

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Pada penelitian ini, sebelum memberikan perlakuan pada masing-masing kelompok, 48 tikus ini terlebih dahulu diadaptasi terhadap lingkungan selama kurang lebih 7 hari. Tikus percobaan yang digunakan dibagi menjadi 8 kelompok yaitu kelompok negatif (K-Negatif) sebagai kelompok kontrol (-), kelompok positif (K-Positif) sebagai kelompok kontrol (+) yang diinjeksi karbon tetraklorida (CCl_4) 1 ml/kgBB secara intraperitoneal dua kali seminggu selama 9 minggu dan tanpa pemberian kurkumin, 3 kelompok perlakuan KP-2, KP-5, KP-9 yaitu kelompok yang diberi injeksi CCl_4 selama 9 minggu dan selanjutnya diberikan kurkumin dengan lama pemberian yang berbeda secara intraperitoneal selama 2, 5, dan 9 minggu dengan dosis 200 mg/kgB, serta 3 kelompok perlakuan KK-2, KK-5, KK-9 yaitu kelompok yang diberi injeksi CCl_4 selama 9 minggu dan selanjutnya diberikan pelarut kurkumin dengan lama pemberian yang berbeda secara intraperitoneal selama 2, 5, dan 9 minggu. Setelah 7 hari tikus diadaptasikan, kemudian kelompok tikus yang diberi perlakuan fibrosis diinduksi dengan karbon tetraklorida (CCl_4) dengan dosis 1 ml/kgBB dua kali seminggu selama 9 minggu untuk membuat tikus dalam kondisi fibrosis hati derajat 3 (F-3). Setelah 72 jam pemberian CCl_4 terakhir, kelompok tikus kontrol negatif dan positif akan dikorbankan untuk dilakukan pembedahan dengan mengambil darah tikus lalu dilakukan pemeriksaan serum. Selama 2, 5, dan 9 minggu berikutnya diberikan terapi kurkumin pada kelompok KP-2, KP-5 dan KK-9 sesuai dosis dan diberikan pelarut kurkumin pada kelompok KK-2, KK-5, KK-9 sesuai dosis. Setelah 72 jam pemberian kurkumin dan pelarut kurkumin terakhir, tikus dibedah untuk diambil darahnya dan dilakukan pemeriksaan serum untuk mengetahui kadar MDA serum pada tikus

menggunakan metode *TBARS*. Tujuan utama dari penelitian ini untuk membuktikan pengaruh lama pemberian kurkumin terhadap penurunan kadar MDA serum pada tikus model fibrosis hati yang diinduksi karbon tetraklorida (CCl_4). Selama penelitian, keadaan umum seluruh sampel tikus selama 5 bulan penelitian menunjukkan status yang cukup baik. Didapatkan 10 tikus mati dikarenakan sakit dan akibat injeksi CCl_4 . Sebanyak 4 tikus dipindahkan ke kelompok yang lain untuk mengimbangi jumlah tikus di setiap kelompok.

Pada penelitian ini, pemberian injeksi CCl_4 secara intraperitoneal dengan dosis 1 ml/kgBB pada tikus bertujuan untuk memberikan kondisi fibrosis pada tikus. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang diberi paparan CCl_4 selama 2 minggu untuk memperoleh kondisi fibrosis derajat 1 (F-1), 5 minggu untuk memperoleh kondisi fibrosis derajat 2 (F-2), dan 9 minggu untuk memperoleh kondisi fibrosis derajat 3 (F-3). Berdasarkan gambar 5.1, kadar MDA serum pada kelompok K-Positif mengalami peningkatan kadar dibandingkan K-Negatif. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa paparan tinggi terhadap karbon tetraklorida ini dapat menyebabkan kerusakan pada hati, ginjal, paru, dan susunan saraf pusat (ATSDR, 2005). *Malondialdehyde* (MDA) merupakan salah satu marker dari proses peroksidasi lipid yang terjadi karena munculnya ROS yang terbentuk akibat adanya stres oksidatif. Kadar MDA ini akan meningkat bila dalam sebuah jaringan mengalami kerusakan akibat berbagai faktor. Karbon Tetraklorida (CCl_4), secara signifikan dapat meningkatkan kadar MDA melalui mekanisme stres oksidatif yang menyebabkan kerusakan jaringan dan sel (Bhala *et al.*, 2011). Kadar MDA di jaringan ini yang nantinya akan ikut tersirkulasi dan meningkatkan kadar MDA di serum.

Dari hasil penelitian ini (Gambar 5.2) dapat diketahui bahwa kelompok perlakuan selama 2 minggu memiliki rerata kadar MDA serum yang lebih rendah yaitu 0,462 ng/mL dibandingkan rerata kadar MDA serum pada kelompok kontrol

positif yaitu 1,047 ng/mL. Rerata kadar MDA serum kelompok perlakuan selama 2 minggu ini pun juga lebih rendah dibandingkan dengan rerata kadar MDA serum kelompok kontrol selama 2 minggu yaitu 1,276 ng/mL (Gambar 5.4). Hasil ini mengartikan bahwa pemberian kurkumin memang memberikan efek menurunkan kadar MDA dalam serum karena pada kelompok kontrol 2 minggu yang tidak diberikan larutan kurkumin kadar MDA serum lebih tinggi. Angka signifikansi pada kelompok KP-2 dengan KP dan KK-2 adalah 0,001 dan dapat diartikan bahwa pemberian kurkumin pada fibrosis hati telah memberikan efek terapi jika hanya diberikan selama 2 minggu. Dalam kondisi ini, masih harus dikaji lagi untuk minggu selanjutnya apakah pemberian kurkumin ini membutuhkan waktu yang lebih lama dari pemberian yang hanya 2 minggu untuk menurunkan kadar MDA serum dan mencapai target penyembuhan pada fibrosis hati.

Pada data hasil penelitian di tikus kelompok perlakuan 5 minggu (Gambar 5.2), rerata kadar MDA serum tikus pada kelompok perlakuan selama 5 minggu jauh lebih rendah (0,132 ng/mL) dibandingkan dengan rerata kadar MDA serum tikus kelompok kontrol positif (1,276 ng/mL) dan memiliki angka signifikansi sebesar 0,001. kemudian, bila dibandingkan dengan kelompok kontrol 5 minggu (1,100 ng/mL) (Gambar 5.4), rerata kadar MDA serum kelompok perlakuan 5 minggu lebih rendah yaitu 0,132 ng/mL dengan angka signifikansi sebesar 0,001. Artinya, bahwa pada perlakuan selama 5 minggu, terapi kurkumin ini mengalami efektivitas jauh dibandingkan dengan tikus yang hanya diberikan plasebo pelarut kurkumin, hal ini dibuktikan dengan jarak yang cukup jauh antara rerata kadar MDA serum pada tikus kelompok perlakuan dengan tikus kelompok kontrol 5 minggu. Kemudian jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 minggu, angka signifikansi antara kelompok perlakuan 5 minggu dengan kelompok perlakuan 2 minggu adalah sebesar 0,081 yang berarti bahwa perbedaan rerata kadar MDA serum antara kelompok perlakuan 5 minggu dengan kelompok perlakuan 2 minggu

tidak signifikan. Namun, jika dilihat dari selisih kadar rerata MDA serumnya, pemberian kurkumin dengan lama pemberian selama 5 minggu, dapat menurunkan lebih banyak kadar MDA serum dibandingkan jika hanya diberikan selama 2 minggu.

Pada kelompok perlakuan selama 9 minggu, dari hasil pembacaan data penelitian (Gambar 5.2), dapat ditemukan bahwa, rerata kadar MDA serum pada kelompok perlakuan selama 9 minggu yaitu 0,620 lebih rendah dibandingkan dengan kadar MDA serum tikus kelompok kontrol positif (1,276 ng/mL). Rerata Kadar MDA serum kelompok perlakuan 9 minggu ini pun juga memiliki nilai yang lebih rendah jika dibandingkan dengan kadar MDA serum tikus kelompok kontrol 9 minggu (Gambar 5.4) yaitu 1,361 ng/mL dengan angka signifikansi sebesar 0,001 yang berarti bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar MDA serum pada tikus model fibrosis hati kelompok perlakuan selama 9 minggu dengan kelompok kontrolnya. Namun rerata kadar MDA serum kelompok perlakuan 9 minggu ini lebih tinggi dibandingkan rerata kadar MDA serum kelompok perlakuan 2 minggu dan 5 minggu walaupun kadar MDA serum kelompok perlakuan 9 minggu ini hampir sama dengan rerata kadar MDA serum kontrol negatif. Hal ini diduga disebabkan karena paparan CCl_4 juga masuk ke dalam sirkulasi jadi kerusakan sel yang terjadi tidak hanya terjadi di dalam jaringan hati namun juga terjadi di jaringan lain yang nantinya kerusakan sel ini akan menghasilkan ROS yang nantinya akan terukur melalui kadar MDA serum. Serta dapat juga dilihat lagi tentang efek samping dan toksisitas pemberian kurkumin jangka waktu lama apakah pemberian lebih dari 9 minggu akan semakin meningkat kadar MDA serumnya atau tidak.

Jika dilihat dari lama pemberian larutan kurkumin, dari pemberian kurkumin 2 minggu, 5 minggu, dan 9 minggu, kadar MDA serum pada kelompok perlakuan

akan lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan kelompok kontrolnya. Kelompok perlakuan 2 minggu, 5 minggu, dan 9 minggu ini juga berada pada *range* yang tidak jauh dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini membuktikan bahwa larutan kurkumin, zat yang diharapkan sebagai terapi fibrosis hati, memang mampu menurunkan kadar MDA serum. Ada beberapa mekanisme pada kurkumin dalam fungsinya sebagai anti fibrosis. Kurkumin menyebabkan penekanan proses radang dengan mengurangi kadar sitokin inflamasi yang nantinya akan mengurangi produksi ROS dari sitokin inflamasi tersebut. Kurkumin juga mampu menghambat proses aktivasi dari *Hepatic Stellate Cells* (HSC) dengan mengupregulasi ekspresi dari gen *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* (PPAR)- γ dan menstimulasi proses *signalling*-nya (Fu *et al.*, 2008). Dengan adanya peningkatan kadar PPAR- γ , akan terjadi proses inaktivasi dari *Nuclear Factor-kappa Beta Cells* (NF-kB). Salah satu peran dari NF-kB adalah menghambat proses apoptosis dari sel, sedangkan pada proses fibrosis hati dibutuhkan apoptosis dari sel yang rusak untuk mengurangi jumlah radikal bebas dalam tubuh. Mekanisme lain dari kerja larutan kurkumin sebagai antifibrosis ini adalah dengan cara meningkatkan jumlah glutation dalam hati. Meningkatnya jumlah glutation dalam hati membuat kadar dari lipid hidroperoksida semakin menurun karena proses perubahan dari radikal bebas menjadi senyawa anti radikal oleh glutation (Fu *et al.*, 2008).

Pada saat terjadi kerusakan jaringan hati ketika diberikan injeksi karbon tetraklorida (CCl₄), sel parenkimal 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 tanpa adanya pemberian terapi medikamentosa yang lain (Ramon dan Daud, 2005). Namun, dari perbandingan hasil data penelitian tikus dari masing-masing kelompok kontrol, atau kelompok tikus yang

hanya diberikan plasebo pelarut kurkumin, dari minggu ke 2, menuju minggu ke 5, dan menuju minggu ke 9, tidak terjadi adanya perbedaan yang berarti antara kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol perlakuan 2,5, dan 9 minggu (Gambar 5.3). Kadar serum pada kelompok kontrol minggu 2, minggu 5, dan minggu 9, berada pada *range* yang saling berdekatan, kadar MDA serum kelompok kontrol 2 minggu adalah 1,276 ng/mL, sedangkan kadar MDA serum kelompok kontrol 5 minggu adalah 1,100 ng/mL, dan kadar MDA kelompok kontrol 9 minggu adalah 1,361 ng/mL. Dari angka-angka yang telah disebutkan, kondisi diatas berarti tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol perlakuan. Hal ini bisa terjadi karena pemberian karbon tetraklorida dalam jangka waktu yang cukup lama, yaitu 9 minggu, membuat jumlah dari sel matriks ekstraseluler dan sel-sel hati yang rusak sangatlah banyak, sehingga walaupun terjadi perbaikan sel-sel di hati, namun karena jumlah sel yang rusak banyak dan jumlah sel matriks ekstra selulernya juga terlalu banyak, proses fibrosis hati masih tetap ada dan jumlah radikal bebas dalam hati pun tidak berkurang sehingga radikal bebas yang tersirkulasi ke dalam serum juga masih tetap ada. Hal lain yang dapat mendasari kenapa tidak ada perubahan jumlah kadar MDA serum pada kelompok kontrol di tiap minggu ini adalah adanya proses dimana ketika terjadi kerusakan sel dan aktivasi dari *hepatic stellate cells* (HSC), HSC yang telah teraktivasi dan bermigrasi di tempat luka, mempunyai sifat proinflamasi sehingga akan semakin memperparah kerusakan yang ada disana dan semakin meningkatkan jumlah kadar MDA dalam jaringan hati yang nantinya akan masuk ke dalam sirkulasi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui korelasi antara lama pemberian kurkumin terhadap penurunan kadar MDA serum pada tikus model fibrosis hati akibat induksi karbon tetraklorida (CCl₄). Dari penelitian payung yang sebelumnya, telah dibuktikan bahwa pemberian karbon tetraklorida (CCl₄) dapat menyebabkan

proses fibrosis hati pada tikus dengan meningkatkan jumlah radikal bebas dalam jaringan dan menyebabkan reaksi stress oksidatif, peningkatan sel matriks ekstra seluler, dan deposisi kolagen pada jaringan hati (Li *et al.*, 2012). Kurkumin dipercaya dapat memberikan efek perbaikan pada jaringan hati yang telah terkena injuri akibat CCl₄ dengan menurunkan reaksi stres oksidatif di jaringan dan menghambat aktivasi dari HSC, juga dapat berperan sebagai antiinflamasi dengan mensupresi reaksi inflamasi di jaringan hati (Fu *et al.*, 2008).

Pada hasil diperoleh korelasi antara lama pemberian kurkumin terhadap penurunan kadar MDA serum sangat lemah dan tidak signifikan dikarenakan selisih antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan berada pada *range* yang hampir sama dan naik turun. Hal ini berarti tidak terdapat bukti yang kuat adanya korelasi lama pemberian kurkumin dengan penurunan kadar *malondialdehyde* (MDA) serum. Hal ini disebabkan lama pemberian kurkumin pada minggu ke 2 sudah memberikan efek terapi yang baik sehingga tidak diperlukan waktu pemberian yang lebih lama. Namun untuk lebih lanjutnya lebih baik dilihat marker-marker yang lain serta perbaikan histologi dari fibrosis itu sendiri untuk menentukan lama pemberian yang sesuai agar mendapatkan efek terapi yang sesuai.

6.2 Keterbatasan Penelitian

Dalam penelitian ini, dibutuhkan waktu perawatan tikus dan pengerjaan sampel yang cukup lama, sehingga membuat probabilitas tikus yang mati dalam perjalanan penelitian semakin meningkat. Selain itu, faktor-faktor yang dapat mempengaruhi hasil dari penelitian ini adalah penggunaan pelarut ekstrak CCl₄ yang dapat menyebabkan tingkat toksisitas dari CCl₄ berkurang apabila perbandingan pelarut dengan CCl₄ nya terlalu tinggi. kemudian yang diduga mempengaruhi hasil adalah penyimpanan sampel organ pada freezer suhu -20°C.

Sedangkan menurut *Oxford Biomedical Research* (2011), stabilitas sampel berada pada hasil optimal jika digunakan segera setelah pengambilan sampel. Jika tidak dimungkinkan, sampel harus disimpan di dalam lemari es dengan suhu -70°C untuk mencegah hilangnya stabilitas MDA dan oksidasi sampel. Sebaiknya sampel tidak boleh disimpan di suhu -20°C dan tidak boleh dibekukan ulang serta sampel harus dihindarkan dari sinar.

