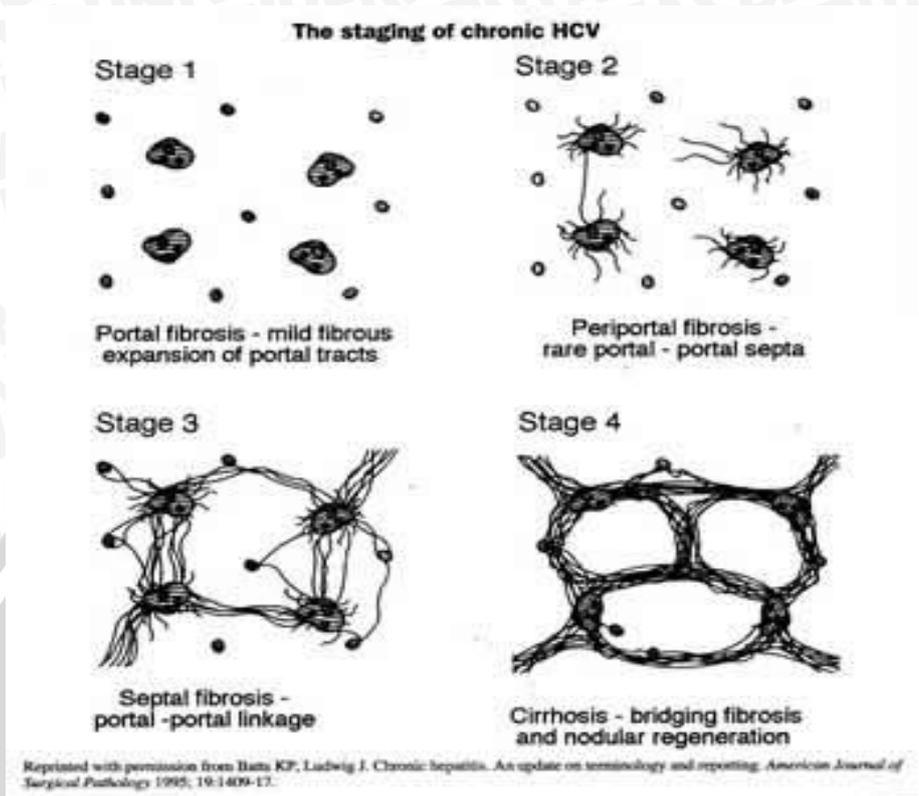
- S-0 : tidak ada fibrosis.
- S-1 : ada fibrosis terbatas di area porta, perisinusoidal dan intralobular.

- S-2 : fibrosis perifer di area porta, terbentuk septum fibrosa, terjadi kerusakan arsitektur intralobular
- S-3 : terjadi septum fibrosa disertai kerusakan struktur intralobular, belum terlihat sirosis.
- S-4 : terjadi sirosis.

Contoh gambaran jaringan hati normal dan fibrosis hati pada berbagai derajat dapat dilihat pada gambar 2.2 dan gambar 2.3.



Gambar 2.2 Gambaran jaringan hati normal (fibrosis derajat 0)



Gambar 2.3. Ilustrasi gambaran fibrosis hati pada berbagai derajat (Li et al., 2012)

Selain biopsi hati, ada beberapa metode yang dikembangkan untuk menentukan derajat dari fibrosis hati ini, seperti FibroScan, serum markers, dan teknik imaging. FibroScan (FibroScan, Echosens, Franc) adalah alat yang dapat mengukur kekakuan jaringan, dengan metode *transient elastography*, metode yang didasarkan pada kecepatan propagasi gelombang. Elastisitas jaringan dapat diperkirakan berdasarkan kecepatan propagasi dari gelombang. Semakin kaku suatu jaringan, semakin tinggi kecepatan propagasi gelombang. Namun metode ini tidak dapat dilakukan pada pasien ascites maupun pasien dengan ruang interkostal yang sempit (Hajar, 2012).

Diagnosis dengan cara metode non *invasive* seperti essay serum juga banyak dikembangkan. Namun keterbatasan yang muncul dari essay serum ini

adalah tidak spesifik hanya pada hati, tapi juga dapat dipengaruhi oleh perubahan dari eksresi dan klirensnya. Untuk pengukuran derajat fibrosis secara non invasif juga dapat ditentukan dengan teknik *imaging* dengan mendeteksi kelainan dari struktur yang berubah pada injuri kronik pada hati, seperti portal hipertensi, namun metode ini kurang spesifik untuk mendeteksi derajat fibrosis (Ismail, 2011).

2.2 Interleukin 17

2.2.1 Tinjauan Umum Interleukin-17 (IL-17)

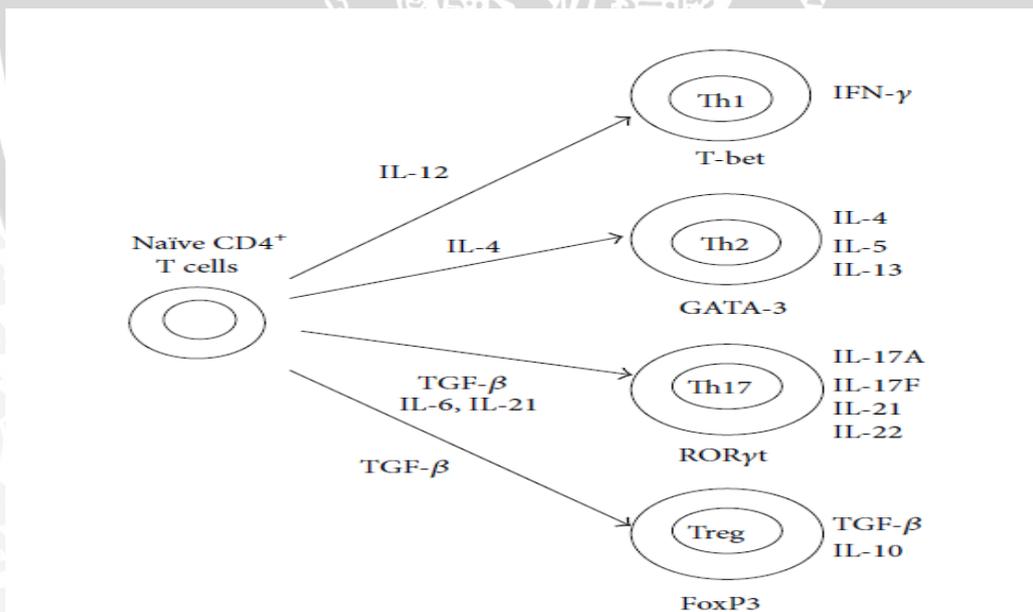
Sel limfosit T helper (Th) CD4+ merupakan regulator esensial pada respon imun dan penyakit inflamasi. Setelah diaktivasi oleh professional antigen-presenting cells (APC), sel T helper berdiferensiasi menjadi sel-sel efektor yang berspesialisasi pada sekresi sitokin dan fungsi sitokin (Chang *et al*, 2006)

Efektor adaptif dari T helper (*Th*)-mediated immune response CD4+ sangatlah bervariasi, setiap efektor mempunyai karakter dan produksi sitokin tersendiri (Romagnani, 2008). Dewasa ini, sejak ditemukannya famili baru dari sel T CD4⁺, ada empat subset utama yang dibedakan berdasarkan ekspresi profil faktor transkripsinya, dan sitokin yang disekresikan, yaitu Th1, Th2, Th17 dan sel T regulator (Treg) (Hammerich *et al*, 2010). Dalam beberapa tahun terakhir, fakta baru mengenai famili baru dari CD4+ ini berkaitan dengan ditemukannya Th-17 yang mempunyai kemampuan memproduksi berbagai sitokin inflamasi seperti IL-17A(IL-17), IL-17F, and IL-6 (Wang *et al*, 2010).

Diferensiasi Th-17 dari sel T naif membutuhkan sinyal dari TGF- β , IL-6, IL-21, IL-1b dan IL-23. Sitokin-sitokin tersebut mempengaruhi sel T naif untuk menjadi Th 17 dalam 3 fase. Pertama, diferensiasi menjadi Th-17 diinisiasi oleh stimulasi IL-6 dan transforming growth factor- β (TGF- β). Kemudian sel T naif

memproduksi IL-21 yang mengupayakan umpan positif pada diferensiasi Th 17, dan menginduksi ekspresi dari reseptor IL-23. Pada tahap terakhir, sitokin IL-23 berpartisipasi dalam stabilisasi dari fenotip Th 17 yang terbentuk. IL-6, IL-23, dan IL-21 mengaktifkan sinyal transducer and activator of transcription-3 (STAT3), yang penting untuk induksi dari IL-22, IL17A dan IL-17F (Lafdil *et al*, 2010).

Fungsi utama IL-17 itu sendiri adalah untuk memediasi inflamasi dengan menstimulasi produksi dari sitokin inflamasi, seperti TNF- α , IL-1b dan IL-6, serta kemokin proinflamasi yang membantu pemanggilan neutrofil dan makrofag (Mills, 2008). Meningkatnya level dari IL-17 telah diketahui berhubungan dengan beberapa kondisi, termasuk inflamasi jalan nafas, rheumatoid arthritis, adesi dan abses intraperitoneal, penyakit inflamasi usus, penolakan allograft pada pasien pasca transplantasi, kanker, dan multiple sklerosis (Witowski *et al*, 2003).



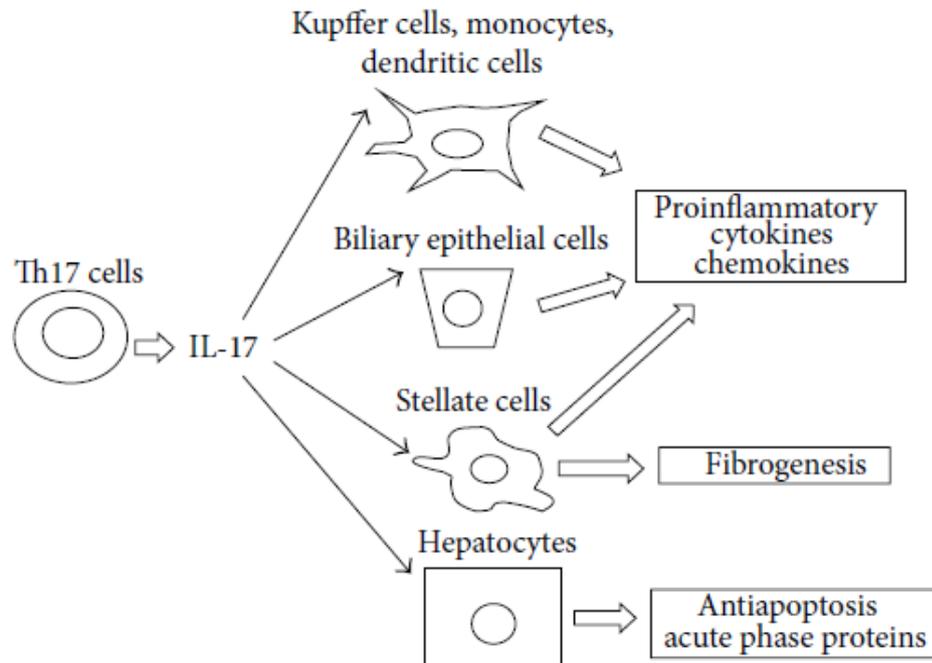
Gambar 2.4. Jalur Diferensiasi Sel T . naïve CD4⁺ T cells bisa berdiferensiasi menjadi subset-subset yang berbeda tergantung pada sitokinnya. Setiap subset dikarakterisasikan berdasar kekhasan dari ekspresi faktor transkripsi serta sitokin yang disekresikan (Abe *et al*, 2013).

2.2.2 Hubungan IL 17 dan Fibrosis Hati

Ekspresi dari IL-17 telah terdeteksi pada seluruh tipe sel di hati, termasuk sel limfosit, hepatosit, sel Kupffer, sel stellata, sel *epithel billiary*, dan sel endotel sinusoidal. Aktivasi ini dapat terjadi saat adanya injuri pada hati dan akan memicu ekspresi dari berbagai sitokin pro inflamasi ataupun kemokin-kemokin pada sel-sel tersebut (Lafdil, 2010).

Interleukin-17 dan reseptornya terinduksi saat terjadinya injuri pada hati, dan mempunyai efek pro fibrogenik yang kuat pada sel-sel inflamasi di sekitar tempat terkena injuri ataupun pada sel-sel yang ada di hati. Efek pro fibrogenik yang kuat pada induksi oleh IL-17 pada sel-sel di hati mempunyai dua mekanisme, yaitu :

1. IL-17 menstimulasi sel Kupffer mengekspresikan sitokin inflamasi seperti IL-6, IL-1 dan TNF- α dan sitokin pro fibrogenik utama yaitu TGF- β 1.
2. IL-17 menstimulasi *Hepatic Stellate Cell* (HSC) untuk mengekspresikan kolagen tipe 1 dan membantu aktivasi dari HSC menjadi fenotip fibrogenic myofibroblas melalui *Signal Transducer and Activator of Transcription-3* (STAT-3) dari IL-17.



Gambar 2.5. Jalur Efek dari Interleukin-17 terhadap Sel-Sel di Hati.

IL-17 berperan dalam patogenesis penyakit hati. IL-17 menstimulasi berbagai tipe dari sel non-parenkimal hati untuk mensekresikan sitokin-sitokin pro inflamasi serta kemokin, yang akan menginduksi inflamasi hati. IL-17 juga mempromosikan fibrogenesis hati melalui aktivasi hepatic stellate cell (HSC) (Abe *et al*, 2013).

2.3 Karbon Tetraklorida

Karbon tetraklorida adalah zat volatil yang tidak berwarna, terasa panas, berbau seperti kloroform. Karbon tetraklorida tidak dapat larut dalam air, namun dapat larut dalam alkohol, kloroform, ether, dan minyak volatile. Karbon tetraklorida (CCl₄) sangat mudah menguap, sehingga CCl₄ dalam wujud cairan jarang di alam dan lebih banyak dijumpai dalam bentuk gas. Karbon tetraklorida (CCl₄) tidak mudah terbakar, sangat stabil dengan adanya udara dan cahaya di alam (Musthofiyah, 2008).

2.3.1 Toksisitas Pada Manusia

Manusia bisa terpapar oleh CCl₄ melalui beberapa cara paparan, yaitu :

- Orang yang bekerja di tempat dimana karbon tetraklorida digunakan atau dibuat. Manusia juga bisa terpapar CCl₄ jika menghirup udara luar yang mengandung karbon tetraklorida
- Meminum air yang mengandung karbon tetraklorida
- Terkena tanah yang mengandung CCl₄, berenang atau mandi dengan air yang terkontaminasi (Delaware Health and Social Services, 2009)

Toksisitas CCl₄ dapat disebabkan oleh bentuk metabolitnya. Metabolisme CCl₄ menghasilkan radikal bebas *Trichloromethyl* (CCl₃[•]). Selanjutnya CCl₃[•] akan menginduksi terjadinya peroksidasi lipid yang akan menyebabkan kerusakan membran dan hilangnya fungsi sel dan organel. (Junieva, 2006).

Paparan tinggi terhadap CCl₄ dapat menyebabkan kerusakan hati, ginjal, dan susunan saraf pusat. Hati sangat sensitif terhadap CCl₄. Ginjal juga dapat rusak dan menyebabkan terkumpulnya 'waste' di darah. Jika terjadi paparan pada level rendah, hati dan ginjal dapat memperbaiki sel yang rusak dan dapat berfungsi normal kembali. Jika terjadi paparan tinggi, susunan saraf pusat, termasuk otak, akan terganggu. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005)

2.3.2 Toksisitas pada Hewan Coba

Pada hewan, CCl₄ bertindak sebagai agen hepatotoksik yang poten. Pada tikus, paparan berkelanjutan pada kadar 10 – 50 ppm didapatkan mempunyai dampak pada hati. Toksisitas ginjal umumnya terjadi hanya pada paparan dengan dosis yang sangat tinggi. Pada reproduksi dan perkembangan, secara garis besar hasilnya negatif. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005). Berdasarkan bukti yang ada, diprediksi bahwa toksisitas hati

adalah dampak buruk yang paling sering terjadi pada hewan coba setelah dipapar oleh CCl₄.

2.3.3 Hepatotoksisitas

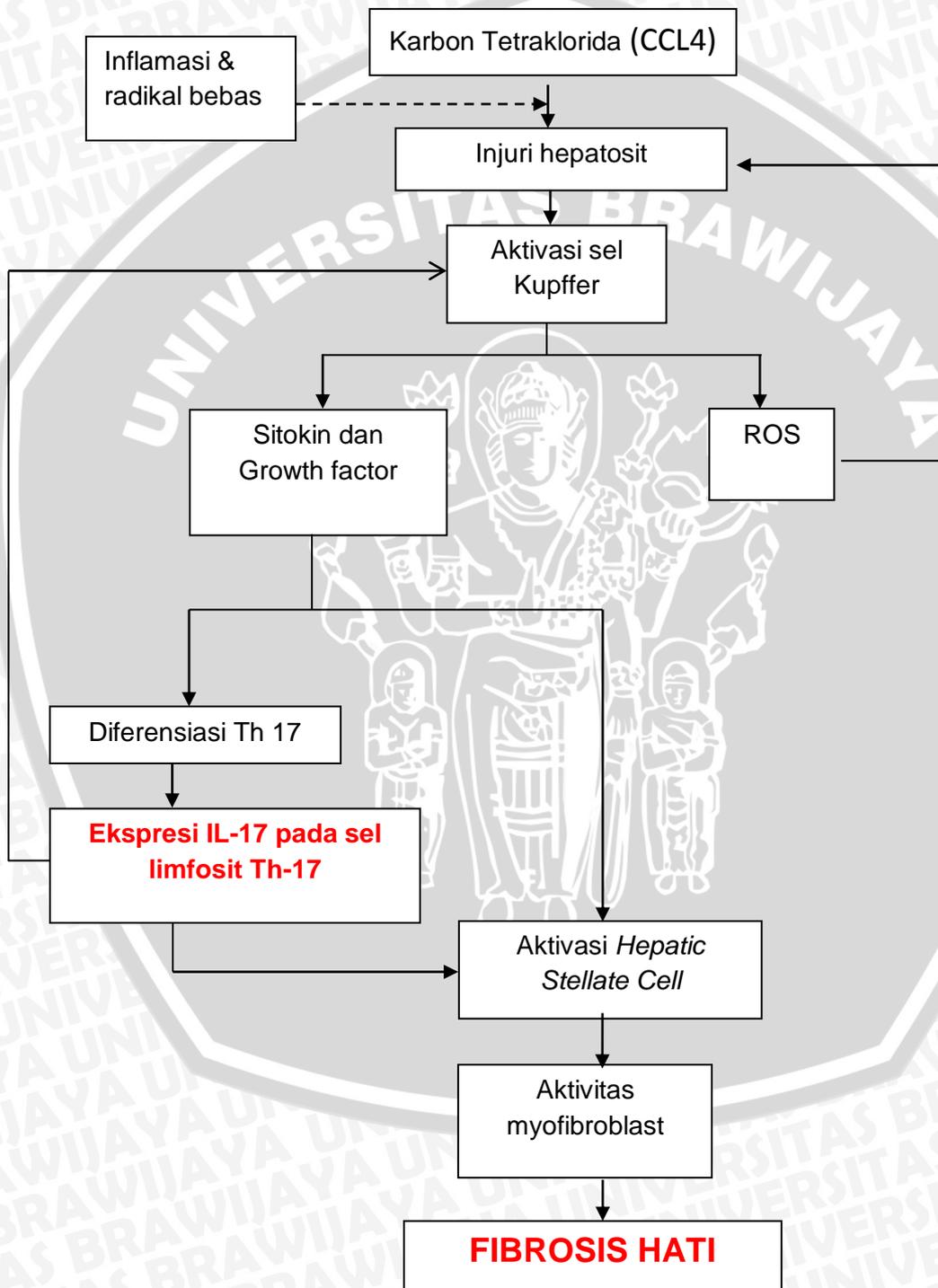
Karbon tetraklorida adalah hepatotoksin yang sangat poten. Hepatotoksik yang ditimbulkan oleh CCl₄ disebabkan oleh senyawa hasil metabolisme yang bersifat radikal bebas. CCl₄ di metabolisme oleh Sitokrom P-450 di retikulum endoplasma liver menjadi senyawa yang sangat reaktif yaitu *trychloromethyl* radikal (CCl₃[•]) yang akan segera bereaksi dengan O₂ membentuk *peroxytrichloromethyl* radikal (CCL₃O₂[•]). Radikal bebas tersebut akan bereaksi dengan makromolekul-makromolekul seluler terutama asam lemak tidak jenuh sehingga terjadi lipid peroksidasi yang berakibat rusaknya struktur dan fungsi sel (Slater, 1984). Kerusakan sel hepar ini sendiri memicu aktivasi sel Kupffer. Sel Kupffer yang teraktivasi dapat melepaskan berbagai mediator pro inflamasi yang dapat memperberat kerusakan hepatosit dan mediator anti inflamasi yang bersifat hepatoprotektor. Selain itu, sel Kupffer juga dapat melepaskan ROS yang juga memperberat kerusakan hepatosit.

Gambaran histologi kerusakan jaringan hati juga dapat diamati secara langsung dengan melihat gambaran sediaan histologi jaringan hepar tersebut. Derajat kerusakan hati oleh karbon tetraklorida (CCl₄) tergantung kepada dosis, rute pemberian, dan juga lama paparan (Hidayati, 2007).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Hepatotoksik yang ditimbulkan oleh CCl₄ disebabkan oleh senyawa hasil metabolisme yang bersifat radikal bebas. Senyawa radikal bebas tersebut adalah CCl₃[·] dan CCl₃O₂[·]. Radikal bebas ini dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak yang menimbulkan disfungsi membran dan organel sel yang dapat menyebabkan injuri pada hepatosit. Injuri hepatosit ini akan mengaktifkan sel Kupffer di sinusoid hati untuk mengeluarkan sitokin-sitokin, seperti IL-1 β , IL-6, TNF- α dan *growth factor* TGF- β , serta ROS. ROS yang diproduksi tersebut akan membuat injuri pada hepatosit semakin *massive*, sedangkan sitokin dan *growth factor* akan mengaktifasi *Hepatic Stellate Cell* menjadi fenotip miofibroblast fibrogenik yang akan meningkatkan produksi matriks ekstraseluler termasuk kolagen.

Disisi lain sitokin-sitokin TGF- β , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-21, dan IL-23, akan mengaktifasi sinyal *transducer and activator of transcription-3 (STAT3)*. STAT 3 akan menginduksi ekspresi dari reseptor ROR- γ t yang berperan dalam diferensiasi T naif menjadi Th-17. Th-17 akan mensekresi berbagai sitokin, salah satunya IL-17. IL-17 itu sendiri mempunyai efek pro fibrogenik kuat melalui 2 mekanisme, yaitu :

1. Aktivasi sel kupfer. Sel Kupffer yang teraktivasi dapat melepaskan berbagai mediator pro inflamasi seperti IL-6, IL1- β , serta sitokin fibrogenik utama yaitu TGF- β 1, yang akan mengaktifasi HSC menjadi fenotip miofibroblast. Selain itu, sel Kupffer juga dapat melepaskan ROS yang akan semakin memperberat kerusakan hepatosit.
2. IL-17 secara langsung menstimulasi *Hepatic Stellate Cell* yang akan teraktivasi menjadi fenotip miofibroblast fibrogenik dan

mengekspresikan matriks ekstraseluler, termasuk kolagen, yang akan tertimbun di ruang Disse. Sehingga, terjadilah fibrosis hati (Meng, 2012).

3.2 Hipotesis Penelitian

Dari kerangka konsep diatas maka hipotesis dari penelitian ini adalah ada hubungan positif antara ekspresi Interleukin-17 pada limfosit jaringan hati dengan derajat fibrosis hati tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang dipapar dengan karbon tetraklorida (CCl_4).



BAB 4

METODE PENELITIAN

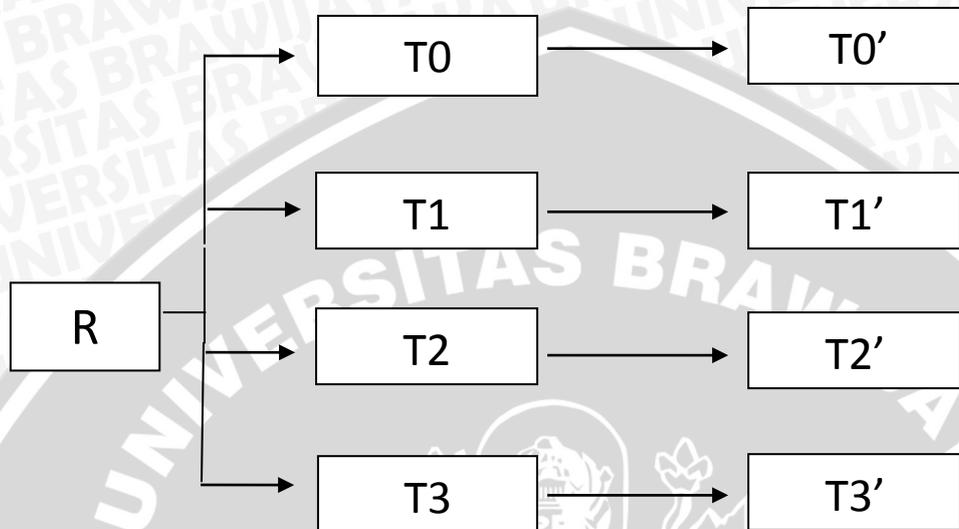
4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental in vivo pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang dilakukan di laboratorium dengan RAL (Rancangan Acak Lengkap). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan ekspresi dari Interleukin 17 (IL-17) pada limfosit jaringan hati terhadap derajat fibrosis hati tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan karbon tetraklorida (CCl₄) setiap 72 jam. Setelah diinduksi CCl₄, akan dilakukan pengukuran ekspresi IL-17 jaringan hati dan derajat fibrosis pada kelompok tikus baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan.

Sebelum dilakukan perlakuan, semua tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari kemudian dibagi menjadi 4 kelompok. Penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus putih *Wistar* jantan yang dibagi menjadi 4 kelompok secara acak, terdiri dari T0 (kontrol), dan T1, T2, T3 yang merupakan perlakuan dengan dosis CCl₄ 1,0 mL/KgBB setiap 72 jam.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Post Test Only Control

Group yang dapat dijelaskan pada bagan berikut :



Gambar 4.1. Rancangan Percobaan Post Test Only Control Group

Keterangan :

- T0 : Kelompok Kontrol yang tidak dipapar dengan CCl4 1,0mL/KgBB
- T1 : Kelompok Perlakuan (fibrosis derajat 1), dipapar dengan CCl4 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu selama 2 minggu.
- T2 : Kelompok Perlakuan (fibrosis derajat 2), dipapar dengan CCl4 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu selama 5 minggu.
- T3 : Kelompok Perlakuan (fibrosis derajat 3), dipapar dengan CCl4 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu selama 9 minggu
- T0' : Pengamatan ekspresi IL-17 jaringan setelah perlakuan T0
- T1' : Pegamatan ekspresi IL-17 jaringan setelah perlakuan T1
- T2' : Pegamatan ekspresi IL-17 jaringan setelah perlakuan T2
- T3' : Pegamatan ekspresi IL-17 jaringan setelah perlakuan T3

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah tikus jenis *Rattus norvegicus* galur wistar yang dipelihara di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.2 Sampel

Sampel yang dipakai adalah tikus wistar dengan jenis kelamin jantan, dewasa dengan umur \pm 2 bulan atau 6-8 minggu. Pemilihan sampel penelitian untuk pengelompokan perlakuan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) atau *Randomized Completely Design* (RCD) mengingat baik hewan coba, bahan pakan, dan bahan penelitian lainnya dapat dikatakan homogen.

Penentuan besar sample pada penelitian ini menggunakan rumus perhitungan (BIMKES, 2014) yaitu :

$$P(n-1) > 15$$

P : jumlah perlakuan, pada penelitian ini $t=4$

n : jumlah sampel penelitian

Sehingga jumlah pengulangan yang dilakukan adalah:

$$4(n-1) > 15$$

$$4n - 4 > 15$$

$$4n > 19$$

$$n > 4,75$$

Dari hasil perhitungan di atas, dibutuhkan sampel sebanyak 5 ekor tikus pada tiap kelompok perlakuan. Sehingga jumlah tikus yang digunakan untuk

penelitian ini adalah sebanyak 20 ekor, dengan pembagian sebagai berikut :

KELOMPOK	PERLAKUAN	JUMLAH TIKUS
Kontrol	Kelompok fibrosis derajat 0, tanpa paparan CCl ₄	5
Perlakuan 1	Kelompok fibrosis derajat 1, didapatkan dengan paparan CCl ₄ konsentrasi 1,0 mL/KgBB setiap 72 jam selama 2 minggu	5
Perlakuan 2	Kelompok fibrosis derajat 2, didapatkan dengan paparan CCl ₄ konsentrasi 1,0 mL/KgBB setiap 72 jam selama 5 minggu	5
Perlakuan 3	Kelompok fibrosis derajat 3, didapatkan dengan paparan CCl ₄ konsentrasi 1,0 mL/KgBB setiap 72 jam selama 9 minggu	5

4.2.3 Kriteria Sampel

4.2.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus berjenis kelamin jantan
- b. Usia \pm 2 bulan (6-8 minggu)
- c. Berat badan 230-280 gram
- d. Kondisi sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomi

4.2.3.2 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus tidak mau makan seterusnya selama masa penelitian
- b. Tikus yang sakit dan mati selama masa perlakuan

4.2.3.3 Kriteria *Drop Out*

Tikus dinyatakan *drop out* apabila sesuai dengan kriteria eksklusi dan diganti dengan tikus lain yang sesuai dengan kriteria inklusi, sehingga didapat jumlah tikus yang sesuai dengan ketentuan sampel.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (Independent)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah derajat fibrosis hati tikus dengan dosis dan lama pemberian merujuk pada penelitian sebelumnya, yaitu *Establishment of a Standardized Liver Fibrosis Model with Different Pathological Stage in Rat* (Li *et al*, 2012) sehingga dibagi dalam beberapa kelompok yang telah dijelaskan sebelumnya.

4.3.2 Variabel Tergantung (Dependent)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ekspresi Interleukin 17 (IL-17) pada limfosit jaringan hati.

4.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah jenis tikus putih jantan strain wistar, pemberian CCl₄, kandang tikus, makanan, dan minuman tikus.

4.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Pemeliharaan dan perlakuan terhadap tikus berupa induksi CCl₄ yang dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Analisis ekspresi IL-17 dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pengukuran derajat fibrosis hati dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu yang dibutuhkan untuk melakukan penelitian ± 3 bulan yaitu Maret – Mei 2014.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat

- Alat Pemeliharaan Tikus

Kandang dari kotak berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air, rak tempat menaruh kandang, sekam, dan penimbangan berat badan dengan neraca sartorius.

- Alat Pembuat Makanan Tikus

Baskom plastik, timbangan, sarung tangan, gelas ukur, pengaduk, penggilingan pakan, nampan

- Alat pemeriksaan ekspresi IL-17 jaringan hati, imunohistokimia

- Alat pengukuran derajat fibrosis : mikrofon rotatory/ sliding, water bath, obyek glass

- Alat pembuat dan pemberian larutan CCl₄

Pipet, beaker glass, spatula, spuit.

4.5.2 Bahan

- Bahan perawatan tikus: air, sekam, pakan tikus.
- Bahan pembuatan pakan standar:

Pakan standar tikus Wistar berupa konsentrat PARS 53,87%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%.

Bahan makanan :

- Jumlah makanan rata-rata 40g/hari untuk setiap tikus
- Pakan mormal mengandung berupa konsentrat PARS 53,87%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%
- Pemberian diberikan secara rutin
- Bahan pembuatan dan pemberian larutan CCl₄ : CCl₄, minyak jagung, spet, kapas, alkohol
- Bahan bedah tikus: alkohol, kapas, gunting, ether.
- Bahan untuk pemeriksaan ekspresi IL-17 jaringan : organ hati tikus, imunohistokimia kit
- Bahan penentuan derajat fibrosis hati : formalin 10% , acetone, xylol, parafin cair, parafin blok, mayer albumin, pewarnaan HE, alkohol 95%, air, hematoxilin, lithium karbonat.

4.6 Definisi Operasional

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan umur \pm 2 bulan dan berat 230-280 gram.
2. Ekspresi Interleukin IL-17 pada limfosit jaringan hati

Ekspresi IL-17 pada limfosit jaringan hati adalah hasil analisa dengan metode imunohistokimia dengan menghitung rata-rata jumlah sel limfosit yang mengekspresikan IL-17 pada jaringan hati, dalam 20 lapang pandang dan dianalisa dengan mikroskop pembesaran 400x.

3. Paparan CCl₄

Induksi CCl₄ yang dimaksud dalam penelitian ini adalah pemberian CCl₄ sebagai perlakuan yaitu dengan dosis 1,0 mL/KgBB 2 kali seminggu selain kelompok Kontrol, dengan lama pemaparan sesuai dengan derajat fibrosis yang akan dicapai, dan berpedoman pada penelitian sebelumnya yaitu Establishment of a Standardized Liver Fibrosis Model with Different Pathological Stage in Rat (Li Li, 2012).

4. Diet normal berupa pakan standart berupa konsentrat PARS 53,87%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%
5. Derajat fibrosis hati, menggunakan *criteria of Histological Grading and Staging of Chronic Hepatitis for Fibrosis* dengan interpretasi sebagai berikut : S0 = Tidak ada fibrosis, S1 = Fibrosis terlokalisasi pada areal portal tanpa septa, dengan gambaran fibrosis perisinusoidal dan intralobular fibrosis, S2 = Fibrosis pada daerah perifer area portal, dan gambaran septa yang jarang, S3 = Terbentuk nya banyak septa dengan diikuti kerusakan struktur intralobular, tanpa adanya sirosis, S4 = Sirosis hepar tahap awal. Pemeriksaan histopatologi menggunakan pewarnaan HE dan fibrosis diamati dengan mikroskop cahaya.

4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Pengelolaan dan Pemeliharaan Tikus Putih

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Awal percobaan semua tikus ditimbang berat badannya kemudian dilakukan randomisasi agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan.

3. Memasukkan tikus kedalam kandang yang dibuat dari bak plastik dengan penutup kawat ram yang dibingkai dengan kayu dan mengadaptasikan tikus putih jantan selama 7 hari dengan diberi diet normal supaya tikus dapat menyesuaikan diri dengan perubahan lingkungan dan beradaptasi dengan waktu pemberian makanan. Pada masa adaptasi berat tikus ditimbang yaitu pada saat awal adaptasi dan sesudah adaptasi, agar dapat dipantau bahwa berat badan tikus tidak mengalami penurunan dan berada dalam kondisi yang baik.
4. Memberi label pada kandang tikus sesuai dengan perlakuan yaitu label kontrol, dan perlakuan dengan setiap kelompok berisi 5 tikus.
5. Memberi alas pada kandang berupa sekam dengan ketebalan secukupnya dan melakukan pergantian sekam setiap 3 hari sekali.
6. Memberikan minum dengan aquades setiap hari yang ditempatkan pada botol minum ukuran 100 mL dan terdapt pipa dengan bola katup tempat keluarnya air minum. Tempat ini diletakkan di atas kawat penutup kandang.
7. Memberikan pakan yang berupa konsentrat PARS 53,8%, tepung terigu 26,94%, dan air sebesar 19,18%
8. Menginduksi CCl₄ dengan disuntikkan Intraperitoneal dosis 1,0mL/KgBB setiap 72 jam pada kelompok perlakuan.

4.7.2 Pembuatan dan Pemberian Larutan CCl₄

1. Mengambil CCl₄ dengan pipet ukur sebanyak 5mL/hari
2. Melarutkan CCl₄ dengan minyak jagung sebanyak 1:9 didalam beaker glass, yaitu untuk CCl₄ sebanyak 5 mL dan minyak jagung 5mL dengan konsentrasi 10%, kemudian mengaduk hingga tercampur rata.

3. Pengambilan larutan CCl₄ dengan dosis 1,0 mL/KgBB/72 jam
4. Penyuntikan dilakukan secara intraperitoneal menggunakan spuit. Menginduksi CCl₄ dilakukan setiap 72 jam. Sebelum melakukan penyuntikan terlebih dahulu membersihkan daerah yang akan disuntik dengan kapas yang diberi alkohol dengan gerakan melingkar agar steril, dan perlu dipastikan sebelum melakukan penyuntikan tidak ada udara karena udara dapat menyebabkan emboli.

4.7.3 Pembedahan dan Pengambilan Sampel

1. Pada setiap rentang waktu derajat fibrosis, 5 tikus dari setiap kelompok di bedah untuk diperiksa derajat fibrosis dan ekspresi IL-17 pada limfosit jaringan hati.
2. Tikus dianestesi terlebih dahulu dengan eter perinhalasi.
3. Tikus dibaringkan pada permukaan meja yang keras yang dialasi dengan streofoam. Kaki dan tangan tikus difiksasi dengan jarum pentul pada atas streofoam.
4. Toraks dan abdomen tikus dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median. Pembukaan abdomen diperluas kearah lateral, sehingga organ-organ dalam rongga abdomen terlihat.

4.7.4 Pengukuran Ekspresi IL17 Pada Limfosit Jaringan Hati

Pengukuran ekspresi IL-17 pada limfosit jaringan hati dilakukan menggunakan metode imunohistokimia. Metode Immunohistokimia dilakukan dengan menggunakan metode *streptavidin-biotin-peroksidase* yang dilabel dengan *streptavidin biotin* (Dako, Carpinteria, USA). Sebelum proses pewarnaan,

setiap sediaan preparat didefaraffinisasi dengan xylene selama 15 menit dan direhidrasi dengan alkohol 100% dan alkohol yang konsentrasinya diencerkan menjadi 90%, 80%, 70% dan 60% selama masing masing 10 menit. Sediaan kemudian dicuci dengan dH₂O sebanyak 2 kali selama 5 menit dan diinkubasi dengan larutan PBS selama 5 menit.

Selanjutnya, sediaan preparat diletakkan ke dalam glass box yang berisi citrate buffer kemudian dimasukkan kedalam autoclave selama 15 menit untuk dioptimalkan antigenicity-nya. Sediaan didinginkan pada suhu ruangan selama 1 jam, dan setelah dikeringkan sebentar, jaringan diberi batas dengan menggunakan pap pen. Sediaan dicuci dengan dH₂O selama 5 menit dan PBS selama 5 menit sebelum diinkubasi dengan hydrogen peroksidase 0.3% selama 15 menit.

Setelah endogenous peroksidasinya diblok, sediaan diinkubasi dengan blocking solution selama 30 menit untuk memblok avidin yang terdapat pada jaringan. Kemudian, sediaan diinkubasi selama 2 jam pada suhu -4°C dengan primer antibodi yang diencerkan 1:100. Sediaan dicuci lagi sebanyak 3 kali dengan dH₂O sebelum diinkubasi dengan secondary antibody dan streptavidin-HRP masing masing selama 90 dan 60 menit. Untuk pewarnaan digunakan 3,3 diamino benzidine tetrahydrochloride kurang lebih 10 menit sampai didapatkan reaksi pewarnaan yang dapat dideteksi dengan pemeriksaan mikroskopis. Setelah itu diwarnai lagi dengan hematoksilin untuk memperjelas inti sel selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir selama 5 menit. Sediaan didehidrasi dengan menggunakan alkohol yang konsentrasinya dinaikkan secara bertahap dari 70%, 80%, 90% sampai 100% selama masing masing 2 menit. Setelah itu sediaan dicelupan kedalam xylene selama 5 menit.

Terakhir, sediaan diberi malinol sebelum ditutup dengan deg glass. Hasil dari pemeriksaan immunohistokimia akan dikelompokkan berdasarkan jumlah sel yang berwarna dari pewarnaan, yaitu dikatakan positif bila terdapat imunostaining inti dan lebih dari 5% sel tumor positif perwarnaan. Evaluasi immunohistokimia ini akan dilakukan secara individual oleh konsulen Patologi dan peneliti untuk mendapatkan hasil yang akurat.

4.7.5 Pengukuran Histopatologi Fibrosis Hati

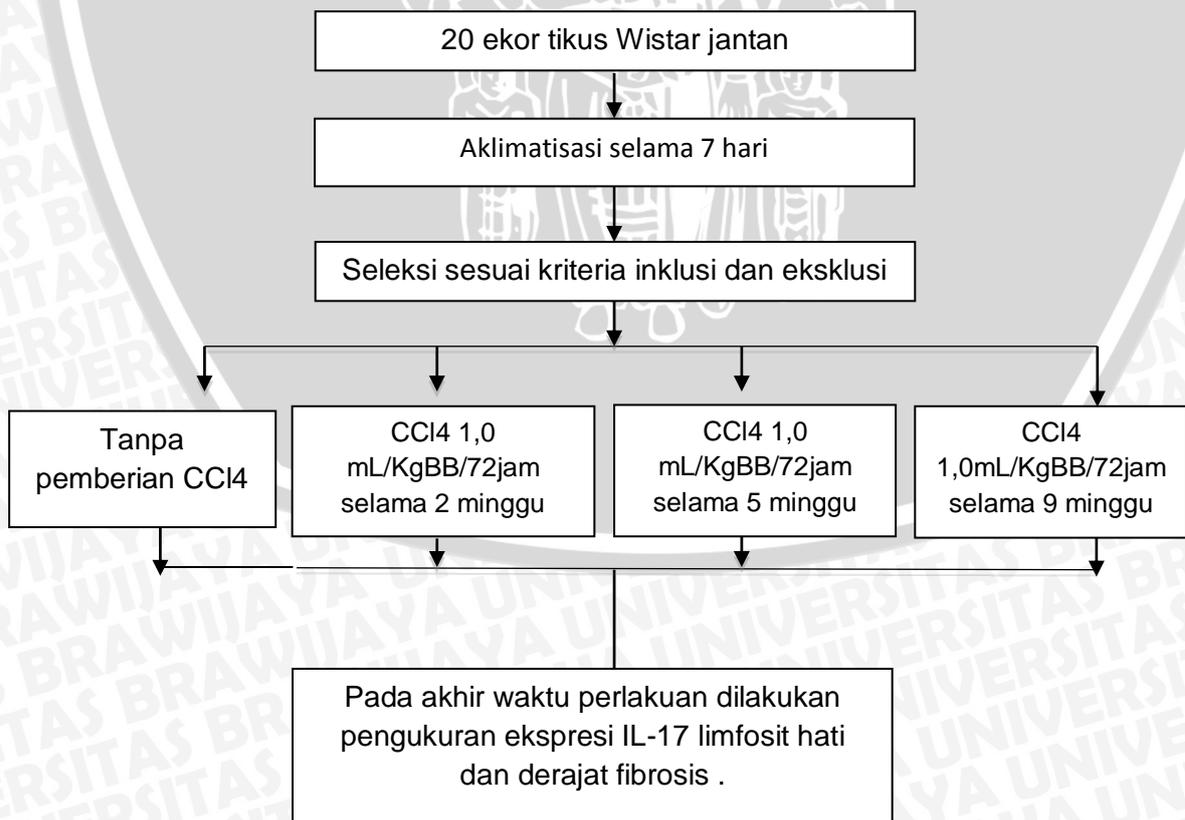
Pertama dilakukan fiksasi. Potongan jaringan hati direndam dalam larutan formalin 10% selama 18- 24 jam. Potongan jaringan hati yang ideal, tidak lebih 2 cm dan tebalnya 4-5 mm. Jaringan ditempatkan dalam kapsul berlubang-lubang dan diberi label untuk diidentifikasi. Tujuan daripada fiksasi adalah untuk mengawetkan sel-sel melalui proses denaturalisasi protein, sehingga struktur inti sel tidak berubah. Lalu dilakukan pencucian dengan cara mencuci gross dengan air mengalir 15 menit untuk menghilangkan sisa-sisa bahan fiksasi dehidrasi.

Kedua dilakukan *embedding*. Potongan jaringan hati direndam ke dalam aceton 4x1 jam. Lalu, potongan jaringan hati direndam ke dalam xylol selama 4x1 jam. Setelah itu, potongan jaringan hati direndam kedalam parafin cair (suhu 60°C) selama 4x1 jam. Terakhir, potongan jaringan hati direndam kedalam parafin blok selama 24 jam.

Ketiga dilanjutkan dengan penyayatan. Potongan jaringan hati disayat dengan mikron *rotatory/ sliding* dengan ketebalan antara 4-6 mikron. Sayatan ditaruh pada *water bath* (suhu 60°C). Sayatan ditaruh pada obyek glass yang telah terlebih dahulu diusap dengan mayer albumin, diamkan selama 24 jam. Selanjutnya, dilakukan Pewarnaan HE. Preparat dicelupkan pada xylol selama 3 x 15 menit. Preparat dicelupkan pada alkohol 95% selama 3 x15 menit, lalu

dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Preparat diwarnai dengan hematoxilin selama 15 menit., lalu dicuci dengan air mengalir selama 15 menit Selanjutnya preparat dicelupkan pada alkohol asam 1 dip. Lalu dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dan dicelupkan pada lithium karbonat 1 dip. Selanjutnya, preparat dicuci dengan air mengalir selama 15 menit dan dicelupkan pada eosin 15 menit. Terakhir, preparat dicelupkan pada alkohol 95% selama 3x15 menit dan ditutup dengan obyek glass pada perekatan entelan / canada balsam. Eosin akan memberikan warna merah pada membran sel, sedangkan hematoxylin akan memberikan warna biru-ungu pada inti sel. Pewarnaan ini akan memperjelas struktur berbagai jenis sel yang ada di dalam jaringan hepatosit hati. Pengamatan dan pengambilan gambar histologis dilakukan di bawah mikroskop.

4. 8 Bagan Alur Penelitian



4.9 Uji Analisis Data

Data hasil penelitian disajikan dalam $\text{mean} \pm \text{SD}$. Kemudian semua data dianalisis dengan statistik parametrik menggunakan *One Way ANOVA* setelah memenuhi uji normalitas data dan uji homogenitas varian. Uji normalitas data akan menunjukkan bahwa sebaran data penelitian ini normal jika $p > 0,05$. Karena itu, untuk penyajian digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Uji homogenitas varian akan menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki varian yang homogen jika $p = 0,05$. Selanjutnya dilakukan uji Tuckey untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok perlakuan, serta uji korelasi bivariate untuk melihat nilai korelasi antar variabel. Analisa data menggunakan SPSS versi 16 dengan derajat kepercayaan 95% dan $\alpha = 0,05$.



BAB 5

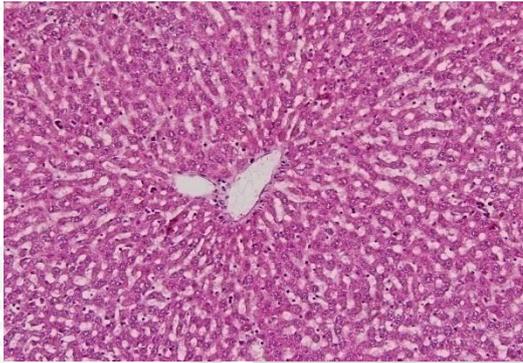
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

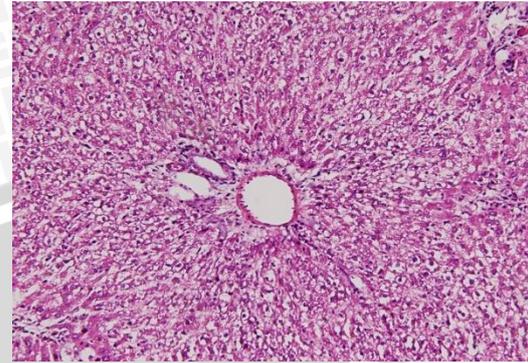
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan ekspresi Interleukin-17 pada limfosit jaringan hati dengan derajat fibrosis hati pada tikus. Tikus diinjeksi dengan CCl₄ dengan waktu yang telah ditentukan untuk mendapat derajat fibrosis yang berbeda-beda. Injeksi CCl₄ tersebut dilakukan 2x seminggu selama 2 minggu (model fibrosis tikus derajat 1), 5 minggu (model fibrosis tikus derajat 2), 9 minggu (model fibrosis tikus derajat 3), serta tanpa dipapar dengan CCl₄ untuk kelompok kontrol.

5.1.1 Hasil Derajat Fibrosis Hati

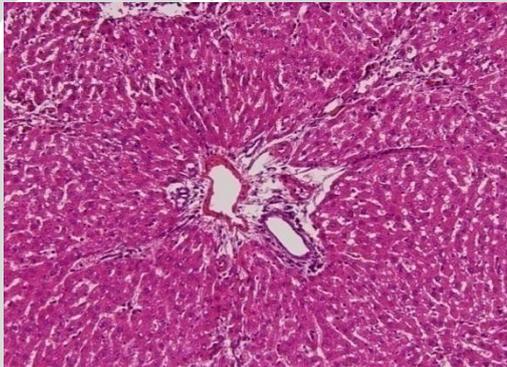
Dalam penelitian ini digunakan 5 tikus untuk kelompok kontrol (derajat 0), 5 tikus untuk kelompok fibrosis derajat 1, 5 tikus untuk kelompok fibrosis derajat 2, dan 5 tikus untuk kelompok fibrosis derajat 3. Setelah dilakukan pewarnaan HE, diamati fibrosis hati pada setiap derajatnya apakah memenuhi kriteria *Histological Grading and Staging of Chronic Hepatitis for Fibrosis*, yang merujuk pada penelitian sebelumnya yaitu *Establishment of a Standardized Liver Fibrosis Model with Different Pathological Stage in Rat* (Li et al, 2012). Pada gambar 5.1 sampai dengan 5.4 dapat terlihat bahwa fibrosis hati pada tikus penelitian, didapatkan sesuai dengan kriteria derajat fibrosis hati tersebut.



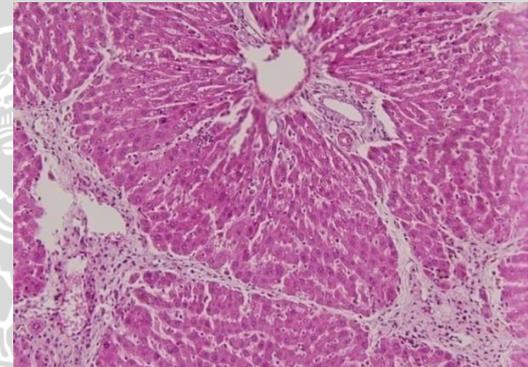
Gambar 5.1 Kontrol fibrosis derajat 0. Tidak adanya fibrosis dan susunan hepatosit masih rapi (H&E, 200x)



Gambar 5.2 Fibrosis derajat I. Susunan hepatosit mulai terganggu, dan didapatkan vacuolar degeneration, fibrosis terlokalisasi pada portal, jarang, dan belum terdapat septa (H&E, 200x)



Gambar 5.3 Fibrosis derajat II. Sinusoid pada hati mulai menyempit, Jaringan fibrosis mulai tampak pada portal dan gambaran septa jarang (H&E, 200x)

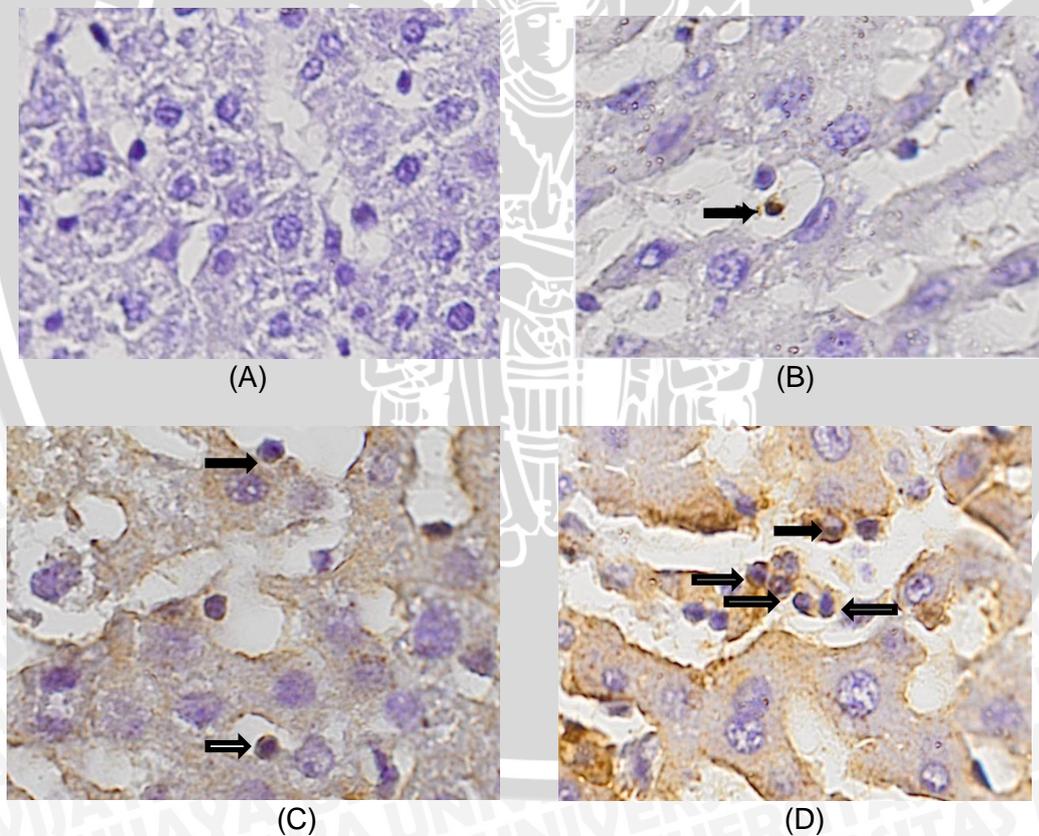


Gambar 5.4 Fibrosis derajat III. Jaringan fibrosis sangat tampak jelas pada area portal, dan juga didapatkan banyak septa. (H&E, 200x)

5.1.2 Hasil Ekspresi Sitokin IL-17

IL-17 merupakan sitokin yang ditemukan memiliki peran sebagai mediator pada respon inflamasi hati kronis. Ekspresi protein IL-17 pada jaringan hati dapat diamati pada daerah sitoplasma, membran sel dan interstitial sel-sel pengeksresi IL-17 dan sel-sel target yang reseptornya berikatan dengan sitokin IL-17. Sel-sel sumber dalam hal ini adalah sel limfosit hati. Sel-sel target dalam hal ini adalah sel Kupffer, hepatosit, dan sinusoidal endothelial cell. Untuk mengamati sel-sel yang mengekspresikan IL-17, organ hati dari kelompok yang

diberi perlakuan dan ataupun kelompok kontrol di rendam dalam formalin 10%. Selanjutnya dibuat slide sediaan hati dan dicat menggunakan imunohistokimia dengan antibodi IL-17. Kemudian diamati sel hati yang mengekspresikan IL-17 di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali di 20 lapang pandang, dapat dilihat pada gambar 5.5 dan hasil perhitungan pada tabel 5.1. Sel yang mengekspresikan dan yang menjadi target menunjukkan sitoplasma berwarna coklat. Hasil pengamatan menunjukkan ekspresi sitokin IL-17 tereksprei pada sel-sel limfosit sebagai pensekresi IL-17, serta pada sel-sel target seperti : sel Kupffer, sel hepatosit dan *sinusoidal endothelial cell*. Pada penelitian ini, hanya ekspresi IL-17 pada sel limfosit sebagai pensekresi IL-17 saja yang dihitung.



Gambar 5.5 Ekspresi sitokin IL-17 pada sitoplasma sel limfosit jaringan hati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. (A) Ekspresi IL-17 jaringan hati tikus kontrol. (B) Ekspresi IL-17 jaringan hati tikus fibrosis derajat 1. (C) Ekspresi IL-17 jaringan hati tikus fibrosis derajat 2. (D). Ekspresi IL-17 jaringan hati tikus fibrosis derajat 3. Pada gambar ekspresi IL-17 tampak berwarna kecoklatan

Tabel 5.1 Rata-rata jumlah sel limfosit yang mengekspresikan IL-17 di jaringan hati tikus dengan perlakuan CCl₄ (± *Standard Deviation*)

Rerata Per 20 Lapang Pandang Jumlah Sel Limfosit Yang Mengekspresikan IL-17	Kontrol (Fibrosis Derajat 0)		Perlakuan 1 (Fibrosis Derajat 1)		Perlakuan 2 (Fibrosis Derajat 2)		Perlakuan 3 (Fibrosis Derajat 3)	
	1	0.30	1	0.15	1	2.30	1	4.30
2	0.40	2	0.50	2	1.85	2	3.45	
3	0.25	3	1.25	3	4.00	3	5.05	
4	0.15	4	0.30	4	1.85	4	7.10	
5	0.60	5	1.25	5	3.85	5	5.00	
Mean±SD	0.34 ± 0.171		0.69± 0.526		2.77 ± 1.07		4.98 ±1.351	

Tabel 5.1 menunjukkan rata-rata jumlah sel limfosit yang mengekspresikan IL-17 dari 5 sampel setiap kelompok perlakuan. Dapat dilihat bahwa rata-rata tertinggi ada pada kelompok fibrosis derajat 3 dikarenakan jumlah sel limfosit yang mengekspresikan IL-17 lebih tinggi pada kelompok ini.

5.2 Analisis Data

Hasil pengamatan di hitung menggunakan program SPSS 16 for windows dengan menerapkan uji *One-Way ANOVA*, uji *Tukey* dalam *Post-Hoc Test* dan uji Korelasi. Syarat agar uji *One-Way ANOVA* boleh di lakukan, data harus lolos uji normalitas dan uji homogenitas.

5.2.1 Uji Normalitas Data

Uji normalitas di lakukan untuk mengetahui normal atau tidaknya distribusi data yang didapatkan. Metode uji normalitas yang digunakan adalah metode *Kolmogorov-Smirnov*, dimana suatu data dikatakan memiliki sebaran

normal jika $p > 0,05$. Berdasarkan uji *Kolmogorov-Smirnov* didapatkan bahwa data untuk semua kelompok memiliki sebaran normal dengan $p > 0,05$, sehingga p diterima dan disimpulkan data variabel tersebut menyebar mengikuti sebaran normal. Untuk hasil uji normalitas dapat dilihat di pada Lampiran 1.

5.2.2 Uji Homogenitas Varian

Setelah mengetahui bahwa data terdistribusi normal, selanjutnya menentukan apakah data penelitian memiliki varian yang berbeda atau tidak dengan menggunakan uji homogenitas. Pada uji homogenitas, data dikatakan memiliki varian yang normal bila nilai signifikansi $p > 0,05$. Pada tabel uji homogenitas didapatkan bahwa data memiliki varian yang sama ($p > 0,05$) dengan nilai $p = 0,063$. Hasil uji homogenitas dapat dilihat pada Lampiran 1.

5.2.3 Uji One Way ANOVA

Setelah diketahui data penelitian dengan sebaran yang normal serta varian yang homogen maka dapat dilakukan uji One Way ANOVA. Dari hasil uji ANOVA diperoleh nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat sedikitnya dua kelompok data yang mempunyai perbedaan bermakna. Hasil selengkapnya dapat dilihat di Lampiran 1.

5.2.4 Uji *Post Hoc Multiple Comparison*

Untuk mengetahui dan membandingkan lebih spesifik masing-masing kelompok yang memiliki beda rata-rata secara nyata atau signifikan ($p < 0,05$) maka di lakukanlah analisis *Tukey* dalam *Post Hoc Test*. Berdasarkan uji tersebut didapatkan perbedaan yang bermakna pada fibrosis derajat 2 yang dibandingkan dengan kelompok kontrol maupun derajat 1. Didapatkan pula perbedaan yang bermakna pada fibrosis derajat 3, dibandingkan dengan kontrol,

fibrosis derajat 1, dan fibrosis derajat 2 ($p < 0,05$). Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 1.

5.2.5 Uji Korelasi

Uji korelasi bertujuan untuk mengetahui hubungan antara derajat fibrosis terhadap ekspresi IL-17 pada limfosit jaringan. Dari uji korelasi, tampak bahwa nilai $p=0,000$ ($p<0,05$) dengan nilai korelasi positif sebesar 0,883. Hasil ini menunjukkan korelasi yang kuat dan searah, artinya semakin tinggi derajat fibrosis, maka semakin tinggi ekspresi IL-17 pada limfosit jaringan hati. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 1.



BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk melihat adanya hubungan antara derajat fibrosis hati dengan ekspresi sitokin IL-17 pada limfosit jaringan hati tikus. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah derajat fibrosis, sedangkan variabel tergantung adalah ekspresi IL-17 pada limfosit jaringan. Pada penelitian ini digunakan 20 tikus yang dikelompokkan berdasarkan perbedaan derajat fibrosisnya, yaitu derajat 1, derajat 2, derajat 3, serta kelompok kontrol. Untuk melihat ekspresi IL-17 jaringan, dilakukan pengecatan imunohistokimia dengan antibodi IL-17, dan dihitung jumlah limfosit yang mengekspresikan IL-17 pada 20 lapang pandang (perbesaran 400 X).

Pada Tabel 5.1 didapatkan data rata-rata per lapang pandang jumlah sel limfosit yang mengekspresikan IL-17, pada data tersebut terlihat bahwa kelompok kontrol memiliki nilai rata-rata ekspresi IL-17 pada limfosit terendah yaitu sebesar 0,34, dan semakin lama semakin meningkat seiring dengan peningkatan derajat fibrosis hati, sampai pada rata-rata tertinggi pada kelompok fibrosis derajat 3 sebesar 4,98. Setelah diketahui ada peningkatan rata-rata ekspresi IL-17 pada sel limfosit jaringan pada setiap kelompok, peningkatan tersebut dianalisa apakah merupakan peningkatan yang berarti (signifikan) atau tidak. Karena data penelitian ini homogen ($p > 0,05$ uji homogenitas) serta berdistribusi normal ($p > 0,05$ uji *Kolmogorov-Smirnov*) maka dilakukan uji ANOVA. Pada uji ANOVA didapatkan $p < 0,05$, yang menunjukkan bahwa ada

perbedaan nilai yang signifikan pada minimal 2 kelompok data ekspresi IL-17. Pada uji *Post Hoc Multiple Comparison* didapatkan perbedaan nilai ekspresi IL-17 yang bermakna ($p < 0,05$) pada kelompok fibrosis derajat 2 dibandingkan dengan kontrol dan kelompok fibrosis derajat 1. Peningkatan yang bermakna juga didapatkan pada fibrosis derajat 3 dibandingkan dengan kontrol, kelompok fibrosis derajat 1 dan fibrosis derajat 2. Selain itu dari hasil uji korelasi didapatkan nilai korelasi yang positif sebesar 0,883. Dari hasil analisa data tersebut, bisa diambil kesimpulan bahwa ada hubungan yang positif antara derajat fibrosis hati tikus dengan ekspresi IL-17 jaringan hati.

Dalam penelitian ini, inflamasi kronik untuk mendapatkan fibrosis hati dilakukan dengan induksi CCl₄. CCl₄ yang diberikan terus menerus akan terus bereaksi menjadi radikal bebas (Tomasi *et al*, 1987) yang artinya akan terus terjadi kerusakan di hepatosit sehingga menimbulkan inflamasi kronis yang akan mengarah pada fibrogenesis hati. Pada saat inflamasi, CD4⁺ akan berdiferensiasi menjadi subset-subset tertentu. Diferensiasi dari CD4⁺ T ini dapat menjadi Th-1, Th-2, T-reg dan Th-17, tergantung pada sitokin utama yang menginduksi diferensiasi tersebut. Jika terdapat induksi dari sitokin IL-6, IL-21, IL-23, dan TGF- β , maka akan terjadi diferensiasi dari T naif menjadi Th-17, subset CD4⁺ yang baru 1 dekade terakhir ini ditemukan. Sitokin ini akan mengaktifasi sinyal *transducer and activator of transcription-3 (STAT3)* dependent IL-21 dan IL-23, yang akan menginduksi ekspresi dari reseptor *retinoid-related orphan receptor gamma t (ROR γ t)*. Induksi ROR γ t inilah yang berperan dalam perkembangan Th-17 hingga bisa mensekresi IL-17(A), IL-17F, IL-21, IL-22. (Lafdil *et al*, 2010)

Pada inflamasi hati, IL-17 yang disekresikan tersebut akan memberikan efek pro-fibrogenik. Ada 2 mekanisme yang mendasari efek fibrogenik dari IL-17. Mekanisme pertama yaitu IL-17 akan menstimulasi sel Kupffer untuk mengekspresikan sitokin-sitokin inflamatori seperti : IL-6, IL-1 β , TNF- α , serta sitokin pro-fibrogenik kuat TGF- β 1, yang akan memicu aktivasi *Hepatic Stellate Cell* (HSC) menjadi fenotip miofibroblast. Selain itu, sel Kupffer memproduksi ROS yang akan membuat injuri pada hepatosit semakin *massive*. Mekanisme kedua, IL-17 secara langsung juga akan mengaktivasi *Hepatic Stellate Cell* (HSC) menjadi fenotip miofibroblast, yang akan mengekspresikan matriks ekstraseluler seperti kolagen (Tipe I, III, dan IV), proteoglikan (dekorin, biglikan, lumikan, agrekan), dan glikoprotein (fibronektin, laminan, tenaskin, dan unduin), sehingga terjadi penimbunan matriks ekstraseluler di ruang Disse (Meng *et al*, 2012).

Mekanisme diatas dapat mendasari hasil penelitian yang menunjukkan adanya hubungan antara peningkatan derajat fibrosis dengan peningkatan ekspresi IL-17 pada limfosit jaringan hati. Namun, pada hasil uji *post hoc* didapatkan peningkatan IL-17 yang tidak signifikan pada kelompok fibrosis derajat 1 terhadap kelompok kontrol derajat 0, tetapi terdapat peningkatan ekspresi IL-17 yang signifikan pada kelompok perlakuan fibrosis derajat 2, dan fibrosis derajat 3. Hal ini mungkin disebabkan oleh IL-17 berhubungan erat dengan inflamasi kronis, dimana IL-17 akan optimal disekresi pada inflamasi atau injuri hati yang berulang dan berlangsung lama.

Dari hasil penelitian serta hasil analisa diatas, dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang bermakna antara derajat fibrosis hati dengan peningkatan ekspresi IL-17 pada limfosit jaringan hati. Namun masih perlu

dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mempelajari lebih dalam peran IL-17 serta faktor-faktor yang dapat mempengaruhi ekspresi IL-17 pada proses fibrosis hati.



BAB 7**PENUTUP****7.1 Kesimpulan**

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah :

1. Didapatkan hubungan positif yang bermakna antara ekspresi IL-17 pada limfosit jaringan hati dengan derajat fibrosis hati pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang dipapar dengan karbon tetraklorida (CCl₄).
2. Ekspresi Interleukin-17 pada limfosit jaringan hati dapat menggambarkan derajat fibrosis hati tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) yang dipapar dengan karbon tetraklorida (CCl₄).

7.2 Saran

Adapun saran yang dapat peneliti berikan dari penelitian ini, adalah :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang IL-17 sebagai parameter fibrosis hati yang mungkin di masa depan bisa dijadikan bahan pemeriksaan penunjang pada keadaan fibrosis hati
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai IL-17 sebagai target terapi, karena dari penelitian ini didapatkan IL-17 juga dapat memicu terjadinya fibrosis hati.



DAFTAR PUSTAKA

- Anom, T., Wibawa, I. 2010. Pendekatan Diagnosis dan Terapi Fibrosis Hati. *Jurnal Penyakit Dalam*, Volume 11 nomor 1.
- Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. 2005. *Toxicological Profile for Carbon Tetrachlorida* (Update). Atlanta, GA: U.S. Department of Public Health and Human Services, Public Health Service. Diakses 13 desember 2013.
<<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=196&tid=35>>
- Bachri, M. 2011. Efek Hepatoprotektif Ekstrak Metanol Jahe Merah (*Zingiber officinale Roscoe*) Pada Mencit yang Diinduksi CCl₄. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, Vol 1, No. 2, 2011 : 35 – 41.
- Balanescu, P., Ladaru, A., Voiosu, T., Nicolau, A., Ene, M., Balanescu, E. 2012. Th17 and IL-17 Immunity in Chronic Hepatitis C Infection. *Journal internal medicine*, 50(1)13–8.
- Baranova, A., Priyanka, L., Biredinc, A., Younossi, Z. 2011. Non-Invasive markers for hepatic fibrosis. *BMC Gastroenterology*, 11:91.
- Chang, S., Park, H., Dong, S. 2006. Act1 Adaptor Protein Is An Immediate and Essential Signaling Component of Interleukin-17 Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281:35603-35607.
- Delaware Health and Social Services. 2009. Carbon Tetrachloride. diakses : 16 desember 2013. <<http://dhss.delaware.gov/dph/files/cartetrafaq.pdf>>
- Du, Wen., Zhen, Jun., Zeng, Zhao., Zheng, Zhao., Xu, Yan., Qin, Lai., et al. 2013. Expression of Interleukin 17 Associated with Disease Progression and Liver Fibrosis with Hepatitis B Virus : IL-17 in HBV Infection. *Diagnostic Pathology* 2013, 8-40.
- Hidayati, N. 2007. *Efek Protektif Teripang Pasir (Holothuria scabra) Terhadap Hepatotoksistas yang Diinduksi Karbon Tetraklorida (CCl₄)*, <http://www.fk.unair.ac.id/attachments/527_JURNAL-IKD-090610060M-Nurhidayati.pdf>
- Friedman S.L. 2010. Evolving Challenges in Hepatic Fibrosis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* : 7, 425–436.
- Goodman D.Z. 2007. Grading and Staging Systems for Inflammation and Fibrosis in Chronic Liver Diseases. *Journal of Hepatology*. Diakses 13 Desember 2013. <[http://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(07\)00402-3/fulltext](http://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(07)00402-3/fulltext)>
- Hajar, S. 2012. *Skor APRI pada Fibrosis hati yang Dibandingkan dengan Fibroscan*. Tesis. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara, Medan.

- Hammerich, L., Heymann, F., Tacke, F. 2011. Role of IL-17 and Th17 Cells in Liver Diseases in Liver Disease. T. Nakayama (Ed), *Clinical and Developmental Immunology*, Volume 2011, Article ID 345803.
- Hariyanto, M. 2013. Pengaruh Pemberian Buah Melon (*Cucumis melo L.*) Personde Terhadap Gambaran Histopatologi Zona Sentrilobular Hepar Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar yang Diinduksi dengan CCl₄ (Karbon Tetraklorida). Diakses 10 Desember 2013. <<http://event-archives.litbang.depkes.go.id/jspui/bitstream/123456789/193/1/Majalah%20beny.pdf>>
- Ismail M.H. 2011. Reversal of Liver Fibrosis A Review. *Liver Biopsy in Modern Medicine*.
- Junieva, P. 2006. Pengaruh Pemberian Ekstrak Meniran (*Phyllanthus sp.*) terhadap Gambaran Mikroskopik Paru Tikus Wistar yang Diinduksi Karbon Tetraklorida. Artikel Ilmiah. Fakultas kedokteran. Universitas Diponegoro. Semarang : Diakses 16 desember 2013. <eprints.undip.ac.id/21001/1/Pramavita.pdf>
- Lafdil, F., Miller, A., Ki, S., Gao, B. 2010. Th17 Cells and Their Associated Cytokines in Liver Diseases. *Cellular & Molecular Immunology*. (2010) 7, 250–254.
- Li, L., Hu, Z., Li, W., Hu, M., Ran, J., Chen, P., Sun, Q. 2012. Establishment of a Standardized Liver Fibrosis Model with Different Pathological Stages in Rats. *Gastroenterology Research and Practice*, Volume 2012, Article ID 560345.
- Meng, F., Wang, K., Aoyama, T., Grivennikov, S., Paik, Y., Scholten, D., et al. 2012. IL-17 Signaling in Inflammatory Cells, Kupffer cells and Hepatic Stellate Cells Exacerbates Liver Fibrosis. *Gastroenterology*, Volume 143, Issue 3, Pages 765–776.
- Mills, K. 2008. Induction, Function and Regulation of IL-17-producing T Cells. *European Journal Immunology*, 38: 2636–2649.
- Mormone, E., George J., Nieto, N. 2011. Molecular Pathogenesis of Hepatic Fibrosis and Current Therapeutic Approaches. *NIH Public Access*. Diakses 13 Desember 2013. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3171510/>>
- Moreira, R. 2007. Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine Vol. 131 No. 11*, pp 1728 – 1734.
- Moseley T., Haudenschild D., Rose L., Reddi A. 2003. Interleukin-17 Family and IL-17 Receptors. *Cytokine & Growth Factor Review*, Volume 14, Issue 2, Pages 155–174.
- Musthofiyah, H. 2008. Pengaruh Pemberian Buah Pepaya (*Carica papaya*) Terhadap Kadar Enzim Transaminase GOT-GPT dan Gambaran Histologi Hepar Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Karbontetraklorida (ccl₄). Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi.

Universitas Islam Negeri Malang. Diakses tanggal 16 desember 2013.
< lib.uin-malang.ac.id/?mod=th_detail&id=04520037>

Nauveau, S., Gaude, G., Asnacios, A., Agostini, H., Abella, A., Barriova, N., *et al.* 2009. Diagnostic and Prognostic Value of Noninvasive Biomarkers of Fibrosis in Patient with Alcoholic Liver Disease. *Hepatology*, Volume 49, Issue 1, pages 97–10.

Rockey, J. 2008. Current and Future Anti-fibrotic Therapies for Chronic Liver Disease. *Clinics in Liver Disease*, Volume 12, Issue 4, pages 939-962.

Romagnani, S. 2008. Human Th17 cells. *Arthritis Research & Therapy*, 10 : 206.

Sentra Informasi Keracunan Nasional (SiKer Nas) Pusat Informasi Obat dan Makanan, Badan POM RI. 2013. Karbon Tetraklorida. Diakses 10 Desember 2013.
< <http://ik.pom.go.id/v2013/katalog/KARBON%20TETRAKLORIDA.pdf>>

Slater, T.F., 1984. Free Radical Mechanism in Tissue Injury. *Biochemical Journal*, 222: 1-15

Tan, Z., Qian, X., Jiang, R., Liu, Q., Wang, Y., Chen, C., *et al.* 2013. IL-17A Plays a Critical Role in The Pathogenesis of Liver Fibrosis through Hepatic Stellate Cell Activation. *The Journal of Immunology*. Diakses 8 Desember 2013. < <http://www.jimmunol.org/content/191/4/1835.long>>

Tomasi, A., Albano, E., Banni, S., Botti, B., Corongiu, F., Dessi, M., *et al.* 1987. Free-radical Metabolism of Carbon Tetrachloride in Rat Liver Mitochondria. *Biochemical Journal*. Volume 246, p. 313-317.

United States Environmental Protection Agency. 2000. Carbon Tetrachloride. Diakses 16 desember 2013.
<<http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/carbonte.html>>

Wang, L., Chen, S., Xu, K. 2010. IL-17 Expression is Correlated with Hepatitis B-related Liver Diseases and Fibrosis. *International Journal of Molecular Medicine*, Volume 27 Issue 3, p. 385-392.

Witowska, J., Ksiazek, K., Jorres, A. 2003. Interleukin-17: a Mediator of Inflammatory Responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Volume 61, p. 567-579.

Lampiran 1. Hasil Statistik Penelitian

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Ekspresi	Kelompok
N		20	20
Normal Parameters ^a	Mean	2.1950	2.5000
	Std. Deviation	2.07852	1.14708
Most Extreme Differences	Absolute	.179	.169
	Positive	.179	.169
	Negative	-.163	-.169
Kolmogorov-Smirnov Z		.799	.754
Asymp. Sig. (2-tailed)		.546	.621

a. Test distribution is Normal.

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

Ekspresi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.982	3	16	.063

ANOVA

Ekspresi	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	68.964	3	22.988	28.034	.000
Within Groups	13.120	16	.820		
Total	82.084	19			



Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Ekspresi

Tukey HSD

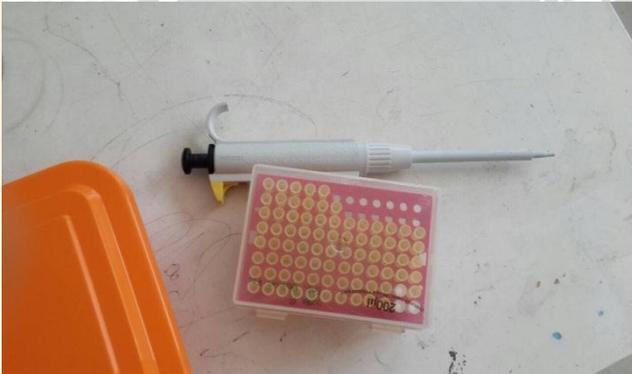
(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	Derajat Fibrosis 1	-.35000	.57271	.927	-1.9885	1.2885
	Derajat Fibrosis 2	-2.43000*	.57271	.003	-4.0685	-.7915
	Derajat Fibrosis 3	-4.64000*	.57271	.000	-6.2785	-3.0015
Derajat Fibrosis 1	Kontrol Negatif	.35000	.57271	.927	-1.2885	1.9885
	Derajat Fibrosis 2	-2.08000*	.57271	.011	-3.7185	-.4415
	Derajat Fibrosis 3	-4.29000*	.57271	.000	-5.9285	-2.6515
Derajat Fibrosis 2	Kontrol Negatif	2.43000*	.57271	.003	.7915	4.0685
	Derajat Fibrosis 1	2.08000*	.57271	.011	.4415	3.7185
	Derajat Fibrosis 3	-2.21000*	.57271	.007	-3.8485	-.5715
Derajat Fibrosis 3	Kontrol Negatif	4.64000*	.57271	.000	3.0015	6.2785
	Derajat Fibrosis 1	4.29000*	.57271	.000	2.6515	5.9285
	Derajat Fibrosis 2	2.21000*	.57271	.007	.5715	3.8485

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Correlations

Correlations			
		Ekspresi	Kelompok
Ekspresi	Pearson Correlation	1	.883**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	15	15
Kelompok	Pearson Correlation	.883**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	15	15

Lampiran 2. Dokumentasi Kegiatan



Lampiran 3. Daftar Berat Badan Tikus

KELOMPOK	MINGGU KE-												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1	230	230	260	283								
	2	240	265	290	310				DUA MINGGU				
	3	235	240	261	263								
	4	232	232	250	275								
C	1	232	240	256	270	270	274	272					
	2	235	241	258	278	271	269	278			LIMA MINGGU		
	3	256	266	286	295	309	321	338					
	4	235	235	253	270	287	288	282					
H	1	238	248	273	291	302	297	303	284	296	314	324	
	2	240	245	265	275	278	284	297	302	308	320	328	SEMBILAN MINGGU
	3	235	245	269	290	296	289	292	291	300	310	301	
L	1	232	237	260	260	273	273	259					
	2	231	240	254	295	262	261	274			LIMA MINGGU		
	3	250	268	283	260	314	314	316					
N	1	230	235	251	257								
	2	234	240	251	247				DUA MINGGU				
	3	230	232	238	249								
O	1	240	255	275	282	271	302	310	324	329	310	349	
	2	233	243	273	287	292	289	294	286	290	345	302	SEMBILAN MINGGU
	3	243	253	264	268	264	262	260	265	262	300	270	
	4	230	232	252	268	272	279	284	280	289	268	297	
Q	1	230	234	243	263	253	261	282			LIMA MINGGU		
	2	234	234	241	249	275	254	267					
	3	232	232	238	249				DUA MINGGU				
	4	230	230	237	237								
R	1	240	261	265	271	275	279	289	296	301	318	254	SEMBILAN MINGGU
	2	238	251	267	284	290	296	293	298	304	300	298	

Lampiran 4 Daftar Sisa Makan Tikus (gram)

Tanggal	Kandang Tikus							
	A	C	H	L	N	O	Q	R
18 Maret	0	5	0	0	10	14	0	0
19 Maret	4	0	0	0	6	9	0	2
20 Maret	0	0	3	2	4	8	4	8
21 Maret	8	9	7	0	0	4	7	0
24 Maret	10	6	10	11	4	6	4	7
25 Maret	0	3	8	12	7	9	10	12
26 Maret	7	9	14	10	12	10	2	5
27 Maret	5	10	12	15	19	21	16	15
28 Maret	13	17	21	15	8	25	19	22
31 Maret	0	14	28	20	10	30	20	24
1 April	17	31	31	25	21	37	23	26
2 April	20	27	33	24	28	27	25	38
3 April	28	49	35	29	16	31	17	13
4 April	24	50	27	31	32	39	39	39
7 April	31	37	28	32	41	43	36	32
8 April	30	46	36	38	60	40	40	35
9 April	46	50	29	42	70	55	37	40
10 April	58	60	24	57	90	60	40	60
11 April	15	50	20	35	68	50	42	46
14 April		39	46	51		56	48	43
15 April		44	47	57		53	30	49
16 April		50	75	60		65	40	38
17 April		32	66	43		45	39	41
18 April		44	45	37		36	17	30
21 April		32	48	25		29	23	37
22 April		17	19	20		20	20	15
23 April		26	33	56		25	14	11
24 April		31	36	37		18	19	24
25 April		37	40	48		36	25	31
28 April		30	49	24		40	12	24
29 April		40	53	50		35	10	8
30 April		38	75	62		24	17	21
1 Mei		34	70	67		29	38	30
2 Mei		47	61	55		16	21	26
5 Mei			50			32		29
6 Mei			49			31		20
7 Mei			41			39		23
8 Mei			54			42		14
9 Mei			55			43		13
12 Mei			68			41		27
13 Mei			65			39		29

14 Mei			54			37		31
15 Mei			50			48		20
16 Mei			49			53		24
19 Mei			78			55		33
20 Mei			50			57		32
21 Mei			55			46		15
22 Mei			54			38		22
23 Mei			50			48		16
26 Mei			49			61		19
27 Mei			48			58		27
28 Mei			71			71		22
29 Mei			69			39		20
30 Mei			65			50		30

