

repository.ub.ac.id

Pengaruh Lama Pemberian Kurkumin terhadap Penurunan Ekspresi TGF- β Jaringan Hati pada Tikus Model Fibrosis Akibat Induksi Karbon Tetraklorida (CCl₄)

Ahmad Ikbali*, Supriono**, Wisnu Barlianto***

*Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

**Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

***Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

ABSTRAK

TGF- β atau *Transforming Growth Factor* β adalah sitokin yang paling berperan dalam fibrosis hati. Injuri hepatosit mengaktifasi TGF- β dan TGF- β memediasikan *hepatic stellate cell* (HSC) serta mengaktifasi fibroblas untuk penyembuhan injuri hepatosit, termasuk pembentukan miofibroblas dan deposisi matriks ekstraseluler, sehingga terjadi kondisi fibrosis hati. Kurkumin telah terbukti memiliki efek hepatoprotektif karena kandungan antioksidannya dapat menekan stres oksidatif serta menghambat perubahan HSC menjadi miofibroblas, sehingga dapat menekan produksi TGF- β . Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama pemberian kurkumin terhadap penurunan ekspresi TGF- β jaringan hati pada tikus model fibrosis akibat paparan CCl₄ pada minggu ke-2, 5, dan 9. Sampel adalah tikus Wistar jantan yang dibagi menjadi 8 kelompok, terdiri dari kontrol negatif (KN), kontrol positif (KP), kelompok perlakuan dengan lama pemberian kurkumin selama 2 minggu (KP2) dan kelompok kontrolnya (KK2), kelompok perlakuan dengan pemberian kurkumin selama 5 minggu (KP5) dan kelompok kontrolnya (KK5), kelompok perlakuan dengan pemberian kurkumin selama 9 minggu (KP9) dan kelompok kontrolnya (KK9). Dari hasil penghitungan, didapatkan rerata ekspresi TGF- β jaringan hati sebagai berikut (sel), KN = 4,4; KP = 36,825; KP2 = 4,3; KK2 = 65,375; KP5 = 7,575; KK5 = 94,525; KP9 = 22,225; dan KK9 = 22,525. Dari hasil penelitian ini, didapatkan perbedaan yang bermakna antara 8 kelompok perlakuan ini (*one way ANOVA* $p=0,000$). Uji korelasi *Pearson* menunjukkan bahwa terdapat korelasi negatif antara lama pemberian kurkumin dengan penurunan ekspresi TGF- β jaringan hati dengan angka koefisien korelasi sebesar 0,741 dan angka signifikansinya sebesar 0,006. Uji regresi linier menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh sebesar 54,8% terhadap penurunan ekspresi TGF- β jaringan hati. Kesimpulan dari penelitian ini adalah semakin lama pemberian kurkumin, semakin kecil penurunan ekspresi TGF- β jaringan hati.

Kata Kunci: Fibrosis hati, Karbon tetraklorida, Kurkumin, TGF- β , *Transforming Growth Factor* β .

ABSTRACT

TGF- β or *Transforming Growth Factor* β is cytokine that has the most major role in liver fibrosis. The injury of hepatocyte gives stimulus to TGF- β activation and it mediates hepatic stellate cell (HSC), activates fibroblast for hepatocyte healing, including myofibroblast formation and extracellular matrix deposition, so that liver fibrosis is occurred. Curcumin is proven for its hepatoprotective effect produced by its antioxidant composition able to suppress oxidative stress, inhibit the transformation of HSC into myofibroblast, and results in the suppression liver tissue TGF- β expression. This study is aimed to test the effect of the duration of curcumin therapy on the decreased expression of TGF- β in rat's liver tissue induced by carbon tetrachloride in week-2, 5, and 9 of curcumin administration. Samples are taken from male Wistar rat which is divided into 8 groups that consist of negative control (KN), positive control (KP), the curcumin-given treatment group for 2 weeks (KP2) and it's

control (KK2), the curcumin-given treatment group for 5 weeks (KP5) and its control (KK5), and the curcumin-given treatment group for 9 weeks (KP9) and its control (KK9). The results of quantification are as follows (cell), KN = 4,4; KP = 36,825; KP2 = 4,3; KK2 = 65,375; KP5 = 7,575; KK5 = 94,525; KP9 = 22,225; dan KK9 = 22,525. The result of this experiment shows that there is a significant difference between the 8 groups of samples (One Way ANOVA $p=0,000$) with normal and homogenous data distribution. Pearson correlation shows that there is a negative correlation between the duration of curcumin treatment and the decreasing expression of TGF- β in rat's liver tissue, with correlation coefficient in the amount of 0,741 and significancy in the amount of 0,006. Linear regression test shows that the treatment gives 54,8% contribution to the decreasing of TGF- β 's expression in liver tissue. In conclusion, the longer of duration of curcumin therapy given, the smaller amount of decreasing TGF- β 's expression in rat's liver tissue will be.

Keywords: Liver fibrosis, Carbon tetrachloride (CCl₄), Curcumin, TGF- β , *Transforming Growth Factor β* .

PENDAHULUAN

Fibrosis hati merupakan suatu kondisi persisten penyembuhan luka jaringan hati akibat penyakit hati yang kronis. Stadium akhir dari fibrosis hati merupakan sirosis hati yang terjadi akibat respon terhadap virus dan metabolit toksik yang mengganggu kerja hati.¹ Penyebab terjadinya fibrosis hati yang tersering antara lain hepatitis B kronis, hepatitis C kronis, penyakit hati alkoholik, dan penyakit hati non alkoholik.² Fibrosis hati yang terjadi dalam waktu yang lama dapat menimbulkan sirosis hati yang dapat berujung pada kematian akibat komplikasinya, antara lain gagal hati progresif, komplikasi yang terkait dengan hipertensi porta, atau timbulnya karsinoma hepatoseluler.³

Selain itu, dalam progresi fibrosis hati, sitokin-sitokin diekspresikan oleh sel-sel yang rusak, salah satunya adalah TGF- β , yang paling berperan dalam fibrosis hati. TGF- β berperan pada penyakit hati kronis yang berkontribusi dalam setiap stadium progresi penyakit hati yakni inflamasi, fibrosis, sirosis, hingga kanker hati. Aktivasi TGF- β membuat destruksi hepatosit dan memediasikan *hepatic stellate cell* dan aktivasi fibroblas untuk penyembuhan, termasuk pembentukan miofibroblas dan deposisi matriks ekstraseluler.¹ Penatalaksanaan dengan hepatoprotektor saat ini sudah sering dilakukan, dan obat golongan hepatoprotektor sudah banyak beredar di Indonesia. Penggunaan

hepatoprotektor bertujuan untuk menjaga fungsi sel-sel hati dan membantu mempercepat penyembuhan.⁴ Namun, sejauh ini belum ada protokol mengenai lama pemberian yang jelas mengenai penggunaan zat-zat hepatoprotektor untuk menghentikan progresivitas fibrosis hati.

Salah satu contoh zat hepatoprotektor yang digunakan dalam klinik adalah zat pewarna kuning yang terkandung dalam rimpang *Curcuma longa* Linn (*Zingiberaceae*), yaitu kurkumin. Mekanisme hepatoprotektif ini terjadi karena kurkumin menghambat aktivasi *hepatic stellate cell* (HSC) dan fibrogenesis, induksi apoptosis HSC, serta kandungan antioksidan pada kurkumin mampu menangkap ion superoksida dan memutus rantai antarion superoksida, sehingga dapat mencegah kerusakan sel hepar, menekan proses inflamasi, sehingga diharapkan ekspresi TGF- β jaringan hati dapat menurun.^{5, 6} Penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa pemberian kurkumin selama 6 minggu dapat menghambat ekspresi TGF- β jaringan hati tikus fibrosis akibat paparan CCl₄.⁷ Namun, belum ada penelitian yang membandingkan pengaruh lama pemberian kurkumin terhadap penurunan TGF- β jaringan hati pada tikus model fibrosis pada beberapa rentang waktu, oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh lama pemberian kurkumin terhadap penurunan ekspresi TGF- β jaringan hati pada tikus model fibrosis akibat paparan CCl₄ pada beberapa rentang waktu.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan secara eksperimental laboratorik secara *in vivo* dengan rancangan *Randomized Post Test Only Control Group Design*. Pada desain penelitian ini tidak dilakukan pre test. Sampel penelitian adalah tikus *strain* Wistar jantan umur 2 bulan, dengan berat badan 150-170 gram sebanyak 48 ekor yang diperoleh dari dan dirawat di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sampel dibagi menjadi 8 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (KN) yang diinjeksi NaCl 0,9% 1cc/kgBB i.p., kelompok kontrol positif (KP) yang diinjeksi CCl₄ 10% 1 cc/kgBB i.p., kelompok perlakuan yang diberikan kurkumin 200 mg/kgBB/hari p.o. 2 minggu (KP2), kelompok kontrol perlakuan yang diberikan CMC Na 1%/hari p.o. selama 2 minggu (KK2), kelompok perlakuan 5 minggu (KP5), kelompok kontrol perlakuan 5 minggu (KK5), kelompok perlakuan 9 minggu (KP9), kelompok kontrol perlakuan 9 minggu (KK9). Variabel yang diukur adalah ekspresi TGF- β 1 jaringan hati dengan imunohistokimia.

Pewarnaan Imunohistokimia

Pengukuran ekspresi TGF- β 1 jaringan hati dilakukan menggunakan metode pengecatan imunohistokimia yang dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Metode imunohistokimia dilakukan sesuai dengan petunjuk yang diberikan oleh pabrik. Kit imunohistokimia yang digunakan adalah *Novolink Polymer Detection System* (500 tests) RE7150-K LOT 6027995 dari *Leica Biosystem*. Sebelum proses pewarnaan, setiap sediaan preparat dideparaffinasi dengan *xylene* selama 15 menit dan direhidrasi dengan alkohol yang konsentrasinya diencerkan menjadi 90%, 80%, 70%, dan 60% selama masing-masing 10 menit. Sediaan kemudian dicuci dengan H₂O sebanyak 2 kali selama 5 menit dan diinkubasi dengan larutan *phosphate-buffered saline* (PBS) selama 5 menit.

Setelah terehidrasi, potongan paraffin 4 μ m pada objek glass diinkubasi dalam hidrogen peroxide 3% untuk memblokir aktivitas peroxidase endogen. Antibodi tikus monoklonal antihuman TGF- β 1 bereaksi dengan bentuk monomeric dan dimeric TGF- β 1 yang tersedia sebagai larutan 1:500 (dilusi didalam bovine serum albumin 3%) dan diinkubasi pada suhu 4°C satu malam. Setelah 5 menit dicuci di dalam PBS, slide dilindungi oleh *goat antimouse IgG horseradishperoxidase-labeled* antibodi sekunder pada larutan 1:500 (dilusi dalam bovine serum albumin 3%) selama 30 menit pada suhu ruangan. Lalu, ikatan antibody terdeteksi dengan *staining kit*. Setelah itu, slide dicat dengan menggunakan *diaminobenzidine*, dicuci, dicat dengan *Mayer's hematoxylin*, didehidrasi 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 dicelupkan kedalam *xylene* selama 5 menit.

Pengukuran Ekspresi TGF- β Jaringan

Ekspresi TGF- β yang dianalisis adalah TGF- β 1 jaringan hati dari pengecatan imunohistokimia dengan metode *hot spot*, menghitung rata-rata jumlah bintik berwarna kecoklatan pada seluruh preparat imunohistokimia. Adanya bintik berwarna coklat ini merupakan gambaran dari ekspresi TGF- β 1 yang diakibatkan oleh adanya ikatan antara antigen jaringan dengan antibodi yang diberikan dalam proses pembuatan preparat imunohistokimia untuk mengamati ekspresi TGF- β 1. Jumlah lapangan pandang pada pengamatan adalah 10 dengan perbesaran 400x

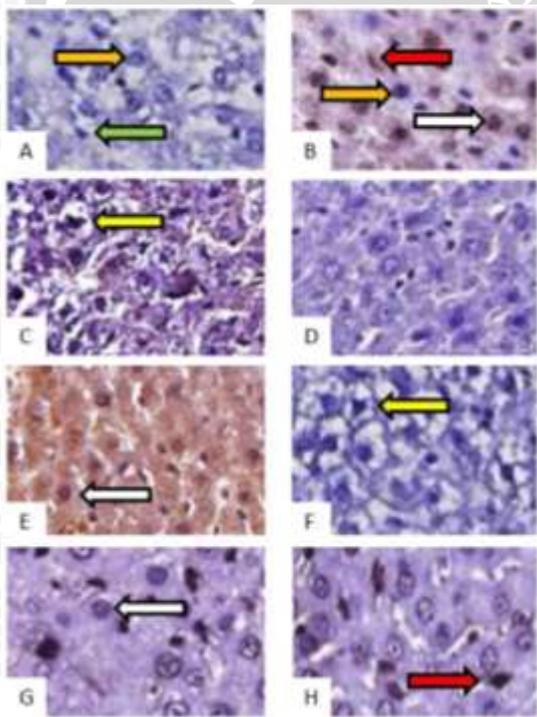
Pengolahan Data

Hasil pengukuran tikus kontrol dan perlakuan dianalisis secara statistik dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Pada awalnya data diuji menggunakan uji normalitas dan homogenitas varian. Apabila data berdistribusi normal dan

homogen maka dilanjutkan dengan uji *one way ANOVA*, post hoc *Tukey*, dan korelasi *Pearson*. Namun apabila data tidak berdistribusi normal dan homogen atau tidak berdistribusi normal dan tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis*, post hoc *Mann Whitney*, dan korelasi *Spearman*. Untuk mengetahui seberapa besar pengaruh kurkumin terhadap ekspresi TGF- β jaringan hati, dilakukan pula uji regresi linier. Selain itu, dilakukan uji hipotesis komparatif (*t-test independent*) antara kelompok kontrol negatif dan kontrol positif untuk mengetahui perbedaan ekspresi TGF- β jaringan hati antara yang tidak diberikan CCl₄ dan diberikan CCl₄.

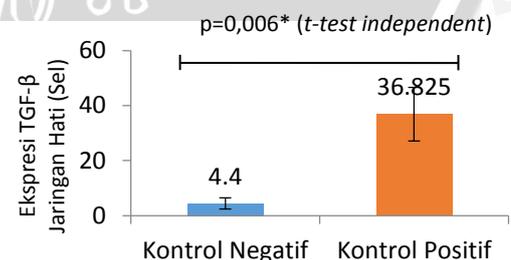
HASIL PENELITIAN

Dari hasil pengecatan imunohistokimia, didapatkan gambaran sebagai berikut,



Gambar 5.1 Ekspresi sitokin TGF- β jaringan hati tikus pada yang pemberian pelarut CCl₄ (A), pada pemberian CCl₄ (B), pada pemberian pelarut kurkumin selama 2 minggu (C), pada pemberian kurkumin selama 2 minggu (D), pada pemberian pelarut kurkumin selama 5 minggu (E), pada pemberian kurkumin selama 5 minggu (F), pada pemberian pelarut kurkumin selama 9 minggu (G), pada pemberian kurkumin selama 9 minggu (H). Pengecatan imunohistokimia diamati dengan mikroskop pada perbesaran 400x

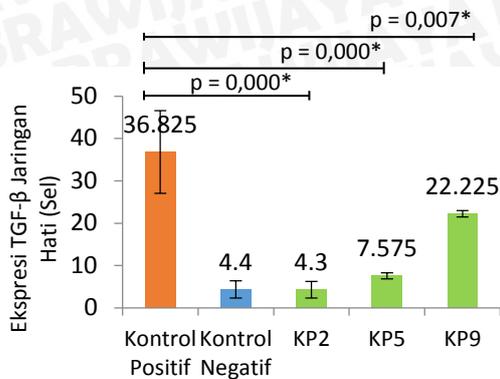
Berdasarkan Gambar 5.1, tampak kelompok kontrol positif yang diberikan CCl₄ tercatat lebih coklat dibandingkan kelompok kontrol negatif yang hanya diberikan NaCl 0,9%. Adanya bintik berwarna coklat ini merupakan gambaran dari ekspresi TGF- β 1 yang diakibatkan oleh adanya ikatan antara antigen jaringan dengan antibodi yang diberikan dalam proses pembuatan preparat imunohistokimia untuk mengamati ekspresi TGF- β 1. Kemudian, kelompok yang diberikan pelarut kurkumin CMC Na, yakni (C), (E), dan (G) tampak tercatat lebih coklat dibandingkan dengan kelompok yang diberikan kurkumin, yakni (D), (F), (H). Di antara 3 kelompok perlakuan yang diberikan kurkumin, kelompok perlakuan 2 minggu tampak paling bersih dibandingkan yang lainnya. Pada gambar (A), tanda panah oranye menunjukkan hepatosit yang normal dan tanda panah hijau muda menunjukkan *hepatic stellate cell* yang normal. Pada gambar (B), tanda panah oranye menunjukkan hepatosit yang normal, tanda panah putih menunjukkan hepatosit yang tercatat coklat, dan tanda panah merah menunjukkan *hepatic stellate cell* yang tercatat coklat. Pada gambar (C), tanda panah kuning menunjukkan sel yang mengalami *ballooning*, begitu pula pada gambar (F). Pada gambar (E) dan (H), tanda panah menunjukkan sel yang tercatat coklat, sedangkan pada gambar (G), tanda panah putih menunjukkan hepatosit yang normal karena tidak tercatat coklat.



Gambar 5.2 Grafik rerata ekspresi TGF- β Jaringan Hati pada Kelompok Kontrol Negatif dan Kontrol Positif. * $p < 0,05$: terdapat perbedaan yang signifikan

Berdasarkan Gambar 5.2, model fibrosis hati pada kelompok kontrol positif memiliki rerata ekspresi TGF- β jaringan

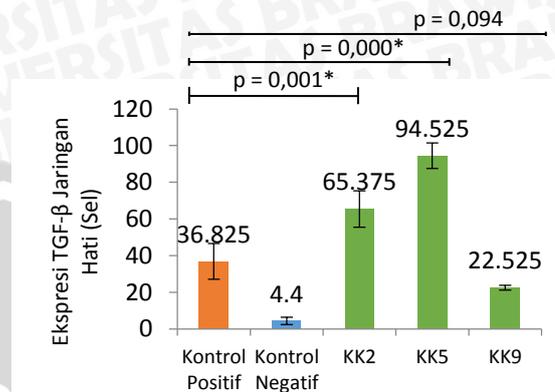
hati lebih tinggi dibandingkan dengan tikus kelompok kontrol negatif dengan rerata ekspresi TGF- β jaringan hati kontrol positif sebanyak 4,4 sel, sedangkan rerata ekspresi TGF- β jaringan hari kelompok kontrol negatif sebesar 36,825 sel.



Gambar 5.3 Grafik rerata ekspresi TGF- β jaringan hati pada kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 2 minggu (KP2), kelompok perlakuan 5 minggu (KP5), dan kelompok perlakuan 9 minggu (KP9) beserta nilai signifikansi antara kelompok kontrol positif dengan masing-masing kelompok perlakuan. * $p < 0,05$: terdapat perbedaan yang signifikan

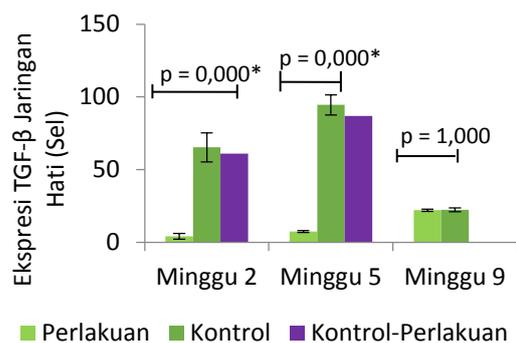
Berdasarkan gambar 5.3, terdapat perbandingan antara rerata ekspresi TGF- β jaringan hati kelompok kontrol positif dan negatif dengan kelompok perlakuan masing-masing minggu. Jika dibandingkan antara kontrol positif dengan kelompok perlakuan 2 minggu (KP2), dapat terlihat bahwa terdapat penurunan ekspresi TGF- β jaringan hati pada KP2 ($4,3 \pm 1,9408$ sel) dibandingkan dengan kontrol positif ($36,825 \pm 9,7449$ sel) dan penurunannya signifikan ($p=0,001$). Terlihat rerata ekspresi TGF- β jaringan hati pada KP2 hampir sama dengan kelompok kontrol negatif, dengan selisih 0,1 sel. Kemudian, jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan 5 minggu, terdapat perbedaan yang signifikan ($p=0,005$) antara ekspresi TGF- β jaringan hati jaringan hati KP5 ($7,575 \pm 0,6898$ sel) dengan ekspresi TGF- β jaringan hati kontrol positif, dan ekspresi TGF- β jaringan hati KP5 lebih tinggi dibandingkan dengan ekspresi TGF- β jaringan hati KP2. Sedangkan pada KP9, ekspresi TGF- β KP9 ($22,225 \pm 0,7588$ sel) lebih rendah dibandingkan dengan kontrol positif, lebih tinggi

dibandingkan dengan KP2, dan juga lebih tinggi dibandingkan dengan KP5.



Gambar 5.4 Grafik rerata ekspresi TGF- β jaringan hati kontrol positif, kelompok kontrol 2 minggu (KK2), kelompok kontrol 5 minggu (KK5), dan kelompok kontrol 2 minggu (KK9) beserta nilai signifikansi antara kelompok kontrol positif dengan masing-masing kelompok kontrol. * $p < 0,05$: terdapat perbedaan yang signifikan

Pada gambar 5.4, terlihat bahwa dari kontrol positif, kontrol negatif, kelompok kontrol 2 minggu (KK2), kelompok kontrol 5 minggu (KK5), dan kelompok kontrol 9 minggu (KK9), grafik rerata ekspresi TGF- β jaringan hati masing-masing kelompok berada pada rentang yang cukup bervariasi, kontrol positif dengan rerata ekspresi $36,825 \pm 9,7449$ sel, KK2 dengan rerata ekspresi $65,375 \pm 9,9259$ sel, KK5 dengan ekspresi $94,525 \pm 6,9144$ sel, dan KK9 dengan ekspresi $22,525 \pm 1,2945$ sel. Rerata ekspresi TGF- β jaringan hati pada KK2, KK5, dan KK9 juga memiliki selisih yang berbeda jauh dengan kelompok kontrol negatif. Ekspresi TGF- β jaringan hati pada KK2 lebih rendah dibandingkan dengan kontrol positif dengan angka signifikansi sebesar 0,001. Sedangkan ekspresi TGF- β kontrol positif dibandingkan dengan KK5 memiliki angka signifikansi sebesar Pada perbandingan ekspresi TGF- β kontrol positif dengan KK9, ada selisih sebesar 14,3 sel dengan angka signifikansi sebesar 0,094.



Gambar 5.5 Grafik Rerata Ekspresi TGF- β Jaringan Hati Kelompok Perlakuan dan Kelompok Kontrol. * $p < 0,05$: terdapat perbedaan yang signifikan

Pada gambar 5.5, dijelaskan tentang perbandingan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrolnya pada minggu yang sama. Dapat dilihat pada minggu yang ke 2, ekspresi TGF- β pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrolnya dengan selisih sebesar 61,075 sel, namun jarak kedua kelompok tidak terlalu jauh sehingga nilai signifikansinya hanya 0,362. Kemudian pada minggu ke 5, ekspresi TGF- β jaringan pada KP5 lebih rendah dibandingkan pada KK5 dengan angka selisih sebesar 86,95 sel, lebih besar dibandingkan dengan selisih antara KP2 dengan KK2 dengan nilai signifikansi 0,007. Dan pada minggu yang ke 9, ekspresi TGF- β jaringan pada KP9 tidak jauh berbeda dengan KK9 dengan selisih nilai sebesar 0,3 sel, jauh lebih kecil dibandingkan dengan selisih antara KP5 dengan KK5 dan nilai signifikansinya adalah 1,000.

Dari hasil penelitian ini, didapatkan perbedaan rerata ekspresi TGF- β jaringan hati antara kelompok kontrol positif dengan kelompok kontrol negatif berdasarkan uji hipotesis komparatif (*t-test independent*). Lalu, didapatkan perbedaan yang bermakna antara 8 kelompok perlakuan ini (*one way ANOVA* $p=0,000$). Uji korelasi *Pearson* menunjukkan bahwa terdapat korelasi negatif antara lama pemberian kurkumin dengan penurunan ekspresi TGF- β jaringan hati dengan angka koefisien korelasi sebesar 0,741 dan angka signifikansinya sebesar 0,006. Uji regresi linier menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh sebesar 54,8%

terhadap penurunan ekspresi TGF- β jaringan hati

DISKUSI

Pada kontrol positif, ekspresi TGF- β jaringan hati lebih tinggi dibandingkan dengan ekspresi TGF- β jaringan hati pada kontrol negatif dengan selisih yang jauh berbeda (Gambar 5.2). Karbon tetraklorida dapat menyebabkan nekrosis sentrizonal dan steatosis. Karbon tetraklorida merusak hepatosit dengan cara mengubah permeabilitas membran plasma, lisosom, dan mitokondria. Biotransformasi karbon tetraklorida memproduksi metabolit yang bersifat hepatotoksik, yaitu radikal bebas *trichloromethyl* yang sangat reaktif, yang akan dikonversikan menjadi *peroxytrichloromethyl*.⁸ ROS yang dihasilkanlah yang memberikan kontribusi terhadap *onset* dan progresi fibrosis.⁹ Hal itu dapat menjelaskan bahwa CCl₄ yang diberikan pada tikus kontrol positif berperan dalam meningkatkan ekspresi TGF- β jaringan hati.

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

secara signifikan. Dalam kondisi ini, pemberian kurkumin optimal selama 2 minggu untuk menurunkan ekspresi TGF- β jaringan hati dan mencapai target penyembuhan pada fibrosis hati.

Pada data hasil penelitian di tikus kelompok perlakuan 5 minggu (Gambar 5.3), rerata ekspresi TGF- β jaringan hati tikus pada kelompok perlakuan selama 5 minggu (7,575 sel) lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan 2 minggu namun tetap lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol positif secara signifikan ($p=0,000$). Berdasarkan rerata ekspresi TGF- β jaringan hati tikus kelompok 5 minggu, kelompok perlakuan memiliki rerata ekspresi lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol (94,525 sel) secara signifikan ($p=0,000$) (Gambar 5.5). Artinya, bahwa pada perlakuan selama 5 minggu, terapi kurkumin ini tidak efektif untuk terus menurunkan ekspresi TGF- β jaringan hati karena terjadi peningkatan dibandingkan kelompok perlakuan 2 minggu. Walaupun demikian, kelompok yang diberikan kurkumin selama 5 minggu memiliki ekspresi TGF- β yang lebih rendah dibandingkan kelompok yang hanya diberikan plasebo.

Pada kelompok perlakuan selama 9 minggu, dari hasil pembacaan data penelitian (Gambar 5.3), dapat ditemukan bahwa, rerata ekspresi TGF- β jaringan hati pada kelompok perlakuan selama 9 minggu (22,225 sel) lebih rendah dibandingkan dengan rerata ekspresi TGF- β jaringan hati tikus kelompok kontrol positif (36,825 sel), kemudian ekspresi TGF- β jaringan hati kelompok perlakuan 9 minggu ini pun juga memiliki nilai yang sedikit lebih rendah jika dibandingkan dengan ekspresi TGF- β jaringan hati tikus kelompok kontrol 9 minggu (Gambar 5.5) (22,525 sel) dengan angka signifikansi sebesar 1,000 yang berarti bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara ekspresi TGF- β jaringan hati pada tikus model fibrosis hati kelompok perlakuan selama 9 minggu dengan kelompok kontrolnya. Berdasarkan penghitungan ekspresi TGF- β jaringan hati seluruh kelompok, didapatkan kelompok KP2 yang memiliki ekspresi TGF- β jaringan hati yang paling sedikit selisihnya

dengan kontrol negatif (tikus yang tidak fibrosis), yakni sebesar 0,1 sel. Dosis kurkumin yang digunakan dalam penelitian ini apabila dikonversikan dengan dosis manusia berdasarkan tabel konversi perhitungan dosis Laurence dan Bacharach (1964) adalah 32 mg/kgBB.¹⁰

Pada saat terjadi kerusakan jaringan hati ketika diberikan injeksi karbon tetraklorida (CCl₄), sel parenkim hati akan merespon kerusakan tersebut dengan melakukan regenerasi sel dalam responnya terhadap inflamasi dan deposisi dari sel matriks ekstraseluler, sedangkan pada kasus fibrosis hati yang masih awal, akan terjadi perbaikan dari hati secara spontan.¹¹ Kurkumin memiliki efek antifibrosis, karena pemberian kurkumin pada tikus dengan fibrosis hati yang diinduksi dengan CCl₄, secara signifikan mengurangi aktivitas serum aspartat aminotransferase, alkali fosfatase, dan alanine aminotransferase, serta memperbaiki jaringan hati secara arsitektur histologisnya.¹² Seperti yang telah diketahui, stress oksidatif memiliki kontribusi yang penting dalam inisiasi dan progresi beberapa penyakit hati, dimana NF- κ B merupakan salah satu faktor regulator transkripsi inflamatorik yang sangat berperan pada penyakit hati. NF- κ B yang dapat meregulasi berbagai sitokin proinflamatorik dan profibrotik memiliki peran yang penting dalam mitigasi penyakit hati. Efek antiinflamasi kurkumin sebagian dimediasi melalui inhibisi aktivitas I κ B kinase sehingga terjadi supresi aktivasi NF- κ B.¹³ NF- κ B yang terinaktivasi dapat menyebabkan ekspresi siklooksigenasi-2 (COX-2) berkurang.^{14, 15}

Kurkumin mengaktifasi PPAR- γ , menghambat ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*), meningkatkan konten GSH (Glutation) seluler, dan menghambat ekspresi *toll-like receptor-4* sehingga menyebabkan downregulasi NF- κ B pada sel stellata hati.¹⁶ Prosedur tersebut menghasilkan supresi ekspresi gen reseptor TGF- β dan supresi ekspresi gen cTGF (*Connective Tissue Growth Factor*). Hasilnya adalah penurunan produksi matriks ekstraseluler dari sel stellata hati yang teraktivasi dan perbaikan pada injuri hati.¹⁷ Jika dilihat dari lama pemberian

larutan kurkumin, dari pemberian kurkumin 2 minggu, 5 minggu, dan 9 minggu, terjadi penurunan ekspresi TGF- β jaringan hati pada kelompok perlakuan 2 minggu dibandingkan kelompok kontrol positif. Hal ini membuktikan bahwa larutan kurkumin, zat yang diharapkan sebagai terapi fibrosis hati, memang mampu mempercepat perbaikan fibrosis hati ditinjau dari penurunan ekspresi TGF- β jaringan hati.

Pada kelompok perlakuan yang diberikan kurkumin selama 5 dan 9 minggu, tampak ekspresi TGF- β jaringan hati meningkat kembali. Terdapat beberapa kemungkinan yang menyebabkan hal itu. Kemungkinan pertama adalah pemberian kurkumin pada rentang waktu tersebut telah berlebihan hingga mencapai kadar toksik. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, kurkumin dengan konsentrasi tinggi dapat menyebabkan aberasi kromosom, kematian sel astrosit, efek teratogenik, dan toksisitas reproduktif.^{18, 19, 20, 21} Kurkumin juga dapat bersifat hepatotoksik pada dosis tinggi pada tikus, namun tidak pada manusia, karena manusia dapat menoleransi kurkumin dengan dosis tinggi.^{22, 23} Namun sejauh ini, hanya sedikit penelitian mengenai toksisitas kurkumin pada hewan dan manusia.⁶ Selain itu, studi mengenai toksisitas jangka panjang kurkumin juga masih perlu dilakukan sebelum dapat diaplikasikan pada manusia.²⁴

Selain itu, dalam keadaan hati normal TGF- β dapat ditemukan terutama pada sel kupffer. Ekspresi TGF- β pada sel kupffer 9 kali lebih tinggi daripada sel stellata hati.²⁵ Pada hepar yang sedang mengalami regenerasi setelah terjadi kerusakan, TGF- β tetap ada dan diperkirakan tidak berkaitan dengan proses fibrogenesis, dan hepatosit dari hepar yang sedang mengalami regenerasi tersebut dapat mengaktifkan TGF- β laten.²⁶ Dari uraian tersebut, dapat diketahui bahwa TGF- β tidak hanya berperan pada proliferasi sel stellata dan produksi matriks ekstraseluler dalam fibrogenesis, namun juga dalam regenerasi hepatosit setelah terjadi kerusakan. Proses memblok aktivitas

TGF- β dengan berbagai cara memang terbukti menghambat proses fibrosis pada model-model eksperimen. Namun, TGF- β juga memiliki fungsi penting sebagai imunomodulator dan memiliki efek antiproliferatif pada sel epitel, termasuk hepatosit. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Date dkk. pada tahun 2000, pada proses regenerasi hepar terdapat proliferasi hepatosit dan peningkatan ekspresi TGF- β , padahal TGF- β berperan sebagai agen antiproliferasi. Diperkirakan penurunan reseptor TGF- β I dan II hepatosit setelah injuri akibat CCl₄ merupakan penyebab penurunan inhibisi pertumbuhan hepatosit yang dimediasi oleh TGF- β . Hal tersebut yang mungkin dapat menjelaskan kondisi proliferasi hepatosit yang mungkin berkorelasi dengan peningkatan ekspresi TGF- β dan deposisi matriks ekstraseluler, yakni kembalinya jumlah ekspresi reseptor TGF- β ke jumlah yang normal pada saat regenerasi hati sehingga sensitivitas hepatosit terhadap TGF- β meningkat dan pada titik tertentu ketika hati telah beregenerasi, TGF- β akan memberi sinyal antiproliferasi. Pengamatan tersebut memang menimbulkan masalah untuk dipelajari lebih lanjut mengenai bagaimana hepatosit meregulasi reseptor TGF- β dalam proses fibrosis dan regenerasi.²⁷

TGF- β yang juga berperan banyak dan penting pada fisiologi hepar memang menjadi penyulit dalam menentukan skenario regulasinya yang pasti. Setiap tahunnya fungsi regulator TGF- β terus ditemukan, sehingga terdapat kemungkinan perlakuan yang diberikan memberi pengaruh pada target-target lain dalam regulasi TGF- β . Dengan demikian, berbagai macam sel yang responsif terhadap TGF- β dengan fungsi yang berbeda-beda perlu dipertimbangkan dalam penentuan target terapi. Peran TGF- β yang kompleks menyebabkan sulitnya menganalisis korelasi antara ekspresi dengan manifestasi klinis yang dihasilkan pada fibrogenesis.²⁸

Faktor-faktor yang dapat memengaruhi penelitian ini adalah pemrosesan imunohistokimia yang luaran hasilnya tergantung oleh banyak faktor, seperti keterampilan dan pengalaman

dalam interpretasi.²⁹ Oleh karena itu, luaran proses imunohistokimia harus diinterpretasikan dengan perhatian. Spesimen terfiksasi yang disimpan terlalu lama juga dapat kehilangan antigenitasnya.³⁰

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

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah semakin lama pemberian kurkumin, semakin kecil penurunan ekspresi TGF- β jaringan hati.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mempelajari kemungkinan efek samping ataupun toksisitas dari larutan kurkumin ini apabila diberikan dalam jangka waktu yang lama sehingga dapat diketahui lama pemberian yang tepat untuk mengatasi fibrosis hati ini, serta kemungkinan target kerja kurkumin terhadap beberapa regulasi sitokin-sitokin yang berperan dalam fibrosis hati karena dapat memengaruhi interpretasi data yang didapatkan. Selain itu, perlu dilakukan pemeriksaan kuantitatif kadar TGF- β jaringan dengan metode selain imunohistokimia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dooley S, Ten Dijke P. TGF- β in progression of liver disease. *Cell and tissue research*. 2012 Jan 1;347(1):245-56.
2. Poynard T, Lebray P, Ingiliz P, Varaut A, Varsat B, Ngo Y, Norha P, Munteanu M, Drane F, Messous D, Bismut FI. Prevalence of liver fibrosis and risk factors in a general population using non-invasive biomarkers (FibroTest). *BMC gastroenterology*. 2010 Apr 22;10(1):40.
3. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Buku ajar patologi. Jakarta: eGC. 2007:80-2.
4. Wijayati R. Analisis Penggunaan Hepatoprotektor Pada Terapi Hepatitis Di Instalasi Rawat Inap Rumah Sakit Angkatan Laut Dr. Ramelan Surabaya.
5. Lin YL, Lin CY, Chi CW, Huang YT. Study on antifibrotic effects of curcumin in rat hepatic stellate cells. *Phytotherapy Research*. 2009 Jul 1;23(7):927-32.
6. Rivera-Espinoza Y, Muriel P. Pharmacological actions of curcumin in liver diseases or damage. *Liver international*. 2009 Nov 1;29(10):1457-66.
7. Yao QY, Xu BL, Wang JY, Liu HC, Zhang SC, Tu CT. Inhibition by curcumin of multiple sites of the transforming growth factor-beta1 signalling pathway ameliorates the progression of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *BMC complementary and alternative medicine*. 2012 Sep 16;12(1):156.
8. Williams AT, Burk RF. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of free radical-mediated injury. *In Seminars in liver disease* 1990 Nov (Vol. 10, No. 04, pp. 279-284). © 1990 by Thieme Medical Publishers, Inc..
9. Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Molecular aspects of medicine*. 2000 Jun 30;21(3):49-98.
10. Laurence DR, Bacharach AL, editors. Evaluation of drug activities: pharmacometrics. New York: Academic press; 1964 Jul.
11. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2005 Feb 1;115(2):209-18.
12. Fu Y, Zheng S, Lin J, Ryerse J, Chen A. Curcumin protects the rat liver from

- CCl4-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation. *Molecular pharmacology*. 2008 Feb 1;73(2):399-409.
13. Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, Tharakan ST, Misra K, Priyadarsini IK, Rajasekharan KN, Aggarwal BB. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochemical pharmacology*. 2008 Dec 1;76(11):1590-611.
 14. Irving GR, Karmokar A, Berry DP, Brown K, Steward WP. Curcumin: the potential for efficacy in gastrointestinal diseases. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2011 Oct 31;25(4):519-34.
 15. Shang YJ, Jin XL, Shang XL, Tang JJ, Liu GY, Dai F, Qian YP, Fan GJ, Liu Q, Zhou B. Antioxidant capacity of curcumin-directed analogues: Structure-activity relationship and influence of microenvironment. *Food Chemistry*. 2010 Apr 15;119(4):1435-42.
 16. Chen A, Zheng S. Curcumin inhibits connective tissue growth factor gene expression in activated hepatic stellate cells in vitro by blocking NF- κ B and ERK signalling. *British journal of pharmacology*. 2008 Feb 1;153(3):557-67.
 17. Zheng S, Chen A. Curcumin suppresses the expression of extracellular matrix genes in activated hepatic stellate cells by inhibiting gene expression of connective tissue growth factor. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2006 May 1;290(5):G883-93.
 18. Ganiger S, Malleshappa HN, Krishnappa H, Rajashekhar G, Rao VR, Sullivan F. A two generation reproductive toxicity study with curcumin, turmeric yellow, in Wistar rats. *Food and chemical toxicology*. 2007 Jan 31;45(1):64-9.
 19. Wu JY, Lin CY, Lin TW, Wen YD. Curcumin affects development of zebrafish embryo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2007;30(7):1336-9.
 20. Burgos-Morón E, Calderón-Montaño JM, Salvador J, Robles A, López-Lázaro M. The dark side of curcumin. *International journal of cancer*. 2010 Apr 1;126(7):1771-5.
 21. Romero-Hernández MA, Eguía-Aguilar P, Pérezpeña-DíazConti M, Rodríguez-Leviz A, Sadowinski-Pine S, Velasco-Rodríguez LA, Cáceres-Cortés JR, Arenas-Huertero F. Toxic effects induced by curcumin in human astrocytoma cell lines. *Toxicology mechanisms and methods*. 2013 Nov 1;23(9):650-9.
 22. Deshpande SS, Lalitha VS, Ingle AD, Raste AS, Gadre SG, Maru GB. Subchronic oral toxicity of turmeric and ethanolic turmeric extract in female mice and rats. *Toxicology Letters*. 1998 May 31;95(3):183-93.
 23. Ireson C, Orr S, Jones DJ, Verschoyle R, Lim CK, Luo JL, Howells L, Plummer S, Jukes R, Williams M, Steward WP. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer research*. 2001 Feb 2;61(3):1058-64.
 24. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *The AAPS journal*. 2013 Jan 1;15(1):195-218.
 25. De Bleser PJ, Niki T, Rogiers V, Geerts A. Transforming growth factor- β gene expression in normal and fibrotic rat liver. *Journal of hepatology*. 1997 Apr 30;26(4):886-93.
 26. Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *Journal of Clinical Investigation*. 1995 Jul;96(1):447.
 27. Date M, Matsuzaki K, Matsushita M, Tahashi Y, Furukawa F, Inoue K. Modulation of transforming growth factor β function in hepatocytes and

hepatic stellate cells in rat liver injury.
Gut. 2000 May 1;46(5):719-24.

28. Fabregat I, Moreno-Càceres J, Sánchez A, Dooley S, Dewidar B, Giannelli G, Dijke P. TGF- β signalling and liver disease. FEBS Journal. 2016 Feb 1.
29. Alves VA, Bacchi CE, Vassallo JO. Manual de imuno-histoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia. 1999;270.
30. Yaziji H, Barry T. Diagnostic immunohistochemistry: what can go wrong?. Advances in anatomic pathology. 2006 Sep 1;13(5):238-46.

