

## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

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

tikus ditemukan meninggal tanpa ada tanda-tanda bekas luka pada KP-9 dan 1 tikus pada KP-2 meninggal sesaat setelah pemberian kurkumin, kemungkinan akibat sonde yang salah masuk ke paru-paru. Setelah 2 minggu, tikus pada KP-2 dan KK-2 dikorbankan dan diambil serum serta organ-organ yang diperlukan. Kemudian, pemberian kurkumin dilanjutkan lagi selama 3 minggu, setelah pemberian selama 3 minggu, tikus-tikus pada KP-5 dan KK-5 dibedah dan diambil organ yang diperlukan. Selama 3 minggu ini, ditemukan 1 tikus yang mati pada KK-9 ketika akan memberikan pakan dan minum. Kemudian pemberian kurkumin dilanjutkan kembali selama 4 minggu. Selama periode ini, ditemukan 1 tikus yang mati dari KP-9 saat akan memberi pakan dan minum. Setelah pemberian kurkumin selesai, dilakukan pembedahan terakhir pada KP-9 dan KK-9.

Berdasarkan uji analisis dengan menggunakan metode *One Way ANOVA* didapatkan angka signifikansi sebesar 0,000 yang berarti bahwa terdapat perbedaan yang bermakna dari hasil kadar TGF- $\beta$  jaringan hati tikus pada kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol, baik kontrol positif maupun kontrol perlakuan. Pada kontrol positif, kadar TGF- $\beta$  jaringan hati lebih tinggi dibandingkan dengan kadar TGF- $\beta$  jaringan hati pada kontrol negatif dengan selisih yang jauh berbeda (Gambar 5.1). Dalam hal ini bisa dilihat bahwa peningkatan kadar TGF- $\beta$  jaringan hati oleh induksi karbon tertriklorida pada kontrol positif. Karbon tertriklorida merusak hepatosit dengan cara mengubah permeabilitas dari membran plasma, lisosom, dan mitokondria (William dan Burk, 1990). Karbon tertriklorida merupakan pemicu dari radikal bebas yang menyebabkan gangguan integritas membran hepatosit yang dapat menyebabkan keluarnya berbagai enzim dari hepatosit. Enzim yang dikeluarkan oleh sel

hepatosit akan meningkat kadarnya dalam serum dan dapat menjadi indikator kerusakan hepar (Handoko, 2005).

Dari hasil penelitian ini (Gambar 5.2) dapat diketahui bahwa kelompok perlakuan selama 2 minggu memiliki rerata kadar TGF- $\beta$  jaringan hati yang lebih rendah (90,83 pg/mL) dibandingkan rerata kadar TGF- $\beta$  jaringan hati pada kelompok kontrol positif (276,58 pg/mL). Rerata kadar TGF- $\beta$  jaringan hati kelompok perlakuan selama 2 minggu ini pun juga lebih rendah dibandingkan dengan rerata kadar TGF- $\beta$  jaringan hati kelompok kontrol selama 2 minggu (155,17 pg/mL) (Gambar 5.3). Hasil ini menjelaskan bahwa pemberian kurkumin memang memberikan efek mempercepat penurunan kadar TGF- $\beta$  dalam jaringan hati karena pada kelompok kontrol positif maupun kelompok kontrol 2 minggu tidak diberikan larutan kurkumin. Namun, berdasarkan rerata kadar TGF- $\beta$  jaringan hati, kurkumin memberikan efek terapi yang maksimal jika hanya diberikan selama 2 minggu, karena pada minggu ke-5 kadar TGF- $\beta$  kembali meningkat dan pada minggu ke-9 didapatkan penurunan sedikit daripada minggu ke-5 meskipun masih di atas minggu ke-2. kelompok perlakuan 2 minggu dibandingkan dengan kelompok kontrol 2 minggu berbeda secara signifikan (0,026). Dalam kondisi ini, pemberian kurkumin optimal selama 2 minggu untuk menurunkan kadar TGF- $\beta$  jaringan hati dan mencapai target penyembuhan pada fibrosis hati.

Pada data hasil penelitian di tikus kelompok perlakuan 5 minggu (Gambar 5.2), rerata kadar TGF- $\beta$  jaringan hati tikus pada kelompok perlakuan selama 5 minggu (214,75 pg/mL) lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan 2 minggu namun tetap lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol positif secara signifikan ( $p=0,000$ ). Berdasarkan rerata kadar TGF- $\beta$  jaringan hati tikus kelompok 5

minggu, kelompok perlakuan memiliki rerata kadar lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol (274,17 pg/mL) secara signifikan ( $p=0,048$ ) (Gambar 5.4). Artinya, bahwa pada perlakuan selama 5 minggu, terapi kurkumin ini tidak efektif untuk terus menurunkan kadar TGF- $\beta$  jaringan hati karena terjadi peningkatan dibandingkan kelompok perlakuan 2 minggu. Walaupun demikian, kelompok yang diberikan kurkumin selama 5 minggu memiliki kadar TGF- $\beta$  yang lebih rendah dibandingkan kelompok yang hanya diberikan plasebo.

Pada kelompok perlakuan selama 9 minggu, dari hasil pembacaan data penelitian (Gambar 5.2), dapat ditemukan bahwa, rerata kadar TGF- $\beta$  jaringan hati pada kelompok perlakuan selama 9 minggu (209,42 pg/mL) lebih rendah dibandingkan dengan rerata kadar TGF- $\beta$  jaringan hati tikus kelompok kontrol positif (276,58 pg/mL), kemudian kadar TGF- $\beta$  jaringan hati kelompok perlakuan 9 minggu ini pun juga memiliki nilai yang lebih rendah jika dibandingkan dengan kadar TGF- $\beta$  jaringan hati tikus kelompok kontrol 9 minggu (Gambar 5.4) (272,75 pg/mL) dengan angka signifikansi sebesar 0,030 yang berarti bahwa terdapat perbedaan antara kadar TGF- $\beta$  jaringan hati pada tikus model fibrosis hati kelompok perlakuan selama 9 minggu dengan kelompok kontrolnya.

Pada saat diberikan injeksi karbon tetraklorida (CCl<sub>4</sub>) terjadi kerusakan jaringan hati, sel parenkim hati akan merespon kerusakan tersebut dengan melakukan regenerasi sel dalam responnya terhadap inflamasi dan deposisi dari sel matriks ekstraseluler, sedangkan pada kasus fibrosis hati yang masih awal, akan terjadi perbaikan dari hati secara spontan (Bataller dan Brenner, 2005). stress oksidatif memiliki kontribusi yang penting dalam inisiasi dan progresi beberapa penyakit hati, dimana NF- $\kappa$ B merupakan salah satu faktor regulator transkripsi inflamatorik yang sangat berperan pada penyakit hati. NF- $\kappa$ B yang

dapat meregulasi berbagai sitokin proinflamatorik dan profibrotik memiliki peran yang penting dalam mitigasi penyakit hati. Efek antiinflamasi kurkumin sebagian dimediasi melalui inhibisi aktivitas I $\kappa$ B kinase sehingga terjadi supresi aktivasi NF- $\kappa$ B (Anand *et al.*, 2008). NF- $\kappa$ B yang terinaktivasi dapat menyebabkan ekspresi siklooksigenasi-2 (COX-2) berkurang (Irving *et al.*, 2011; Shang *et al.*, 2010).

Kurkumin memiliki efek antifibrosis, karena pemberian kurkumin pada tikus dengan fibrosis hati yang diinduksi dengan CCl<sub>4</sub>, secara signifikan mengurangi aktivitas serum aspartat aminotransferase, alkali fosfatase, dan alanine aminotransferase, serta memperbaiki jaringan hati secara arsitektur histologisnya (Fu, *et al.* 2008). Kurkumin berperan dalam menghambat proses aktivasi dari HSC dengan meningkatkan regulasi ekspresi dari gen *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* (PPAR)- $\gamma$  dan menstimulasi proses *signalling*-nya (Fu, *et al.* 2008). Kurkumin juga dapat berperan , menghambat ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*), meningkatkan konten GSH (*Glutation*) seluler, dan menghambat ekspresi *toll-like receptor-4* sehingga menyebabkan downregulasi NF- $\kappa$ B pada sel stellata hati (Chen dan Zheng, 2008). Prosedur tersebut menghasilkan supresi ekspresi gen reseptor TGF- $\beta$  dan supresi ekspresi gen cTGF (*Connective Tissue Growth Factor*). Hasilnya adalah penurunan produksi matriks ekstraseluler dari sel stellata hati yang teraktivasi dan perbaikan pada injuri hati (Zheng dan Chen, 2006). jika dilihat pada pemberian kurkumin selama 2 minggu, 5 minggu, 9 minggu terjadi penurunan kadar TGF- $\beta$  jaringan hati pada kelompok perlakuan 2 minggu dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hal ini dapat membuktikan bahwa larutan

kurkumin mampu mempercepat perbaikan fibrosis hati yang dapat dilihat dari penurunan kadar TGF- $\beta$  jaringan hati.

Pada kelompok perlakuan yang diberikan kurkumin selama 5 dan 9 minggu, tampak kadar TGF- $\beta$  jaringan hati meningkat kembali. Terdapat beberapa kemungkinan yang menyebabkan hal itu. Kemungkinan pertama adalah pemberian kurkumin pada rentang waktu tersebut telah berlebihan hingga mencapai kadar toksik. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, kurkumin dengan konsentrasi tinggi dapat menyebabkan aberasi kromosom, kematian sel astrofit, efek teratogenik, dan toksisitas reproduktif (Ganiger *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Burgos-Morón *et al.*, 2010; Romero-Hernández *et al.*, 2013). Kurkumin juga dapat bersifat hepatotoksik pada dosis tinggi pada tikus, namun tidak pada manusia, karena manusia dapat menoleransi kurkumin dengan dosis tinggi (Deshpande *et al.*, 1998; Ireson *et al.*, 2001).

Selain itu, dalam keadaan hati normal TGF- $\beta$  dapat ditemukan terutama pada sel kupffer. TGF- $\beta$  pada sel kupffer 9 kali lebih tinggi daripada sel stellata hati (De Bleser *et al.*, 1997). Pada hepar yang sedang mengalami regenerasi setelah terjadi kerusakan, TGF- $\beta$  tetap ada dan diperkirakan tidak berkaitan dengan proses fibrogenesis, dan hepatosit dari hepar yang sedang mengalami regenerasi tersebut dapat mengaktifkan TGF- $\beta$  laten (Bissell *et al.*, 1995). Dapat diketahui bahwa TGF- $\beta$  tidak hanya berperan pada proliferasi sel stellata dan produksi matriks ekstraseluler dalam fibrogenesis, namun juga dalam regenerasi hepatosit setelah terjadi kerusakan. Berbagai cara untuk menghambat proses fibrosis, salah satunya adalah menghambat aktifitas sitokin penyebab fibrosis utama yaitu TGF - $\beta$ . Namun, TGF- $\beta$  juga memiliki fungsi penting sebagai imunomodulator dan memiliki efek antiproliferatif pada sel epitel, termasuk

hepatosit. Peningkatan TGF- $\beta$  pada KP-5 didasari pada peningkatan dari kelompok KK-5 yang mencapai puncaknya. Perlu diketahui juga bahwa TGF- $\beta$  diproduksi oleh sel T yang teraktivasi, limfosit, makrofag atau sel kupffer pada jaringan hati, serta sel-sel dendritik (baratawidjaja dan rengganis, 2014). TGF- $\beta$  bersama dengan faktor pertumbuhan lain (PDGF, FGF, TNF) menstimulasi sintesis kolagen serta jaringan ikat yang selanjutnya memodulasi sintesis dan aktivasi MMP yang produksinya diatur melalui lintas jalur antara Smad dan Nf- $\kappa$ B (Lan., 2011).

TGF- $\beta$  pada hepatosit yang dilakukan pada biakan sel dapat menunjukkan bahwa TGF- $\beta$  menetralkan stimulasi pada sintesis DNA oleh berbagai faktor pertumbuhan seperti *hepatocyte growth factor* (HGF), *epidermal growth factor* (EGF). dalam regenerasi seperti pada hati yang normal, TGF- $\beta$  mRNA hadir dalam sel non-parenkim tapi tidak dalam hepatosit. TGF- $\beta$  merupakan komponen dari sebuah loop regulasi parakrin mengendalikan replikasi hepatosit ( Fausto *et al.*, 1986 ). Dalam studi lain, TGF- $\beta$  induksi apoptosis ditunjukkan dimediasi melalui induksi *Smad-mediated* dari *death-associated protein* (DAP) protein (Jang *et al.*, 2002 ). Selanjutnya, TGF- $\beta$  telah terbukti menginduksi apoptosis hepatosit melalui ekspresi proapoptosis protein BIM (Bcl- 2 interacting mediator of cell death) (Ramesh *et al.*, 2008). TGF- $\beta$  meningkatkan kerusakan hepatosit. Di sisi lain, hal itu memicu *transdifferentiation* dari HSC untuk myofibroblas dan dengan demikian memediasi respon penyembuhan luka. Selama regenerasi dan hepatosit proliferasi, TGF- $\beta$  memiliki efek yang penting membatasi efek sitostatik jaringan, massa dan mengendalikan inflamasi dengan menghasilkan T-reg (Dooley dan Ten Dijke, 2012). Dari uraian tersebut, dapat diketahui bahwa TGF- $\beta$  tidak hanya berperan pada proliferasi sel

stellata dan produksi matriks ekstraseluler dalam fibrogenesis, namun juga dalam regenerasi hepatosit setelah terjadi kerusakan.

## 6.2 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan pada penelitian ini salah satunya adalah tidak bisa melihat TGF- $\beta$  laten dan aktif dari jaringan hati, tetapi melihat keseluruhan total TGF- $\beta$ . Dan juga melihat TGF- $\beta$  diawal sebelum tikus dikelompokkan dan diberi perlakuan. Serta tidak spesifik melihat kadar TGF- $\beta$  jaringan hati yang dihasilkan oleh sel kupffer.

