

**UJI POTENSI EKSTRAK ETANOL DAUN *MORINGA OLEIFERA* (MO) DALAM  
MENURUNKAN KADAR *TISSUE INHIBITOR METALLOPROTEINASE-1*  
(TIMP-1) JARINGAN HATI PADA TIKUS MODEL FIBROSIS HATI**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



**Oleh:**

**Zalfa Daulah**

**NIM 155070101110321**

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

**2019**

## DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT .....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
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 .....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1. Manfaat Akademik .....	4
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Fibrosis Hati .....	5
2.1.1 Definisi Fibrosis Hati.....	5
2.1.2 Etiologi Fibrosis Hati .....	5
2.1.3 CCl <sub>4</sub> dalam Cedera Hati .....	6
2.2 Patogenesis Fibrosis Hati.....	8
2.2.1 Hepatosit dalam Fibrosis Hati.....	14
2.2.2 Sel Kupffer dalam Fibrosis Hati.....	15
2.2.3 Aktivasi HSC.....	17
2.2.4 Apoptosi HSC.....	20

2.2.5 ECM dalam Fibrosis Hati.....	23
2.2.6 ROS dalam Fibrosis Hati.....	24
2.2.7 Inflamasi dalam Fibrosis Hati .....	26
2.3 Tissue Inhibitor of Metaloproteinase-1 dan Metalloproteinase.....	28
2.3.1 Tinjauan Umum Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP).....	28
2.3.2 Fungsi MMP .....	29
2.3.3 MMP yang berperan dalam Fibrosis Hati.....	30
2.4 Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 .....	32
2.4.1 Struktur dan Fungsi TIMP-1 sebagai Inhibitor Metalloproteinase .....	32
2.4.2 Regulasi TIMP-1 .....	34
2.4.3 Fungsi TIMP-1.....	35
2.4.4 TIMP-1 Dalam Fibrosis Hati .....	37
2.4.5 TIMP-1 dan Apoptosis HSC .....	40
2.5 Karbon Tetraklorida.....	44
2.5.1 Definisi Karbon Tetraklorida .....	44
2.6 Moringa Oleifera.....	45
2.6.1 Definisi Moringa Oleifera.....	45
2.6.2 Daun Moringa Oleifera dalam Fibrosis Hati sebagai Antioksidan.....	45
2.6.3 Daun Moringa Oleifera sebagai Penginduksi Apoptosis dalam Fibrosis Hati.....	47

**BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....** 48

3.1. Kerangka Konsep.....	48
3.2. Uraian Kerangka Konsep Penelitian .....	49
3.3. Hipotesis Penelitian .....	49

**BAB 4 METODE PENELITIAN.....** 50

4.1. Rancangan Penelitian.....	50
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	51
4.3. Populasi dan Sampel.....	51
4.3.1 Sampel Penelitian.....	51



4.3.2 Estimasi Jumlah Sampel.....	52
4.4. Variabel Penelitian.....	52
4.4.1 Variabel bebas.....	52
4.4.2 Variabel tergantung .....	53
4.5. Definisi Operasional .....	53
4.6. Alat dan Bahan Penelitian .....	54
4.6.1 Alat .....	54
4.6.2 Bahan .....	54
4.7. Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data .....	55
4.7.1 Proses Pegeringan dan Ekstraksi <i>Moringa oleifera</i> .....	55
4.7.2 Pembuatan CCl <sub>4</sub> .....	56
4.7.3 Pemeliharaan dan Perlakuan pada Tikus .....	56
4.7.4 Pembedahan dan Pengambilan Organ .....	59
4.7.5 Pengukuran Ekspresi TIMP-1 Jaringan Hati Tikus Model Fibrosis Hati dengan Metode <i>Immunofluorescence</i> .....	60
4.7.5.1 Cara Pemfotografan Preparat dengan Mikroskop Olympus FSX 100.....	62
4.8 Pengolahan Data.....	63
4.8.1 Uji Analisis .....	63
4.9 Alur Penelitian .....	64
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>65</b>
5.1 Pembuatan Tikus Model Fibrosis .....	65
5.2 Hasil Pengamatan TIMP-1 Pada Jaringan Hati .....	66
5.3 Analisis Data .....	69
5.3.1 Uji Asumsi Data .....	69
5.3.1.1. Normalitas Distribusi Data .....	69
5.3.1.2. Homogenitas Ragam Data.....	69
5.3.2 Uji Anova .....	70
5.3.3 Uji Beda Post Hoc Tukey .....	71
5.3.4 Uji Korelasi .....	71
<b>BAB 6 PEMBAHASAN .....</b>	<b>72</b>

6.1 Pembuatan Tikus Model Fibrosis .....	72
6.2 Efek Moringa Oleifera terhadap Ekspresi TIMP-1 pada Jaringan Hati Fibrosis .....	71
<b>BAB 7 PENUTUP</b> .....	78
7.1 Kesimpulan .....	78
7.2 Saran .....	78
DAFTAR PUSTAKA.....	79
LAMPIRAN.....	85



## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan Tikus.....	50
Tabel 5.1 Hasil Uji Post Hoc Tukey dengan Jumlah Sel yang Mengekspresikan TIMP-1 pada Jaringan Hati.....	70



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Sel-Sel Hati dan Sinusoid Hati pada Hati Normal dan Terluka .....	12
Gambar 2.2 Hubungan antara Makrofag dan Biologi ECM selama Pembentukan Fibrosis dan Resolusi Fibrosis .....	13
Gambar 2.3 Perbandingan Kadar TIMP dan MMP.. .....	30
Gambar 2.4 Dua Struktur Domain dari TIMP-1 .....	33
Gambar 2.5 Skema Loop Autokrin aHSC untuk Bertahan Hidup .....	42
Gambar 2.6 Representasi Skematis dari Model yang Diusulkan yang Menghubungkan Apoptosis Hepatosit dengan Peradangan dan Fibrosis.....	43
Gambar 5.1 Hasil Pengamatan Histopatologi Hati Tikus Model Fibrosis Hati dengan Pengecatan <i>Masson's Trichrome</i> (MT) Perbesaran 40x dengan Skala 200µm.....	66
Gambar 5.2 Grafik Rerata Ekspresi TIMP-1 Pada Jaringan Hati Tikus dengan Model .....	67
Gambar 5.3 Hasil <i>Immunofluorescence</i> dari Jaringan Hati pada Tikus Model Fibrosis Hati dengan berbagai dosis ekstrak daun <i>Moringa oelifera</i> pada Perbesaran 200x.....	68
Gambar 5.4 Grafik Korelasi Dosis Ekstrak Daun <i>Moringa oleifera</i> dengan Jumlah Sel yang Mengekspresi TIMP-1 Pada Jaringan Hati Tikus dengan Model Fibrosis.....	71

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Data hasil Uji statistiK Ekspresi TIMP-1 .....	85
Lampiran 2. Data Berat Badan Tikus.....	87
Lampiran 3. Dokumentasi Kegiatan.....	88
Lampiran 4. Lembar Kelayakan Etik.....	90



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Fibrosis hati merupakan hasil dari peningkatan dan perubahan protein extracellular matrix (ECM) dalam proses pembentukan skar karena kerusakan hati kronik (Ismail dkk, 2009). Fibrosis hati disebabkan oleh sebagian besar tipe cedera hati kronik. Penyebab dari fibrosis hati adalah multifaktor, yaitu faktor genetik, kebiasaan dan lingkungan seperti virus, konsumsi alkohol, dan penyakit metabolik (Ramon dkk, 2005 dan Brenner, 2013). Penyebab virus terbanyak adalah virus hepatitis B dan hepatitis C (Hung-Su, dkk 2014). Jika faktor ini ada terus menerus maka selama beberapa tahun akan terjadi proses fibrogenesis. Jika fibrogenesis terjadi sementara, maka fibrosis akan sembuh dan kembali seperti semula. Jika tidak dikontrol dengan baik dapat mengarah pada kondisi yang lebih parah yaitu sirosis hati (Duval, 2015; Liedtke dkk, 2013). Pada umumnya, pasien mulai timbul gejala saat sudah berkembang menjadi sirosis hati, sedangkan fibrosis masih asimtomatik (Potts dkk, 2015). Selain itu, juga dapat berkembang menjadi gagal hati, kanker, dan hipertensi portal (Koyama dkk, 2016).

Prevalensi fibrosis hati sulit untuk ditentukan karena sifatnya yang asimtomatis. Di Indonesia terdapat sekitar 3,5% rata-rata prevalensi sirosis hati pada seluruh pasien rawat inap penyakit dalam atau dari seluruh pasien penyakit hati yang dirawat rata-rata 47,4% (Sulaiman dkk, 2007; Kusumobroto, 2007). Indonesia adalah negara kedua tertinggi endemisitas hepatitis B setelah Myanmar diantara negara-negara asia tenggara (Depkes, 2014).

Pada proses fibrogenesis sel yang paling berperan adalah *Hepato Stellate Cell* (HSC). HSC diaktivasi oleh sitokin-sitokin yang dihasilkan oleh sel hati, sel kupffer dan sel T, ketika cedera hati (Liu, dkk 2012). *Extra cellular Matrix* (ECM) secara utama diproduksi oleh Hepato Stellate cell (HSC) yang teraktivasi. Pada proses perbaikan jaringan, molekul penting untuk mempertahankan ECM adalah *matrix metalloproteinase* (MMPs) (Caley dkk, 2014). Aktivitas katalitik MMPs tersebut dihambat oleh *Tissue Inhibitor Matrix Metalloproteinases* (TIMPs). TIMPs diekspresikan oleh HSC yang teraktivasi, pada fibrosis terjadi peningkatan ekspresi TIMP 1 dan TIMP 2 (Yoshiji dkk, 2000). Myofibroblas teraktivasi dan makrofag merupakan dua komponen penting pada *cirrhotic microenvironment*. Selama fibrogenesis hati TIMP-1 sangat kuat meningkat dalam jaringan hati dan serum pada pasien penyakit hati dan dalam model tikus fibrogenesis (Thielle, dkk, 2016).

Cara yang paling efektif dalam mencegah progresifitas dan penyembuhan fibrosis adalah mengobati etiologinya. Kesembuhan fibrosis sudah banyak dibuktikan pada animal model dan manusia. Percobaan dan pembelajaran obat antifibrotik pada manusia sudah dilakukan tetapi tidak dengan jelas terbukti efektif. Antifibrotik khusus hati yang tidak toksik, aman digunakan dalam waktu lama dan murah masih belum tersedia (Ismail dkk, 2009; Christian dkk 2015).

*Moringa oleifera* (MO) dapat ditemukan di banyak tempat di daerah tropis dan subtropis, yang mana dapat tumbuh diberbagai jenis tanah dan tahan terhadap musim kering selama 6 bulan (Basra dkk, 2016). Semua bagian tanaman MO memiliki banyak kandungan yang bermanfaat untuk kesehatan. Pada ekstrak etanol daun MO terdapat flavonoid, fenolat, *abthraquinone*,

*cardiac glycosides* alkaloid, *triterphenoid*, *saponins* dan *tannin* (Sulistyorini, 2015). Flavonoid mempunyai aktivitas sebagai antioksidan yang mampu menekan radikal bebas (ROS). Quercetin merupakan salah satu flavonoid yang berkhasiat sebagai antioksidan. Flavonoid quercetin ditemukan dengan konsentrasi yang tinggi pada daun *Moringa oleifera* (Sulistyorini dkk, 2015).

Peran antioksidatif pada ekstrak daun MO diduga dapat digunakan dalam pencegahan fibrosis hati karena Reactive Oxygen Species (ROS) mempunyai peran penting dalam fibrosis hati. ROS dihasilkan dari hepatosit yang cedera dan sel kupffer yang selanjutnya akan mengaktivasi HSC (Gandhi, 2012). Selain itu, peran antioksidan terutama fenol dapat berperan sebagai penginduksi apoptosis yang akan menyebabkan kematian sel (Sadek dkk, 2013). Selanjutnya, jika antioksidan mencegah terbentuknya ROS dan mencegah aktivasi HSC, serta terjadi apoptosis pada HSC yang teraktivasi maka ekspresi TIMP-1 akan mengalami penurunan.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat peran ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* dalam menurunkan kadar TIMP-1 jaringan hati tikus yang diinduksi CCl<sub>4</sub>?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan umum

Membuktikan adanya peran ekstrak etanol daun *Moringa Oleifera* terhadap penurunan ekspresi TIMP-1 jaringan hati pada tikus model akibat induksi CCl<sub>4</sub>.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengukur dan membandingkan ekspresi TIMP-1 jaringan hati tikus model fibrosis pada ke-5 kelompok yang berbeda
2. Mengetahui kolerasi antara dosis-dosis dengan ekspresi TIMP-1

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Manfaat Akademik

Menambah wawasan mengenai manfaat *Moringa oleifera* terhadap fibrosis hati serta hubungan ekspresi TIMP-1 dengan fibrosis hati.





## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Fibrosis hati

##### 2.1.1 Definisi Fibrosis Hati

Fibrosis hati adalah hasil dari peningkatan dan perubahan protein extracellular matrix (ECM) dalam proses pembentukan skar saat proses penyembuhan karena kerusakan hati kronik (Ismail dkk, 2005). Beberapa komponen ECM yang berperan dalam fungsi spesifik dan diferensiasi sel adalah kolagen, fibronektin dan laminin. Selanjutnya remodeling ECM yang terus menerus selama cedera hati kronik menyebabkan perubahan dan akumulasi dari protein, proteoglikan dan karbohidrat ekstraseluler yang akhirnya menjadi fibrosis (Baiocchi dkk, 2016).

Fibrosis hati dilaporkan memiliki morbiditas dan mortalitas yang tinggi, terutama jika telah berkembang menjadi sirosis. Fibrosis hati membutuhkan rentang waktu sekitar 15-20 tahun untuk berkembang menjadi sirosis pada kebanyakan pasien. Meningkatnya penyakit metabolik dan obesitas diprediksikan akan meningkatkan prevalensi fibrosis hati (Bataller, 2005; Duval 2015).

##### 2.1.2 Etiologi Fibrosis Hati

Etiologi dari fibrosis hati dipengaruhi oleh lingkungan juga genetik. Infeksi virus hepatitis B dan C, penyalahgunaan alkohol dan NFLD (*Non alcoholic Fatty Liver Disease*) menjadi penyebab utama fibrosis hati (Reyes dkk, 2006). Studi epidemiologi sudah mengidentifikasi polimorfisme dalam sejumlah gen yang dapat mempengaruhi progresi dari fibrosis hati pada manusia. Faktor genetik ini dapat

menjelaskan mengenai respon spektrum luas pada etiologi yang sama pada pasien penyakit hati kronik (Bataller, 2005).

NAFLD berhubungan dengan obesitas dan resistensi insulin dan dianggap sebagai manifestasi pada hati dari sindrom metabolik, yaitu kombinasi kondisi medis termasuk diabetes mellitus tipe 2, hipertensi, hiperlipidemia dan lemak visceral (Reyes dkk, 2006). Fibrosis hati yang disebabkan karena keracunan alkohol, berhubungan dengan metabolisme alkohol oleh *alcohol dehidrogenase* dan jalur sitokrom P450E1. Metabolisme ini menghasilkan bentuk reduksi dari NADPH, menstimulasi sintesis asam lemak dan menghambat oksidasi yang menghasilkan steatosis atau perlemakan hati (Lieber dkk, 2004).

Data dari percobaan model hewan dan klinis dari pasien dengan infeksi kronis HBV dan HCV menunjukkan bahwa inflamasi terkait sitokin termasuk sitokin pro inflamasi seperti *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) dan TGF- $\beta$  serta anti-inflamasi semacam IL-10 terlibat dalam perkembangan dan progresi fibrosis hati. Virus HBV rentan terhadap mutasi karena replikasi asimetrisnya melalui *reverse transcription* dari RNA *intermediate*, delesi HBV pra-S, mutasi *precore* (PC) dan *basal core-promoter* (BCP) terjadi dalam berbagai tahap dari infeksi hepatitis B kronis dan telah dikaitkan dengan perkembangan penyakit yang menjadi sirosis hati dan karsinoma hepatoselular. Kombinasi dari mutasi telah dikaitkan dengan perkembangan penyakit ini. Sedangkan protein HCV dapat menginduksi akumulasi dan degradasi lipid, dengan konsekuensi gangguan kompartementalisasi lemak dan metabolisme yang mendukung produksi ROS (Gutierrez-reyes dkk, 2006).

### 2.1.3 CCl<sub>4</sub> dalam Cedera Hati

CCl<sub>4</sub> sudah banyak digunakan sebagai zat untuk menginduksi kerusakan hati. Intoksikasi CCl<sub>4</sub> menyebabkan kerusakan hepatosit nekrosis, inflamasi dan fibrosis dan dapat diukur dengan peningkatan marker serum dari cedera hati dan histologi hati. Stres oksidatif terjadi saat kerusakan hati, ditandai dengan penurunan rasio GSH/GSSG. CCl<sub>4</sub> menginduksi fosforilasi NF-κB yang meregulasi sitokin. Sitokin yang ditemukan adalah TNF-α, IL-β dan IL-6 dengan kadar yang tinggi (Gordillo, 2007; Constandinou, 2005). CCl<sub>4</sub> diaktivasi oleh sitokrom P450 (CYP)2E1 dan sangat sedikit oleh CYP2B dan CYP3A, untuk membentuk radikal bebas CCl<sub>3</sub> (Knockaert dkk, 2011). Secara umum CCl<sub>4</sub> menyebabkan hepatotoksis dari metabolisme CCl<sub>4</sub> oleh NADPH-cytochrome P450 system dengan mentransfer elektron dari NADPH ke CCl<sub>4</sub> menjadi CCl<sub>3</sub> (*trichloromethyl free radical*). Radikal bebas ini dapat menyebabkan kerusakan hati dengan menginisiasi peroksidasi lipid, mengikat protein secara kovalen, menyebabkan peningkatan Ca<sup>2+</sup> ekstrasel, penurunan *GSH releasing iron* dan akhirnya menyebabkan kematian sel (Zhu dkk, 2000).

Radikal CCl<sub>3</sub>, dengan adanya oksigen, diubah menjadi radikal triklorometil peroksi, CCl<sub>3</sub>OO. Radikal ini lebih reaktif dan lebih pendek daripada radikal CCl<sub>3</sub>. Masa hidup radikal ini berada dalam kisaran milidetik, dan mereka menghilang dari jaringan dengan bereaksi dengan substrat yang sesuai untuk merehabilitasi pasangan elektron mereka (Weber, 2003). Radikal triklorometilperoksi yang dapat menyerang lipid membran endoplasmik retikulum Ca<sup>2+</sup>, dan akhirnya menyebabkan kematian sel (Panjaitan, 2007). Kedua radikal, CCl<sub>3</sub> dan CCl<sub>3</sub>OO sangat reaktif sehingga dapat mengikat secara kovalen terhadap makromolekul untuk membentuk *nucleic acid*, *protein* dan *lipid adducts* (Knockaert dkk, 2011).

$\text{CCl}_3\text{OO}$  radikal menginisiasi peroksidasi lipid dengan mengeluarkan atom hidrogen dalam ikatan ganda PUFA (*Poly Unsaturated Fatty Acid*). Setelah proses peroksidasi lipid akhirnya terdegradasi menjadi molekul kecil seperti MDA atau *4-hydroxynonenal* (HNE), yaitu aldehid yang sangat reaktif yang dapat membentuk *protein* dan *DNA adducts* (Knockaert dkk, 2011). Pada penelitian, sudah digunakan antioksidan dan *radical scavenger* dalam mengatasi intoksikasi  $\text{CCl}_4$  untuk memproteksi sel hati dengan memecah rantai peroksidasi (Weber, 2003).

Karbon tetraklorida merupakan penyebab kerusakan hati yang ditandai dengan peradangan akut pada sel-sel hati, yakni terjadinya nekrosis serta steatosis pada bagian sentral lobus. Penelitian yang dilakukan oleh Panjaitan dkk, pada tahun 2007 membuktikan bahwa dengan menyuntikan  $\text{CCl}_4$  pada tikus menggunakan dosis 1 ml/KgBB dan 10 ml/KgBB terjadi steatosis pada hati (Panjaitan dkk, 2007). Awal kerusakan dalam  $\text{CCl}_4$  menginduksi steatosis hati adalah dengan dihambatnya sekresi lipoprotein dari hepatosit kedalam sirkulasi. Perluasan pembentukan fatty liver karena induksi  $\text{CCl}_4$  berhubungan terhadap jumlah produksi metabolit reaktif  $\text{CCl}_4$ .  $\text{CCl}_4$  sangat kuat menurunkan sekresi VLDL dari hepatosit. Penelitian sudah membuktikan bahwa fase awal dari keracunan akut  $\text{CCl}_4$  adalah terganggunya fungsi apparatus golgi dalam hati. Aparatus golgi berperan penting dalam sintesis, maturasi dan sekresi dari VLDL (Weber, 2003) .

## 2.2 Patogenesis Fibrosis Hati

Fibrosis hati adalah cedera hati yang disebabkan oleh stimulus kronik karena virus, penyakit metabolik, parasit, autoimun, obat (Duval dkk, 2014). Virus hepatitis menyebabkan aktivasi sel T dengan pengerahan sel inflamasi lain. Patogenesis HCV juga terkait erat dengan stres oksidatif dan disfungsi mitokondria. Pada NAFLD, selain TGF- $\beta$  yang memegang peranan penting dalam

aktivasi HSC, juga terdapat jalur lainnya, termasuk *the hedgehog* (Hh), PI3K/AKT dan JAK/STAT. Cedera hati yang dimediasi alkohol menyebabkan produksi TGF- $\beta$  oleh HSC sehingga menghambat efek antifibrogenik dari sel NK. Perlu ditekankan bahwa beberapa jenis sel yang berbeda berperan dalam cedera. Misalnya, luka pada sel endotel, baik secara langsung maupun tidak langsung, menghasilkan matriks ekstraselular yang abnormal, yang pada akhirnya merangsang fibrogenesis (Rockey, 2003 dan Elpek, 2013).

Patogenesis dari fibrosis hati sangat kompleks dan dipengaruhi oleh banyak tipe sel yang berbeda saling berinteraksi sebagai respon terhadap cedera, pusat dari patogenesis tersebut adalah aktivasi dari HSC (Ismail, 2009). HSC adalah tempat penyimpanan vitamin A, berada di antara hepatosit dan sel sinusoid endotel. HSC teraktivasi menjadi myofibroblas yang mempromosikan fibrogenesis hati. Selama terjadi cedera, sel ini berdiferensiasi menjadi myofibroblas yang sangat proliferasif dan memproduksi ECM. Sel lain yang memproduksi kolagen dalam fibrosis hati adalah portal fibroblas, *bone marrow-derived cells mesenchymal stem cell* (MSC), fibroblast, sel hematopoietik, dan sel parenkim (Tacke, 2012).

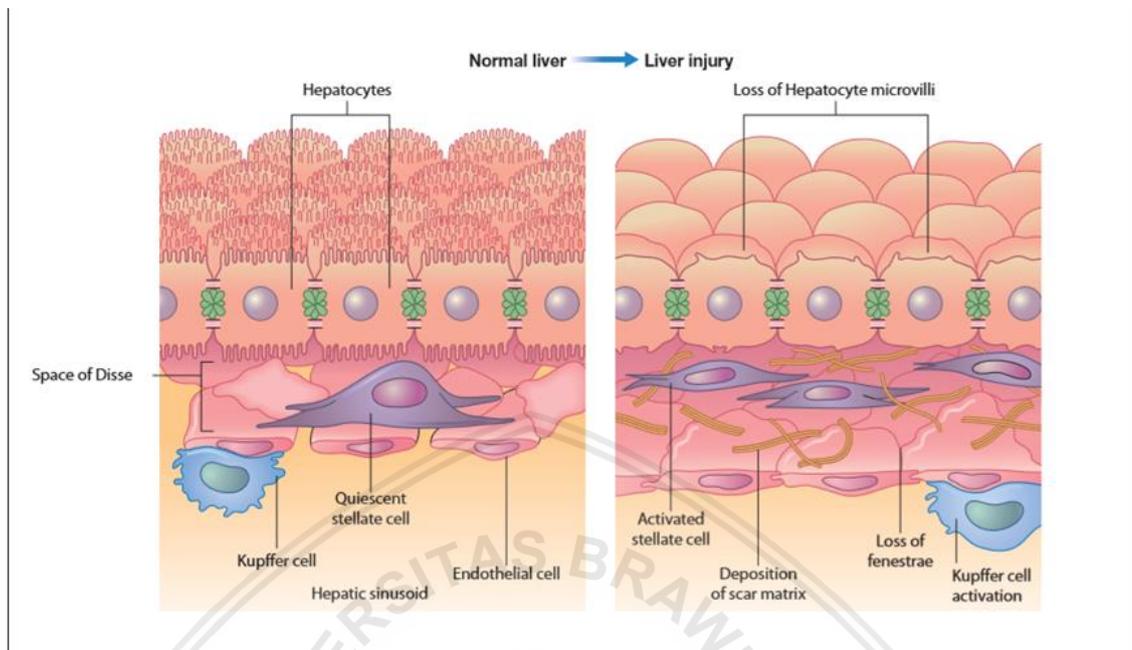
Pada umumnya saat kerusakan hati menjadi akut, terjadi proses penyembuhan melalui regenerasi sel parenkim dan menggantikan sel yang apoptosis atau nekrosis, yang juga berhubungan dengan respon inflamasi. Pada sel hati normal terdapat ECM, terdiri dari kolagen tipe I, III, IV, V, VI dan non kolagen glikoprotein yaitu laminin, hyaluronan, elastin, fibronectin serta proteoglikan. Pada bagian basal sel sinusoid normal terdapat laminin dan kolagen tipe IV, yang mana saat fibrogenesis digantikan oleh kolagen tipe I dan III. Endotel sinusoid hilang dan mikrovili hepatosit rusak sehingga menyebabkan akumulasi ECM. Sumber

komponen ECM terbanyak adalah HSC teraktivasi. HSC adalah sel mesenkim yang terletak diantara sel endotel hepatosit dan sel palisade hepatosit (Iredale dkk, 2012; Elpek, 2013; Duval dkk, 2014)

Remodeling ECM berperan penting saat terjadi cedera hati. Homeostasis remodelling ECM bergantung pada keseimbangan antara MMP dan TIMP. Aktivitas MMP dikendalikan oleh TIMP dalam kondisi fisiologis. MMP, terutama MMP-1, 2, 8 dan 13 akan mengendalikan penigkatan ECM dan TIMP (TIMP-1 dan TIMP-2) berkorelasi dengan progresifitas fibrosis. TIMP-1 menginduksi fibrogenesis dengan mempromosikan kelangsungan hidup sel (antiapoptosis). Telah ditunjukkan bahwa TIMP-1 eksogen menghambat apoptosis dari berbagai jenis sel, termasuk sel stellate hati dan sel endotel, yang mendukung pandangan bahwa ekspresi basal TIMP-1 yang terdeteksi pada hati naif dapat berkontribusi pada kelangsungan hidup sel hati. Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa regulasi TIMPs pada HSCs dapat mempercepat eliminasi jaringan hati fibrotik dan pembalikan fibrosis (Elpek, 2013; Duarte dkk, 2015). MMP yang paling relevan adalah gelatinase A (MMP-2) dan gelatinase B (MMP-9). MMP-2 disekresikan oleh HSC teraktivasi dan MMP-9 secara utama disekresikan oleh sel Kupffer aktif (Liu dkk, 2012).

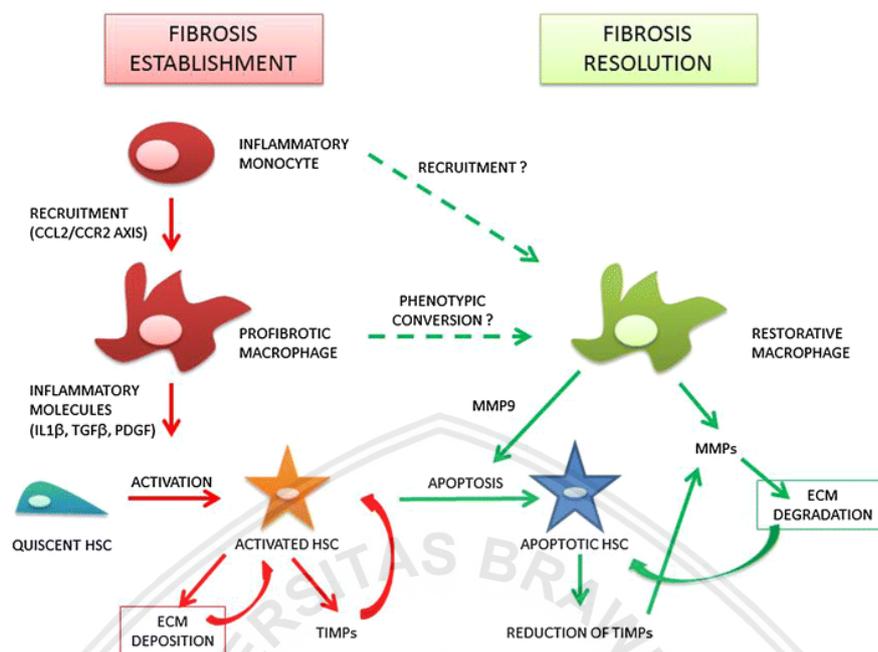
Dalam keadaan normal, HSC yang tidak aktif merupakan tempat reservoir retinoid terbesar tubuh. Saat terjadi respon inflamasi yang merupakan hal penting dalam fibrosis hati, HSC diaktivasi oleh banyak sitokin, kemokin dan faktor pertumbuhan yang dihasilkan dari sel disekitarnya seperti sel hepatosit, sel kupffer, sel T, dan NK (Liu dkk, 2012, Rockey dkk, 2013). Sel kupffer adalah makrofag residen yang memainkan peran penting dalam inflamasi dengan memproduksi ROS dan sitokin (Bataller, 2015). Menurut penelitian, penurunan

jumlah sel Kupffer menyebabkan aktivasi HSC menurun. Maka sel kupffer memainkan peran penting dalam aktivasi HSC (Duval, 2015). Sel hepatosit yang rusak menghasilkan TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IGF, dan EGF. Selain itu menyebabkan sel Kupffer teraktivasi sehingga kupffer mengeluarkan IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  dan IGF, yaitu sitokin berbahaya yang akan menyebabkan kerusakan hepatosit yang lebih lanjut (Muriel dkk., 2001; Liu dkk, 2012). Sel T menghasilkan IL-6 dan INF- $\gamma$ . Sitokin-sitokin ini mengubah *quiescent cell* HSC menjadi aktif yang dapat mensintesis dan menghasilkan komponen-komponen ECM terutama kolagen tipe I dan III (Liu dkk, 2012). Selain itu pengaktifan ini menyebabkan aktivasi protein otot polos yaitu otot polos alfa aktin. Akhirnya HSC menjadi HSC teraktivasi, disebut juga myofibroblas. Pengaktifan HSC ini paling sering terjadi karena cedera hati atau inflamasi (Rockey dkk, 2013). Aktivasi tersebut seacara konsep dapat dibagi menjadi dua tahap, yaitu: *initiation* (preinflamsi) dan *perpetuation*. Pada proses *initiation* perubahan awal dalam ekspresi gen dan fenotif mengakibatkan sel merespon terhadap sitokin dan stimulus lain, serta dihasilkan dari stimulus parakrin, sedangkan *perpetuation* adalah hasil dari stimulus dalam mempertahankan fenotif aktif dan menimbulkan fibrosis serta melibatkan autokrin dan parakrin (Rockey, 2013).



**Gambar 2.1 Sel-Sel Hati dan Sinusoid Hati pada Hati Normal dan Terluka (Rockey dkk, 2006)**

Pada panel kiri ditampilkan beberapa elemen seluler spesifik hati pada hati normal, yaitu hepatosit, sel endotel, sel Kupffer, dan sel stellata. Sel-sel Stellata terletak di dalam ruang subendotelial Disse (yaitu antara endotelium sinusoidal dan hepatosit). Gambar tersebut menekankan hubungan fisik yang erat antara berbagai elemen seluler di hati. Setelah cedera hati, perubahan dalam banyak sel terjadi; misalnya, sel-sel stellata dan Kupffer menjadi teraktivasi, hepatosit kehilangan mikrovili mereka, dan sel endotel kehilangan fenestrae karakteristiknya. Semua fitur ini berkontribusi pada aktivasi dan cedera sel yang berkelanjutan, serta disfungsi di seluruh tingkat organ (Rockey dkk, 2006).



**Gambar 2.2. Hubungan antara Makrofag dan Biologi ECM selama Pembentukan Fibrosis dan Resolusi Fibrosis (Campana dkk, 2015)**

Selama fibrogenesis, monosit inflamasi direkrut ke hati yang sedang inflamasi, sehingga menimbulkan populasi makrofag pro-fibrotik. Makrofag pro-fibrotik mengekspresikan mediator inflamasi seperti IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , dan PDGF, yang mempromosikan aktivasi HSC. HSC yang diaktifkan mensintesis ECM dan TIMP-1. Baik interaksi TIMP-1 dan ECM mempromosikan persistensi fenotip myofibroblast yang diaktifkan. Selama resolusi fibrosis, ada perubahan fenotip makrofag (Campana dkk, 2015).

Proses apoptosis dari hepatosit yang merupakan hal umum dari cedera hati dimediasi oleh Fas dan mungkin juga melibatkan *TNF-Related-apoptosis-inducing ligand* (TRAIL). Data saat ini menunjukkan bahwa badan apoptosis dibersihkan oleh HSC merupakan respon profibrogenik dan mengaktifkan sel kupffer. Apoptosis yang merupakan respon profibrogenik yang sama dapat juga diobservasi berdasarkan kerusakan BCL-XL (mediator anti apoptosis) (Elpek, 2013). Dengan

demikian, menghambat akumulasi aHSC dengan memodulasi aktivasi dan proliferasi, mempromosikan apoptosis aHSC dan menghambat inflamasi merupakan strategi dalam terapi fibrosis hati (Bataller, 2015).

### 2.2.1 Hepatosit dalam Fibrosis Hati

Sebagian besar fungsi hati dilakukan oleh hepatosit, sel parenkim hati, yang menyumbang sekitar 60% dari total sel hati dan 80% dari total volume hati. Hepatosit adalah sel epitel yang sangat terpolarisasi dan membentuk tali Hepatosit normal berbentuk kuboid dan tersusun dalam palisade di sepanjang sinusoid, kontak dekat dengan darah sinusoidal (Gandhi, 2012;).

Dalam perkembangannya penyakit hati kronis menjadi fibrosis, semua sel hati mengalami perubahan spesifik. Termasuk hepatosit yang cedera dan akhirnya apoptosis. Hepatosit yang rusak memproduksi ROS dan sitokin. Hipotesis saat ini yang berkaitan dengan apoptosis hepatosit dengan fibrosis adalah bahwa ketika hepatosit menjalani apoptosis, mereka menghasilkan badan apoptosis. Badan apoptosis ini difagositosis oleh sel Kupffer, sel stelata hati, dan hepatosit. Fagositosis menghasilkan kemokin dan sitokin, termasuk MIP-2, TGF- $\beta$ , dan sel Kupffer yang pada gilirannya mengaktifkan sel-sel stelata hepatic yang mengarah ke fibrosis (Brenner, 2009).

Peradangan dan perbaikan kronis menyebabkan akumulasi komponen ECM yang berlebihan, seperti fibronektin, kolagen, dan proteoglikan, yang merupakan pemain utama dalam pembentukan jaringan parut. ECM yang terakumulasi dalam periportal dan ruang perisinusoidal mengganggu fungsi hepatosit (Brenner, 2009 dan Duarte dkk, 2015). HSC mengekspresikan kolagen tipe III dan IV dan laminin, endotel sel mengekspresikan kolagen IV, dan hepatosit mengekspresikan fibronektin (Zeisberg dkk, 2007). Hepatosit juga terlibat dalam

*remodelling* ECM terlepas dari fungsi HSC, yaitu dengan memproduksi MMP yang diregulasi oleh CD146 (Calabro dkk, 2014)

Baru-baru ini, dijelaskan bahwa selain ROS dan sitokin yang diproduksi oleh hepatosit yang dapat mengaktivasi HSC dalam fibrogenesis, lipofagi juga telah diusulkan secara signifikan terlibat dalam aktivasi HSC. Lipofagi adalah proses autofage yang dapat menghidrolisis trigliserida dalam hepatosit (Arriazu 2009).

Terdapat banyak literatur yang menunjukkan bahwa aktivitas MMP dalam hati menurun seiring dengan perkembangan fibrosis. Ini mungkin hasil dari ekspresi dari penghambat MMP yang kuat yaitu TIMP dan  $\alpha$ 2-makroglobulin oleh sel-sel stellate dan hepatosit. TIMP-1 dapat diekspresikan oleh hepatosit sebagai gambaran respon fase akut.  $\alpha$ 2-makroglobulin juga telah terbukti diekspresikan dan disekresikan oleh sel-sel stellata dan hepatosit (Alcolado dan Iredalle, 1997)

### **2.2.2 Sel Kupffer dalam Fibrosis Hati**

Sel Kupffer adalah makrofag residen terlokalisir dalam lumen sinusoid hati, terhitung sekitar 30% dari non-parenkim hati. Keberadaan sel Kupffer ditandai dengan tingginya fagosit, presentasi antigen dan kapasitas *pinocytotic*. Sel Kupffer melepaskan beragam mediator terlarut, termasuk ROS, sitokin, faktor pertumbuhan, siklooksigenase dan metabolit lipoksigenase serta MMP dan TIMP, semuanya menyediakan efek parakrin yang beragam secara fisiologis dan sangat penting pada semua sel hati lainnya. Sel Kupffer adalah pusat respons homeostatik hati terhadap cedera, seperti pada perubahan degeneratif pada hepatosit mereka segera berespon terhadap gangguan atau cedera dan melepaskan mediator untuk mengatur respon inflamasi dan perbaikan. Selain itu, pada cedera hati, terutama pada fase akut, sel-sel Kupffer dan hepatosit dapat

berkontribusi pada produksi TIMP-1, ekspresi tersebut dikonfirmasi dalam model hewan cedera hati kronis (Arriazu dkk, 2014 dan Hemman dkk, 2007).

Peningkatan sel Kupffer bertepatan dengan munculnya penanda aktivasi HSC. Sel Kupffer merangsang sintesis matriks, proliferasi sel dan pelepasan retinoid oleh HSC. Sel Kupffer menghasilkan ROS, yang pada gilirannya dapat meningkatkan aktivasi HSC dan sintesis kolagen tipe I baik secara langsung pada dua promotor kolagen tipe I (Col1a1 dan Col1a2) atau dengan menginduksi sitokin profibrogenik. Sel kuffer juga menghasilkan oksida nitrat, yang dapat mengimbangi efek dari ROS dengan mengurangi proliferasi HSC, kontraktilitas dan sintesis kolagen tipe I; namun, *nitric oxide* saat bereaksi dengan radikal superoksida ( $O_2^{\cdot-}$ ), menghasilkan *peroxynitrite*, yang memiliki efek profibrogenik utama pada HSC (Arriazu dkk, 2014). Sedangkan pada saat resolusi HSC, sel Kupffer bergungsi dalam mempercepat degradasi matirks, terutama melalui peningkatan MMP-13 (Friedman, 2008). Sampai saat ini, informasi tentang komunikasi antar sel antara Sel Kupffer dan HSC masih terbatas, serta mekanisme molekuler di mana mediator yang diturunkan sel Kupffer memodulasi respons fibrogenik pada HSC (Arriazu dkk, 2014).

Sel Kupffer, makrofag residen spesifik-hati, tidak hanya memainkan peran sentral dalam respons untuk cedera tetapi juga bertindak sebagai generator ROS, terutama oleh aktivitas NADPH fagositik. Setelah aktivasi oleh rangsangan profibrogenik, seperti alkohol dan endotoksin. Sel Kupffer melepaskan / mengekspresikan mediator yang aktif secara biologis (kemokin, sitokin, adhesi molekul, dan ROS) ke hepatosit yang berdekatan dan HSC untuk memediasi cedera dan fibrogenesis. Komunikasi antar sel melalui ROS ditunjukkan dalam model kultur dengan menggunakan sel Kupffer tikus primer dan HSC yang

mengalami proliferasi dan aktivasi diamati dalam kultur HSC / sel Kupffer, dibandingkan terhadap HSC sendiri. Pensinyalan ini dimediasi oleh produksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oleh sel Kupffer. Demikian pula dalam model kelinci NASH, ditemukan bahwa sel Kupffer berperan penting dalam pembentukan peroksida lipid, yang mengarah ke steatosis hati. Selanjutnya, pengukuran stres oksidatif pada tikus pascakemik model hati menunjukkan bahwa hubungan parakrin antara sel Kupffer diaktifkan dan hepatosit adalah peristiwa utama dalam induksi stres oksidatif sebelum pengembangan cedera hati. Selain itu, sel Kupffer terbukti menjadi sel efektor sentral yang bertanggung jawab untuk stres oksidatif yang diinduksi oleh berbagai racun pro-fibrogenik seperti besi, tembaga, dan diklorobenzena (Luangmonkong dkk, 2018).

### 2.2.3 Aktivasi HSC

Sel stelata hati (HSC), yang merupakan hampir 10% dari populasi sel hati, memainkan peran penting dalam fisiologi hati dan patologi. Secara fisiologis, HSC adalah jenis sel utama untuk menyimpan retinoid tubuh, mengatur aliran dan arsitektur darah hati, dan memengaruhi metabolisme dan fungsi hati dengan memproduksi berbagai mediator pertumbuhan, sitokin dan kemokin. Selama cedera hati, HSC diaktifkan dengan transdiferensiasi menjadi fenotip miofibroblastik (dikenal sebagai HSC teraktivasi). HSC teraktivasi sangat fibrogenik dan kontraktil, dan dengan demikian memainkan peran utama dalam fibrosis hati (Gandhi, 2012).

Berbagai mekanisme dan jalur pensinyalan terlibat dalam aktivasi HSC seperti faktor yang diproduksi oleh KC teraktivasi (ROS dan sitokin), hepatosit yang rusak (produk peroksidasi lipid, ROS, OPN dan HMGB1) dan badan apoptosis turunan hepatosit. Fagositosis tubuh apoptosis membuat HSC lebih

tahan terhadap ligan Fas dan tumor *necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) terkait apoptosis, meningkatkan kelangsungan hidup mereka sehingga respon fibrogenik terus menetap (Arriazu dkk, 2014). Aktivasi HSC menstimulasi pelepasan sitokin proinflamatori, menyebabkan peradangan yang mengawali fibrogenesis, apoptosis, dan nekrosis hepatosit. Selain itu, peradangan hati ini mendukung perekrutan sel-sel imun dan peradangan. Ketika sel-sel stelata hepatik dinonaktifkan, ini memfasilitasi penyelesaian fibrogenesis dan regresi matriks ekstraseluler (de Andrade dkk, 2015).

HSC teraktivasi adalah produsen utama ECM selama fibrogenesis hati. Meskipun TGF- $\beta$ , diproduksi oleh sel Kupffer dan hepatosit, dianggap sebagai aktivator utama HSC, ROS juga berkontribusi secara signifikan terhadap proses ini. Pada tikus yang diobati dengan karbon tetraklorida (CCl<sub>4</sub>), ekspresi  $\alpha$ -SMA, penanda aktivasi HSC, secara efektif menurun setelah perawatan dengan antioksidan vitamin *alpha-tocopherol*, sementara itu meningkat setelah perawatan dengan *prooxidant ferrous sulfate* (Lee and Friedman, 2011).

Sekali teraktivasi, HSC memproduksi berbagai macam senyawa termasuk faktor pertumbuhan, sitokin, kemokin dan peptida vasoaktif. Zat-zat ini juga mempunyai efek autokrin pada HSC sendiri. Perubahan seluler lainnya seperti berkurangnya vitamin A, peningkatan retikulum endotel kasar, peningkatan proliferasi, peningkatan reseptor sitokin dan peptida, dan peningkatan protein otot polos. Salah satu hasil utama dari HSC teraktivasi adalah sintesis ECM dan juga enzim pendegradasinya serta enzim penghambat degradasi yaitu MMP dan TIMP (Rockey dkk, 2013). Peningkatan proliferasi terjadi karena PDGF yang berperan secara autokrin dalam mitogenesis atau aktivasi. Serta bertambahnya sensitivitas terhadap endotelin-1 (ET-1) yang timbul dari stimulasi autokrin/parakrin. ET-1 juga

bertindak sebagai stimulus kontraksi sel stelata (Rockey dkk, 2013). Selain PDGF, mitogen lain yang menstimulasi proliferasi HSC adalah VEGF, trombin dan reseptornya, EGF, TGF- $\alpha$  dan  $\beta$ -FGF (Elpek, 2013).

Ada tiga fase yang penting dalam aktivasi HSC yang sesungguhnya saling tumpang tindih, yaitu fase inisiasi (pre-inflamasi) dan fase perpetuasi (fase pengkekalan) yang diikuti oleh fase resolusi apabila cedera hati mendapat penanganan yang cepat dan tepat.

#### a) Fase Inisiasi

Fase inisiasi adalah kejadian awal yaitu dimana HSC teraktivasi menjadi miofibroblas yang bersifat proliferasif, fibrogenik dan kontraktif. Ciri utama respon inisiasi ini adalah adanya induksi cepat akibat stimulus parakrin yang berasal dari hepatosit yang rusak, sel-sel inflamasi, sel-sel duktus biliaris serta perubahan awal komposisi ECM sehingga menyebabkan HSC menjadi lebih reaktif terhadap berbagai sitokin dan rangsangan lokal lainnya. Ketika jejas hati terjadi, stimulasi parakrin dilakukan oleh sel-sel yang berdekatan dengan HSC seperti sel endotelial dan hepatosit, platelet dan leukosit yang menginfiltrasi lokal cedera hati serta sel kupffer terhadap HSC (Lee and Friedman, 2011).

Stimulasi parakrin akibat inflamasi disebabkan adanya pelepasan berbagai sitokin yang dihasilkan oleh limfosit TH2 dan sel Kupffer. Selain itu sel kupffer juga menstimulasi pelepasan dan aktivitas berbagai faktor pertumbuhan dan menghasilkan faktor-faktor nekrosis, interferon, dan ROS serta peroksida lipid yang menyebabkan oksidasi. Akibat dari oksidan yang dihasilkan yaitu meningkatnya sintesis kolagen oleh HSC (Bemion and Arthur, 2001).

#### b) Fase Persuasi

Jika rangsangan ini terjadi terus menerus maka akan mengarah ke fase perpetuasi yaitu berupa respon seluler yang distimuli secara autokrin dan parakrin. Terdapat enam perubahan yang menstimulasi terjadinya fase perpetuasi yang merupakan hasil stimulasi parakrin dan autokrin terhadap HSC, yaitu proliferasi, kemotaksis, fibrogenesis, peningkatan kontraktilitas, peningkatan sinyal proinflamasi, dan degradasi matriks yang diatur oleh MMP dan antagonisnya yaitu TIMP terjadi pada akhir fase persuasi (Lee and Friedman, 2011; Friedman, 2008).

#### c) Fase Resolusi

Pada fase resolusi ini jumlah HSC yang aktif berkurang dan integritas jaringan kembali normal. fase resolusi dimana terjadi perubahan HSC aktif menjadi inaktif dan apoptosis aHSC. Oleh karena itu, penghambat kolagenase yaitu TIMP tidak lagi ada. Hal ini memungkinkan kolagenase untuk mengekspresikan aktivitas enzim mereka dan menurunkan ECM pada fibrosis. Diketahui bahwa apoptosis pada cedera hati dihambat oleh berbagai faktor proses inflamasi, dimana yang berperan penting dalam menghambat apoptosis adalah IGF-1 dan TNF- $\gamma$  (Lee and Friedman, 2011; Friedman, 2008).

#### **2.2.4 Apoptosis HSC**

Selama apoptosis, sel terfragmentasi menjadi badan membran kecil, yaitu badan apoptosis, yang mengekspresikan fosfatidilserin pada bagian luar membran plasma sel dan dihilangkan dengan fagositosis. Apoptosis dapat terjadi melalui 2 jalur dasar: (1) kematian jalur reseptor atau ekstrinsik; dan (2) jalur intrinsik berbasis organel intraseluler. qHSC memiliki pergantian sangat rendah, oleh karena itu, apoptosis bukan hal yang menonjol dari tipe sel ini sampai "diaktifkan" saat cedera hati. Aktivitas apoptosis sel stelat mencerminkan keseimbangan

antara stimulasi apoptosis dan sinyal untuk bertahan hidup. Stimulus apoptosis meliputi reseptor kematian, Fas, dan TRAIL-R2 (Canbay dkk, 2008).

Apoptosis aHSC adalah mekanisme yang paling baik untuk resolusi fibrosis. Watson dkk mengidentifikasi NF $\kappa$ B sebagai regulator utama untuk kelangsungan hidup dan proliferasi HSC oleh mempertahankan ekspresi molekul anti-apoptosis BCL-XL2. Penghambatan NF $\kappa$ B jalur meningkatkan apoptosis HSC dengan peningkatan regulasi JNK baik pada manusia maupun pada tikus. C / EBP $\beta$  telah dikaitkan dengan kelangsungan hidup HSC dan apoptosis pada fibrosis hati. C / EBP $\beta$  diaktifkan caspase 8-dependent apoptosis, yang diinaktivasi oleh ribosomal S-6 Kinase (RSK) fosforilasi. Buck dan Chojkier mendemonstrasikan bahwa bentuk non-terfokus pada Tikus C / ebp $\beta$  Tg melindunginya dari fibrosis hati yang diinduksi CCl<sub>4</sub> dengan menginduksi apoptosis HSC (Arriazu dkk, 2014).

Farnesoid X receptor (FXR) adalah faktor transkripsi yang diatur ligan, yang bertindak sebagai sensor untuk asam empedu. Fiorucci dkk menunjukkan bahwa kaskade regulasi FXR-*small heterodimer partner* memodulasi ekspresi TIMP-1 dan MMP di HSC dan mempromosikan resolusi fibrosis hati. Mekanisme ini memblokir pensinyalan anti-apoptosis TIMP-1 dan memodulasi kepekaan terhadap sinyal apoptosis lainnya di HSC. Perawatan in vivo dengan FXR ligan terlindungi dari fibrosis hati dan membantu resolusi fibrosis (Arriazu, dkk 2014)

HSC secara ideal diposisikan untuk menelan badan apoptosis melalui kedekatannya dengan hepatosit, sumber utama partikel apoptosis selama cedera hati. Sel-sel stellata dapat memiliki lebih banyak fungsi fagositosis daripada yang sebelumnya. Sebagai contoh, HSC tidak hanya dapat memfagosit badan apoptosis, tetapi HSC juga mengekspresikan nikotinamid adenin dinukleotida

fosfatoksidase, suatu enzim yang biasanya dikaitkan dengan fungsi fagositik (Canbay dkk, 2008).

Degradasi matriks muncul untuk mempromosikan apoptosis HSC. Apoptosis HSC berperan penting dengan menghilangkan sel yang memproduksi matriks dan TIMP. Pengobatan TIMP-1 pada HSC teraktivasi memberikan efek anti apoptosis yang beroperasi melalui kemampuannya untuk menghambat aktivitas MMP. Eksperimen *Invivo* mengkonfirmasi temuan ini. Pada tikus, di mana hepatic TIMP-1 diekspresikan berlebihan oleh transgen TIMP-1 spesifik-hati yang secara kronis dicerai dengan CCl<sub>4</sub> dibandingkan dengan tikus tipe liar karena kemampuan untuk menjalani resolusi spontan dari fibrosis setelah penghentian cedera (Elsharkawy dkk, 2005).

Studi-studi ini menunjukkan bahwa melalui cedera hati, HSC diaktifkan dan distimulasi untuk mengeluarkan jumlah kolagen-1 dan TIMP-1 yang semakin meningkat. Ini bertindak untuk melindungi sel dari apoptosis dan menjaga lingkungan fibrogenik melalui aksi integrin. Dengan resolusi fibrosis, sinyal survival HSC dihilangkan dan HSC menjalani apoptosis. Ini kemudian menghilangkan sumber kolagen dan TIMP dengan peningkatan yang dihasilkan dalam aktivitas MMP dan selanjutnya meningkatkan sinyal HSC. Ini mengarah pada apoptosis HSC lebih lanjut dan akhirnya resolusi secara histologis (Elsharkawy dkk, 2005). Degradasi matriks atau peningkatan apoptosis HSC kemungkinan dapat mengurangi fibrosis dan mengembalikan arsitektur dan fungsi hati (Henderson dkk, 2007).

#### **2.2.5 ECM dalam Fibrosis Hati**

Jaringan hati yang normal terdapat ECM yang terdiri dari tiga makromolekul yaitu kolagen, glikoprotein dan proteoglikan. Makromolekul paling dominan yang terdapat pada fibrosis hati adalah kolagen, terdiri dari kolagen interstisial atau fibrillar (kolagen tipe I, III) yang memiliki densitas tinggi dan kolagen membran basal (kolagen tipe IV) yang memiliki densitas rendah dan merupakan kolagen terbanyak pada jaringan hati yang normal. Pada fibrogenesis jumlah ECM meningkat 3 sampai 8 kali lipat, dimana kolagen tipe I dan tipe III menggantikan kolagen tipe IV (Bataller and Brenner, 2005; Friedman, 2008).

ECM membantu mempertahankan hidrasi dan homeostasis dan dengan berinteraksi dengan reseptor permukaan-sel dan komponen matriks itu mengatur diferensiasi sel, adhesi, proliferasi, migrasi, dan kelangsungan hidup. ECM juga mengikat dan mengeluarkan faktor pertumbuhan dan sitokin yang menggerakkan morfogenesis, fungsi sel, dan metabolisme. Regulasi *remodelling* ECM yang terkoordinasi dengan baik sangat penting untuk mempertahankan homeostasis dan mencegah timbulnya penyakit dan perkembangan penyakit (Arriazu, 20014). Dalam kondisi sakit, terjadi penurunan nilai dan / atau diskoordinasi pada enzim yang mengatur *remodelling* ECM menyebabkan gangguan dinamika ECM fisiologis, hilangnya arsitektur jaringan normal dan deposisi ECM patologis, yang semuanya berkontribusi pada patogenesis fibrosis, sirosis dan karsinoma hepatoseluler. Sebagai contoh, MMP-1 berkurang pada hati fibrotik sedangkan MMP-2 meningkat ketika fibrosis berkembang. Demikian juga, TIMP-1 dan ekspresi TIMP-2 secara signifikan meningkatkan fibrosis; dengan demikian, menghambat degradasi kolagen MMP dan menghasilkan peningkatan bersih dalam deposisi ECM (Arriazu dkk, 2014)

Terdapat dua macam degradasi ECM yaitu degradasi restoratif yang merusak kelebihan jaringan parut dan degradasi patologik yang merusak kolagen tipe IV oleh MMP-2 dan MMP-9 dimana kedua enzim ini, serta membran type metalloproteinase 1 dan 2 (aktivator MMP-2) (Friedman, 2008).

### 2.2.6 ROS dalam Fibrosis hati

Produksi lain dari HSC adalah ROS dalam responnya terhadap beberapa mediator fibrogenik seperti PDGF, TGF- $\beta$ , leptin dan angiotensin II. Selain itu ROS juga diproduksi oleh sel Kupffer dan infiltrasi leukosit selama peradangan hati, sel endotel sinusoidal, dan juga sel-sel inflamasi yang teraktivasi selama proses jejas hati. ROS juga menginduksi aktivasi dari HSC sehingga dengan begitu ROS meningkatkan akumulasi dari ekstraseluler matriks ke jaringan hati yang jejas. *Plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) juga meningkat akibat ROS yang mana fungsinya untuk menghambat degradasi dari ECM. ROS juga dapat meningkatkan ekspresi *fibrosis-associated genes*, termasuk TIMP-1 dalam HSC. Selama aktivasi, HSC mengekspresikan *DNA-methyl binding protein* (MeCP2). Protein ini menyebabkan gen antifibrogenik menjadi silent dan meningkatkan ekspresi dari *histone methyl transferases*, akhirnya meningkatkan transkripsi dari kolagen, TIMP-1 dan TGF- $\beta$  (Elpek, 2013 dan Gandhi, 2012).

Pada level seluler, ROS dihasilkan melalui kerusakan mitokondria atau aktivasi sitokrom P450, *xanthine oxidase* dan NADPH oksidase. Seperti pada cedera hati yang diinduksi alkohol, aktivasi sitokrom P450 adalah sumber terpenting ROS. Sudah dilaporkan bahwa penurunan sitokrom P450 menghambat ekspresi gen kolagen tipe I pada HSC. ROS dapat mengaktivasi sinyal jalur transduksi dan faktor transkripsi, termasuk JNK dan NF $\kappa$ B, sehingga ROS juga

meningkatkan regulasi ekspresi *fibrosis-associated genes*, termasuk COL1A1, COL1A2, MCP1 dan TIMP 1 pada HSC (Elpek, 2013).

ROS memengaruhi fungsionalitas beberapa sel spesifik-hati dan karenanya dapat berkontribusi terhadap perkembangan fibrosis. Dalam sel-sel parenkim hepatosit, organel dan enzim yang menghasilkan ROS banyak ditemukan. Setelah kematian hepatosit, beberapa mediator seperti tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) dan transformasi beta faktor pertumbuhan (TGF- $\beta$ ) dilepaskan untuk memperkuat respon inflamasi dan serat pada hepatosit yang berdekatan, sel Kupffer dan HSC. Perubahan oksidatif yang menginduksi apoptosis dan nekrosis hepatosit telah dipelajari secara luas, yang melibatkan peran stres oksidatif dalam mengatur siklus sel hepatosit. Meskipun hepatosit tidak dianggap sebagai sel efektor utama yang bertanggung jawab untuk perkembangan fibrosis, apoptosis hepatosit yang persisten sudah cukup untuk menginduksi respon fibrosis. Ini ditunjukkan pada tikus defisiensi-Bcl-xL, sebuah model eksperimental apoptosis spontan hepatosit, di mana laju apoptosis hepatosit berkorelasi dengan perkembangan fibrosis hati (Takehara dkk, 2004).

Untuk menghentikan stres oksidatif, Scavenger ROS telah menjadi strategi terapi andalan untuk waktu yang sangat lama. Meskipun demikian, beberapa percobaan klinis gagal dalam mengeksplorasi beragam penyakit karena terapi antioksidan konvensional tidak dapat secara optimal mengatur keseimbangan antara ROS yang berbahaya dan menguntungkan. Saat ini, beberapa sumber ROS intraseluler telah diidentifikasi terutama berkaitan dengan reaksi enzimatik spesifik. Generator ROS seperti mitokondria hepatosit dan retikulum endoplasma adalah situs utama untuk generasi ROS dalam berbagai bentuk penyakit hati yang menjanjikan target untuk pengobatan gangguan terkait stres oksidatif termasuk

fibrosis hati karena mereka tampaknya menghasilkan ROS berlebihan selama perkembangan penyakit hati kronis. Generator molekuler dan subseluler dari ROS yang secara nyata diekspresikan pada cedera hati dan dapat menjadi target terapi. Oleh karena itu, antioksidan sering digunakan untuk mengobati cedera hati oksidatif. Meskipun hasil praklinis menjanjikan terapi antioksidan dalam mengobati penyakit hati, bukti yang diperoleh dari studi klinis tidak jelas. Lebih lanjut, penyelidikan terperinci tentang mekanisme cedera hepatosit yang diperantarai ROS dan peran protektif antioksidan dapat memberikan wawasan tentang patogenesis cedera hepatosit dan membuka jalan baru untuk diagnosis dan pengembangan biomarker dan terapi farmakologis (Luangmonkong dkk, 2018 dan Jadeja dkk, 2017)

### **2.2.7 Inflamasi dalam fibrosis Hati**

Bentuk-bentuk cedera sel hati ini memulai serangkaian kejadian yang tidak tergantung pada dasar etiologis peradangan dan dapat menyebabkan fibrosis hati. Paparan hati yang terus menerus terhadap beberapa faktor, seperti virus, alkohol, lemak, metabolit biotransformasi, antara lain, dapat menyebabkan cedera hati, yang dapat menyebabkan peradangan dan degenerasi hati. Dalam kasus ini, umumnya, peradangan adalah fase pertama, dan berkembang menjadi fibrosis setelah stres oksidatif kronis. Peradangan hati umumnya terkait dengan nekrosis hepatosit dan apoptosis. Badan apoptosis yang berasal dari hepatosit yang rusak dapat mengaktifkan sel stelata hepatik yang diam dan sel Kupffer, dan populasi sel yang teraktivasi ini pada gilirannya dapat meningkatkan respons inflamasi dan fibrogenik. Aktivasi HSC menstimulasi pelepasan sitokin proinflamatori, menyebabkan peradangan yang mengawali fibrogenesis, apoptosis, dan nekrosis hepatosit. Sel-sel stelata hati yang teraktivasi juga dapat meningkatkan produksi

kemokin inflamasi, ekspresi molekul adhesi. dan presentasi antigen pada limfosit T dan sel T pembunuh alami.(Cjaza, 2014 dan Andrade dkk, 2015).

Berbagai faktor penyebab jejas hati akan mengeluarkan sinyal inflamasi dimana sinyal ini akan masuk melalui sirkulasi portal. Sinusoid hati terhubung langsung dengan sirkulasi portal, berfungsi sebagai penghalang pertama yang melawan rangsangan inflamasi ini. Sinusoid mengandung berbagai jenis sel, termasuk sel endotel sinusoidal, sel Kupffer, dan HSC. Sel Kupffer mendeteksi sel apoptosis di daerah hati yang jejas untuk menghasilkan berbagai sitokin dan kemokin yang mengaktifkan leukosit dan merekrut leukosit agar beredar ke daerah jejas. Dalam proses ini sel endotelial sinusoidal berperan merubah ekspresi protein adhesi yang membantu penarikan leukosit yang lewat untuk ditempatkan ke lokasi yang cedera (Fujita and Narumiya, 2016). Penurunan moderat kadar GSH intraseluler memiliki konsekuensi penting untuk berbagai fungsi leukosit, terutama yang lebih sensitif seperti proliferasi limfosit T dan aktivitas NK, tergantung pada IL-2. Peneurunan GSH sering dilihat sebagai konsekuensi dari peningkatan OS dan inflamasi (de Andrade dkk, 2015)

Sel Kupffer dan leukosit menyebabkan respon inflamasi menjadi lebih besar sehingga merusak sel endotel sinusoidal. Kemudian sel Kupffer dan leukosit ini memasuki ruang Disse dimana ruang ini adalah tempat HSC berada sehingga mendorong aktivasi dari HSC. HSC yang sudah diaktifkan, akan *transdifferentiate* menjadi aktivator miofibroblas positif  $\alpha$ -smooth muscle, yang akan meningkatkan jumlah ECM, sitokin proinflamasi dan profibrogenik, serta menyebabkan fibrosis hati (Fujita and Narumiya, 2016). HSC menghasilkan sejumlah peptida kemotaktik (terutama kemokin) yang memperkuat infiltrasi oleh sel-sel inflamasi dan juga berinteraksi langsung dengan subset limfosit (Friedman, 2008)

## 2.3 Tissue Inhibitor of Metalloproteinase dan Metalloproteinase

### 2.3.1 Tinjauan Umum Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)

*Tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) adalah gen yang mengkode protein, secara luas terdistribusi dalam kingdom animalia. Sampai saat ini, terdapat TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 dan TIMP-4 yang berfungsi untuk menghambat keluarga *metalloproteinase*, MMP dan ADAM (Brew dkk, 2010). Setiap TIMP adalah produk gen terpisah meskipun mereka memiliki fitur struktural yang sama. TIMP-1 dan TIMP-2 menampilkan homologi urutan asam amino 40% dan keduanya menunjukkan struktur tiga lingkaran yang distabilkan oleh enam ikatan disulfida (Campana dkk, 2013).

TIMPs adalah protein yang diekspresikan diberbagai jaringan yang bekerja sebagai penghambat *metalloproteinase* aktif dalam rasio terhadap MMP yaitu 1:1 stoikiometrik. Semua MMP dapat dihambat oleh setidaknya satu dari empat TIMP. Secara khusus, domain N-terminal dari molekul TIMP berinteraksi dengan lokasi aktif dari MMP, menghasilkan penghambatan aktivitas katalitik. Sehingga menghambat fungsi MMP sebagai pendegradasi ECM. Sementara TIMP1, -2, dan -4 disekresikan di dalam sel yang berfungsi dengan cara terlarut, TIMP3 dikenal terikat dengan glikosaminoglikan yang tersulfasi (GAG) terletak di ECM (Mascianotoni dkk, 2017 dan Campana dkk, 2013)

Setiap TIMP berisi dua domain yang berbeda, domain N- dan C-terminal, terhubung melalui enam ikatan disulfida yang dikonservasi, yang mengontrol fungsi dan lokalisasi TIMP. Domain N-terminal sangat penting untuk menghambat aktivitas *metalloproteinase* serta afinitas TIMPs untuk *metalloproteinase* spesifik (Masciantonio dkk, 2017).

### 2.3.2 Fungsi MMP

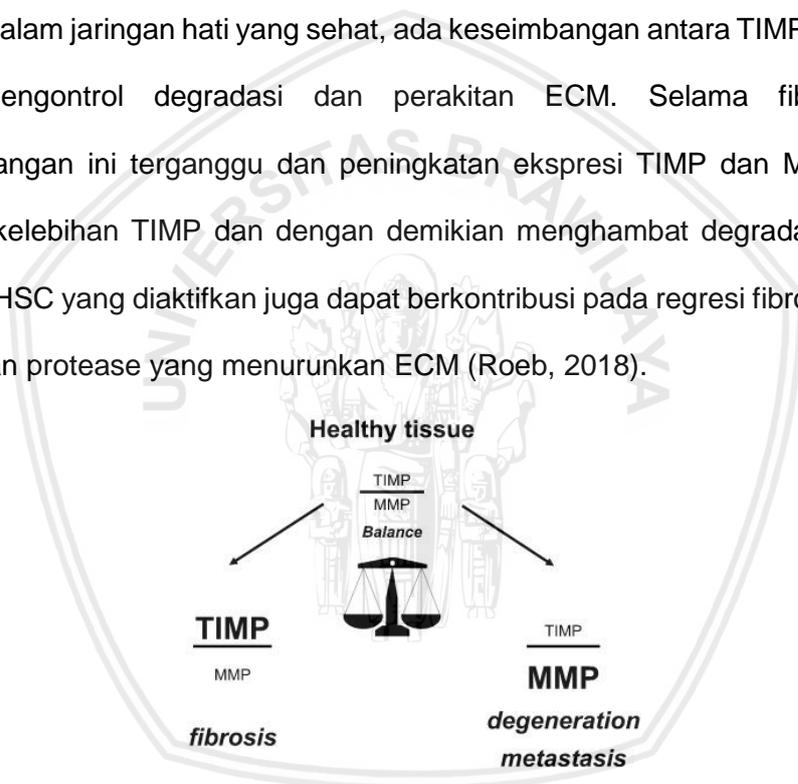
Cedera dan regenerasi hati berhubungan dengan jalur ECM. Abnormal degradasi dan penataan ulang ECM berkontribusi dalam berbagai penyakit hati. MMPs adalah enzim utama yang terlibat dalam degradasi ECM. MMP adalah enzim yang terlibat dalam meregulasi degradasi dan deposisi ECM yang penting dalam proses penyembuhan luka, baik akut atau pun kronik. MMP memainkan peran penting dalam penyembuhan luka tetapi ekspresi MMP yang berlebihan pada luka kronis dapat menghambat penutupan luka. Saat remodeling jaringan seperti pada penyembuhan luka, MMP dapat diekspresikan dan diaktifkan dengan cepat. MMP diekspresikan di jaringan oleh keratinosit, fibroblast, sel endotel, sel inflamasi seperti monosit, limfosit dan makrofag dalam level basal saat keadaan jaringan normal (Caley dkk, 2014). MMPs sudah di kategorikan menjadi 5 besar berdasarkan substrat spesifik: kolagenase, gelatinase, *membrane-type*, stromelysin dan matrilisin (Bourbouli dkk, 2010). MMPs terdiri dari lebih dari 24 endopeptidase bergantung yang mampu mendegradasi berbagai komponen ECM (Kessenbrock dkk, 2010).

MMPs tidak hanya meremodeling ECM tetapi juga meregulasi respon imun. MMPs terlibat dalam substrat non ECM, yaitu kemokin dan sitokin, dan memiliki fungsi regulasi dalam peradangan dan kekebalan (Duarte dkk, 2015; Kessenbrock dkk, 2010). Selain itu MMPs meregulasi jalur sinyal yang mengontrol pertumbuhan sel, inflamasi atau angiogenesis dan dapat juga bekerja dalam perilaku non proteolitik (Kessenbrock dkk, 2010). MMPs umumnya disekresikan ke lingkungan ekstraselular, atau ditambatkan ke membran sel, sebagai proenzim yang tidak aktif (Caley, 2014). Biologi MMPs agak rumit, karena MMP yang sama dapat memiliki efek yang berlawanan berdasarkan jenis atau jaringan sel (Martin dkk, 2007).

Sehingga, fungsi setiap spesifik MMPs tidak sama untuk setiap organ (Giannandrea dkk, 2014).

Studi struktural dari kompleks TIMP-MMP telah menjelaskan mekanisme penghambatan TIMP dan beberapa lokasi di mana mereka berinteraksi dengan enzim target, yang memungkinkan generasi varian TIMP yang secara selektif menghambat berbagai kelompok *metalloproteinase* (Brew dkk, 2010).

Dalam jaringan hati yang sehat, ada keseimbangan antara TIMP dan MMP, yang mengontrol degradasi dan perakitan ECM. Selama fibrogenesis, keseimbangan ini terganggu dan peningkatan ekspresi TIMP dan MMP terjadi dengan kelebihan TIMP dan dengan demikian menghambat degradasi matriks. Namun, HSC yang diaktifkan juga dapat berkontribusi pada regresi fibrosis melalui pelepasan protease yang menurunkan ECM (Roeb, 2018).



**Gambar 2.3. Perbandingan Kadar TIMP dan MMP (Roeb, 2018)**

### 2.3.3 MMP yang berperan dalam Fibrosis Hati

Metalloproteinase yang memiliki relevansi spesifik terhadap perkembangan penyakit hati termasuk yang diekspresikan pada awal cedera, terkait dengan peradangan dan kemungkinan penting untuk menurunkan ECM hati normal, yang terdiri dari kolagen tipe IV, laminin (misalnya, Gelatinase, MMP-2 dan 9) *stromelysins* dan *matrilysins* (misalnya, MMP-3 dan 7), dan MMP dengan

aktivitas spesifik terhadap komponen-komponen matriks matang dari fibrosis dan sirosis, yang diperlukan untuk degradasi jaringan fibrotik fibrilar yaitu, kolagenase interstisial sejati (mis., MMP 1, 8, dan 13), dan beberapa MMP tipe membran seperti MMP-12 (Campana dkk, 2013).

Pada hewan pengerat tidak diketahui ada homolog MMP-1 (kolagenase-1) manusia. Meskipun begitu, kesamaan fungsional ada pada MMP-13 pada tikus. MMP-13 diekspresikan oleh HSC, fibroblas, sel Kupffer dan sel perisinusoidal serta sintesisnya diregulasi oleh sitokin. Aktivasi MMP-1/MMP-13 biasanya terjadi dalam 2 langkah mekanisme melalui plasmin dan MMP-3 atau melalui MMP-14 dan MMP-2 tanpa adanya TIMP-2. Menariknya, MMP-1 pada manusia dihambat oleh TGF- $\beta$ , sedangkan ekspresi MMP-13 pada hewan pengerat tidak ditekan oleh TGF- $\beta$  pada fibrosis berat atau sirosis. MMP-1 mRNA meningkat di jaringan hati. Meski demikian, MMP-1 tidak terdeteksi dalam serum pasien ini. MMP-1, MMP-3 dan gen polimorfisme MMP-9 mungkin menjelaskan beberapa variabilitas dalam perkembangan penyakit hati kronik terkait HCV. Ekspresi berlebihan dari MMP-9 mampu untuk mengurangi kolagen tipe 1 dan konten hidroksirolin dari hati. MMP-9 secara tidak langsung dapat berkontribusi dalam fibrosis dengan mempercepat apoptosis HSC (Brew dkk, 2010).

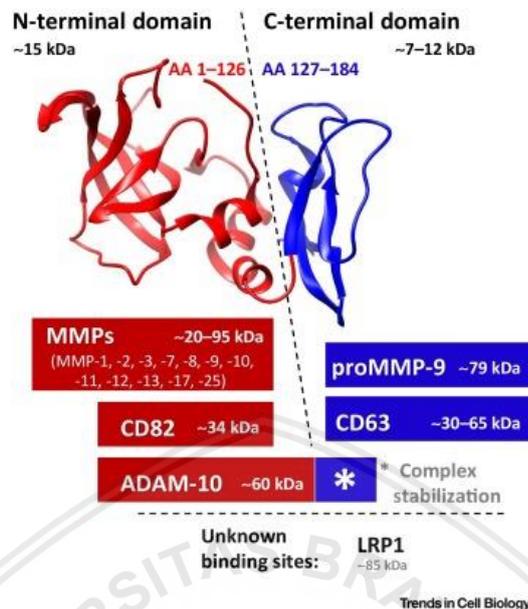
Di antara berbagai MMP, selain MT1-MMP dan MMP13, yang menunjukkan ekspresi yang relatif tinggi dalam aHSC, hanya MMP2, gelatinase, yang menunjukkan relevansi dengan kelangsungan hidup aHSC. Meskipun efeknya tidak penting dibandingkan dengan MT1-MMP dalam menekan pertumbuhan. Efek penekan pertumbuhan MMP-2 juga dicatat oleh Iredale dkk yang menyimpulkan bahwa efeknya mungkin dianggap berasal dari pembelahan N-cadherin pada membran aHSC. Namun, pada penelitian yang dilakukan oleh

Birukawa dkk adalah mekanisme penghambatan pertumbuhan oleh MMP-2 adalah menurunkan zat survival kolagen yang dibelah sebagian oleh MT1-MMP. Hal ini konsisten dengan hasil yang menunjukkan bahwa penambahan TIMP-1, yang diduga menghambat MMP-2, untuk aHSC yang diobati dengan siRNA<sub>g46</sub> mengembalikan pertumbuhan yang terganggu. Sebaliknya, siRNA<sub>TIMP-1</sub> menekan pertumbuhan aHSC (Birukawa, 2014).

## **2.4 Tissue Inhibitor Metalloproteinase-1**

### **2.4.1 Struktur dan Fungsi TIMP-1 sebagai Inhibitor Metalloproteinase**

Dua-Domain Struktur TIMP-1 Memfasilitasi Beberapa Interaksi. TIMP-1 terdiri dari sebuah domain N-terminal (merah) dan C-terminal domain (biru), yang memiliki kedua mitra protein-interaksi individu dan saling (interaksi N-terminal merah, interaksi C-terminal biru). N-terminal domain (AA 1-126) menghambat beberapa MMP. Domain C-terminal (AA 127-184) dari TIMP-1 tidak diperlukan untuk penghambatan MMPs. Domain N-terminal TIMP-1 tidak hanya bertanggung jawab untuk aktivitas antiproteolitik tetapi juga menengahi interaksi dengan tetraspanin CD82 sementara, menarik, situs interaksi dengan tetraspanin lain, CD63, sepenuhnya terbatas pada domain C-terminal TIMP-1. Selain itu, domain C-terminal sangat berinteraksi dengan domain hemopeksin dari proMMP-9. Penghambatan metalloproteinase membran-terletak ADAM-10 juga terjadi melalui domain N-terminal, tetapi pembentukan kompleks yang stabil membutuhkan kehadiran domain C-terminal (tanda bintang), dan ADAM-10 dengan demikian dibutuhkan interaksi kedua domain. Saat ini tidak diketahui, wilayah TIMP-1 yang secara fisik berinteraksi dengan LRP1.



**Gambar 2.4. Dua Struktur Domain dari TIMP-1 (Grünwald dkk, 2019)**

Singkatan: AA, asam amino; ADAM-10, sebuah disintegrin dan metaloproteinase 10; LRP1, LDL terkait reseptor-protein 1; MMP, matrix metalloproteinase; TIMP-1, inhibitor jaringan metalloproteinase 1.

TIMP secara umum menghambat 23 MMPs yang ditemukan pada manusia, tapi ada beberapa perbedaan spesifik diantara mereka. Spektrum penghambatan MP-TIMP-1 belum sepenuhnya dieksplorasi. Saat ini, TIMP-1 memiliki 14 target *metalloproteinases* yang diverifikasi secara eksperimental. TIMP-1 menghambat 10 dari 16 MMP larut yang diketahui saat ini (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, dan MMP-13). TIMP-1 tidak menghambat MMP-19. Sejauh ini, tidak diketahui adanya penelitian yang menguji penghambatan MMP-18, MMP-20, MMP-21, MMP-22, atau MMP-23. TIMP-1 menghambat dua MT-MMPs berbahan *glycosylphosphatidylinositol* (GPI) (MT4-MMP / MMP-17, MT6-MMP / MMP-25) tetapi tidak menghambat tipe-transmembran tipe-I MT-MMPs (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, dan MT5-MMP) (Grünwald dkk, 2019). TIMP-1 lebih terbatas dalam aktivitas penghambatnya daripada ketiga TIMP lain, mempunyai afinitas rendah untuk

MMP-14, MMP-16, MMP-24, dan MMP-19. TIMP-1 mempunyai afinitas lebih kuat pada MMP-3 dan MMP-7 dibanding TIMP-2 dan TIMP-3. TIMP-1 lebih dibatasi pada rentang penghambatannya daripada tiga TIMP lainnya, yang memiliki afinitas yang relatif rendah untuk MMPs tipe membran, MMP-14, MMP-16, dan MMP-24 serta untuk MMP-19 (Brew dkk, 2010).

Selain memiliki fungsi utama sebagai penghambat MMP, TIMP juga mempunyai aktivitas lain yaitu menghambat disintegrin-metalloproteinases, ADAMs dan ADAMTS. TIMP mempunyai aktivitas terbatas untuk ADAMs: TIMP-1 dan TIMP-2 menghambat ADAM10 dan ADAM12. ADAM adalah enzim terikat membran berisi disintegrin, *cysteine-rich*, *EGF-like* dan transmembran domain C-terminal terhadap domain katalitik mereka, dan ADAMTS (*disintegrin-metalloproteinases with thrombospondin motifs*) disekresikan protein dengan sebuah domain disintegrin dan *thrombospondin type 1 motifs* dan domain lain dalam regio C-terminal. Terdapat 21 member dari keluarga ADAM, yang mana hanya 13 yang merupakan protease fungsional dan ada 19 ADAMTS pada manusia. MMP dan ADAM biasanya dihambat oleh domain N-terminal dari TIMP tetapi TIMP-1 dan TIMP-3 ketika menghambat ADAM10 tidak pada N-terminal. Ini mengindikasikan bahwa TIMP dalam menghambat MMP, ADAM dan ADAMTS memiliki mekanisme yang berda-beda (Nagase dkk, 2013).

#### 2.4.2 Regulasi TIMP-1

Regulasi TIMP terjadi melalui kontrol ekspresi gen serta melalui protein endositosis dan daur ulang atau degradasi berikutnya. TIMP diekspresikan secara konstitutif di banyak jaringan mamalia. Namun, ekspresi TIMP juga dapat diinduksi di sebagian besar jaringan selama perkembangan, cedera dan perbaikan jaringan. Ekspresi TIMP diatur pada tingkat transkripsi oleh sitokin, faktor pertumbuhan, dan

seperti yang baru-baru ini ditunjukkan, oleh microRNAs na(Masciantonio dkk, 2017).

Pada berbagai jenis sel termasuk HSC, aktivitas promotor TIMP-1 diatur oleh pengatur motif DNA, yaitu UTE-1. Pada penelitian yang dilakukan oleh Philipe dkk pada tahun 2003 yang mengidentifikasi RUNX1 dan RUNX2 sebagai protein pengikat UTE-1, yang diinduksi pada tingkat pasca transkripsi selama aktivasi HSC. RUNX1 dinyatakan dalam setidaknya dua isoform utama, RUNX1B dan RUNX1A. Kelebihan ekspresi isoform lengan panjang RUNX1B dalam aktivitas promotor TIMP1 akan menekan HSC, sedangkan isoform RUNX1A yang terpotong dan RUNX2 berfungsi sebagai stimulator. RUNX1 berinteraksi secara langsung dengan JunD pada HSC, sedangkan RUNX1B tidak dapat berinteraksi dengan JunD, dan dengan demikian penempatannya pada UTE-1 *site* akan mengganggu perakitan aktivator transkripsi yang diperlukan untuk fungsi promotor TIMP-1 (Phillipe dkk, 2003).

Phillipe dkk juga mendeskripsikan sebuah protein nuklear, 30-kD yang berhubungan dengan UTE-1 *site*. Identitas pasti dari protein ini masih belum diketahui. Tetapi, antisera RUNX2 mendeteksi sebuah protein 30kDa yang secara kuat diekspresikan di dalam HSC. Protein ini mungkin merupakan bentuk terpotong dari *full-length* RUNX2 yang dihasilkan baik oleh *splicing* alternatif atau karena kerentanan protein RUNX terhadap degradasi proteolitik (Phillipe dkk, 2003).

### 2.4.3 Fungsi TIMP-1

TIMP-1 adalah penghambat alami kolagenase yang pertama kali ditemukan. TIMPs mengontrol aktivitas enzimatik dari matriks metaloproteinase (MMP).TIMP-1 diakui hampir secara eksklusif sebagai inhibitor protease. Gagasan

ini didorong oleh peran *proinvasive* MMP pada kanker. Pada sel tikus, TIMP-1 dapat menunjukkan fungsi antitumorigenik dan antimetastatik dalam model genetik fungsional (Grundwal dkk, 2019). Peran lainnya yang tidak berhubungan dengan *metalloproteinase* ditunjukkan ketika TIMP melakukan aktivitas biologis seperti pertumbuhan dan diferensiasi sel, migrasi sel, anti-angiogenesis, anti dan proapoptosis dan synaptic plasticity (Brew dkk, 2010).

Pada tahun 1997, dua domain pada TIMP-1 dapat dijelaskan. Hampir 10 tahun kemudian, interaksi antara C-TIMP-1 dan tetraspanin CD63 terbukti menginduksi aktivasi konformasi integrin  $\beta 1$  dan mengaktifkan MAPK signaling, jalur utama protumorigenik. Ini memberikan penjelasan yang mungkin untuk hubungannya dengan prognosis buruk. Di luar aktivitas antiproteolitik dan kemampuannya untuk mengikat CD63, TIMP-1 dapat mengikat beberapa tambahan reseptor yang baru diidentifikasi, termasuk LDL terkait reseptor-protein 1 (LRP1) dan CD82 (Grundwal dkk, 2019).

TIMP-1 mengendalikan aspek-aspek utama dalam sel biologi, dan berkontribusi pada berbagai penyakit seperti peradangan, fibrosis, dan kanker. Namun, kesalahpahaman fungsional masih menghambat pemahaman kita tentang peran molekuler yang tepat dalam konteks yang kompleks (Grünwald dkk, 2019). TIMP-1 berdampak pada berbagai proses seluler. Efek dari peristiwa yang dimediasi oleh TIMP-1 yang dihambat oleh MMP ini beragam, mulai dari degradasi hingga pelepasan substrat dari peptida penghambat, protein pembawa, atau ECM (Masciantonio dkk, 2017)

Regulasi penyembuhan luka adalah salah satu peran fisiologis TIMP-1 yang paling terkenal. Setelah cedera jaringan, MMP diregulasi dan berpartisipasi dalam aktivasi sitokin, migrasi sel, dan remodeling ECM. TIMP-1 secara ketat

menyeimbangkan aktivitas MMP ini untuk memfasilitasi respons penyembuhan luka terorganisir. Bersamaan dengan itu, pensinyalan TIMP-1 melalui CD63 melindungi sel endotel dan platelet dari apoptosis yang tidak semestinya dalam lingkungan cedera yang kaya sitokin. Dengan demikian, fungsi pensinyalan yang dimediasi CD63 antiapoptotik dan fungsi antiproteolitik TIMP-1 bekerja bersama untuk mengembalikan homeostasis selama penyembuhan luka kompleks (Grünwald dkk, 2019) .

Patobiologi fibrosis tumpang tindih secara signifikan dengan overaktivasi proses yang digerakkan oleh TIMP-1 dalam penyembuhan luka. Fibrogenesis sebagian besar dimediasi oleh fibroblas teraktivasi yang biasanya dibersihkan dari jaringan dengan pembalikan fenotip dan apoptosis pada penutupan luka; kegigihan mereka yang tidak semestinya menyebabkan kelebihan deposisi kolagen dan dengan demikian memulai fibrosis. TIMP-1 diekspresikan secara berlebihan oleh fibroblas teraktivasi dan meningkatkan fibrosis dengan menghambat degradasi ECM yang dimediasi MMP. Selain itu, pensinyalan TIMP-1 dengan CD63 dapat secara langsung menginduksi aktivasi fibroblast serta menghambat apoptosis myofibroblast dalam jaringan fibrotik. Oleh karena itu, peran sentral TIMP-1 dalam perkembangan fibrosis bertumpu pada penghambatan koordinat katabolisme ECM yang dimediasi-MMP bersama dengan efek aktivasi dan antiapoptotik yang dimediasi CD63 pada fibroblast kompleks (Grünwald dkk, 2019).

#### **2.4.4 TIMP-1 dalam Fibrosis Hati**

Terdapat bukti yang kuat bahwa TIMP-1,2 dan 3 diekspresikan Di dalam hati (Campana dkk, 2013). TIMP-1 memainkan peran utama dalam proses patologis dibanding TIMP-2 (Brew, 2010). TIMP-1 dan TIMP-2 diekspresikan oleh HSC

teraktivasi, yaitu saat sel perinusoidal kaya retinoid berproliferasi menjadi sel like myofibroblas, selama cedera fibrosis. Dipercaya bahwa, aHSC dan sel Kupffer adalah sumber terbesar TIMP-1. Sumber penting lain dari TIMP-1 dalam jaringan hati adalah sel parenkim. TIMP-1 diinduksi dalam hepatosit pada hati manusia yang sakit dan dalam berbagai model cedera hati serta dalam hepatosit tikus dalam biakan primer oleh sitokin (Wang dkk, 2011, Hemman dkk, 2007, McCrudden dkk, 2010, Iredale dkk, 2013). Ekspresi berlebih TIMP-1 tidak mempunyai efek dalam proliferasi sedangkan TIMP-2 memiliki efek yang menurun dalam proliferasi saat kadar menurun (Yoshiji, 2000).

TIMP-1 dan TIMP-2 memiliki perbedaan reseptor. TIMP-1 mengaktifkan tirosin kinase/ *mitogen activated protein kinase* (MAPK), sedangkan TIMP-2 signaling dimediasi oleh aktivasi protein kinase A yang secara langsung terlibat dalam pembentukan kompleks Ras / *phosphoinositide 3-kinase* (PI3-K). Penelitian terbaru menunjukkan bahwa TIMP-1 berikatan dengan CD63 dan integrin TIMP-2 dengan  $\alpha 3\beta 1$ , namun interaksi ini sudah ditemukan dapat menghambat apoptosis dan mempertahankan pertumbuhan sel (Brew dkk, 2010). Penelitian telah menunjukkan bahwa TIMP-1, bukan TIMP-2, dapat memasuki nukleus dari beberapa tipe sel dan translokasi dari TIMP-1 kedalam nukleus yang diduga bahwa TIMP-1 dapat bekerja sebagai faktor transkripsi. Selain itu, kemungkinan, ekspos lama TIMP-1 dalam kadar yang tinggi dapat merubah fenotip HSC yang akhirnya mengarah ke akumulasi ECM dalam hati (Yoshiji, 2000).

TIMP-1 mengalami peningkatan dalam jaringan dan serum saat proses fibrogenesis pada pasien dengan penyakit hati dan dalam model hewan (Murphy dkk, 2002). TIMP-1 pada serum dapat digunakan sebagai marker *non invasive* dari fibrosis. TIMP-1 diekspresikan oleh interaksi antara *hepatic myofibroblas* aktif dan

makrofag hati saat liver injuri dan berhubungan dengan derajat fibrosis secara langsung (Brew, 2010).

TIMP-1 adalah regulator kunci dari fibrogenesis pada hati. Hal ini didukung dengan meningkatnya derajat fibrosis hati pada tikus yang diinduksi  $\text{CCl}_4$  pada ekspresi TIMP-1 yang berlebihan dari transgen TIMP-1 spesifik hati (Grunwald dkk, 2018). TIMP-1 juga berkorelasi secara signifikan dengan fibrogenesis dalam organ lain seperti paru-paru, ginjal dan pankreas (Campana dkk, 2013).

Penelitian mengatakan bahwa produksi terbanyak TIMP-1 diperankan oleh HSC teraktivasi dan sel kupffer. Setelah kerusakan kronis pada jaringan hati, HSC menjadi teraktivasi dan berdiferensiasi menjadi fenotip seperti fibroblast. Dalam HSCs teraktivasi terutama ekspresi TIMP-1 diregulasi mengarah pada penghambatan aktivitas MMP dan akumulasi protein matriks berikutnya dalam ruang ekstraseluler (Roeb, 2018 dan wang dkk, 2011) Selain itu penelitian juga menunjukkan bahwa TIMP-1 mRNA mengalami upregulasi oleh sitokin inflamasi pada hepatosit tikus. Peran TIMP-1 dalam mencegah degradasi ECM melalui hambatan MMP dan proteksi dari kematian HSC teraktivasi disebut sebagai antifibrogenik (Wang, dkk 2011). Walaupun demikian, pada penelitian model tikus yang dilakukan oleh Thielle dkk menunjukkan bahwa hati tidak terproteksi dari fibrosis yang diinduksi  $\text{CCl}_4$  dalam kadar TIMP-1 yang rendah (Thielle dkk, 2016). Sekresi berlebih TIMP-1 oleh aHSC menyebabkan penurunan aktivitas kolagenase hati dan dengan demikian mempromosikan akumulasi *crossed collagen*. Cara kedua TIMP-1 mengatur proses fibrogenik adalah dengan menghambat apoptosis aHSC memungkinkan sel-sel kolagen mensekresi untuk bertahan di hati terluka (Phillipe dkk, 2003). Selain sebagai antiapoptosis HSC, antiapoptosis TIMP-1 juga bekerja pada sel epitel dan sel limfosit yang tidak

dimediasi oleh MMPs (Nalluri dkk, 2015). Oleh karena itu, memanipulasi ekspresi TIMP1 oleh aHSC mungkin menawarkan strategi terapi (Phillipe dkk, 2003)

Peningkatan ekspresi dari MMP-2 dan MMP-14 selama fibrogenesis terjadi dengan cepat setelah level TIMP-1 menurun. Selama masa penyembuhan, terjadi penurunan cepat ekspresi TIMP-1 yang akan meningkatkan aktifitas gelatinolitik dalam homogen hati oleh pengeluaran MMP-2. Sumber MMP-2 mRNA selama fibrosis masih belum jelas, diduga HSC teraktivasi adalah sumber utama MMP-2, dalam fibrosis hati. Selain itu, tidak jelas bagaimana MMP-2 disintesis ketika sel ini apoptosis. Menurut penelitian HSC dan sel Kupffer yang secara dominan mengekspresikan MMP-2 (Brew dkk, 2010).

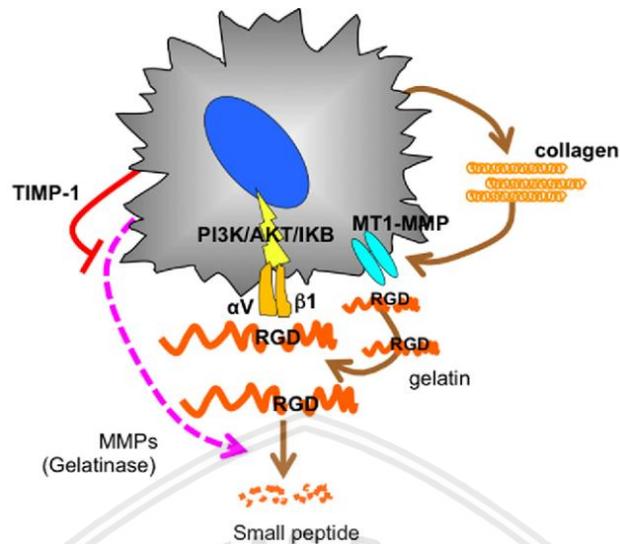
Pada penelitian yang dilakukan oleh Murphy dkk HSC mengalami penurunan yang dimediasi oleh apoptosis dan dalam waktu yang sama terdapat penurunan kadar TIMP-1. Dimana dalam fibrosis yang progresif, HSC teraktivasi dan matriks tidak mengalami penurunan. Adanya hubungan antara TIMP-1 dan apoptosis HSC selama penyembuhan fibrosis hati yang dapat disimpulkan bahwa TIMP-1 diduga meregulasi HSC survival (Murphy dkk, 2012).

#### **2.4.5 TIMP-1 dan Apoptosis HSC**

Apoptosis sel stellate hati (HSC) sebelumnya telah terbukti terjadi selama resolusi spontan fibrosis hati eksperimental. TIMP-1 juga telah terbukti memiliki peran kunci karena kemampuannya untuk menghambat apoptosis HSC melalui penghambatan matrix metalloproteinase (MMP). Studi lebih lanjut terhadap substrat baru MMP yang mungkin berdampak pada kelangsungan hidup HSC yaitu N-Cadherin. N-Cadherin dikenal sebagai perantara kontak sel-sel dalam fibroblast. Dalam penelitian ini menunjukkan bahwa N-Cadherin diekspresikan oleh HSC tikus aktif. Selanjutnya, selama apoptosis HSC, N-Cadherin dibelah menjadi

fragmen yang lebih kecil. Apoptosis HSC dapat dihambat oleh TIMP-1. Ini terkait dengan pengurangan fragmentasi N-Cadherin. N-Cadherin mungkin memiliki peran penting dalam mendukung kelangsungan hidup HSC sementara pembelahan N-Cadherin dapat berperan dalam mempromosikan apoptosis HSC dalam pemulihan dari fibrosis hati (Birukawa dkk, 2014).

Mengenai mekanisme untuk apoptosis aHSC yang terkait dengan resolusi fibrosis, menyoroti peran potensial TIMP-1 dalam kelangsungan hidup HSC, berkurangnya ekspresi TIMP telah ditentukan secara formal sebagai faktor penghambat utama. Selanjutnya, fungsi TIMP untuk menghambat apoptosis aHSC dikaitkan dengan efeknya pada metalloproteinase. Penelitian yang dilakukan oleh Birukawa dkk menunjukkan bahwa efek penghambatan apoptosis HSC melalui TIMP-1 pada tikus adalah melalui efek pada penghambatan MMP daripada mekanisme alternatif. Keterlibatan kolagen itu sendiri dalam mempertahankan kelangsungan hidup aHSC sudah dipostulatkan, meskipun mekanisme molekuler yang tepat belum diklarifikasi. Baru-baru ini, mekanisme yang tidak relevan dengan peran kolagen diusulkan untuk induksi apoptosis aHSCs yaitu, pembelahan seluler N-cadherin oleh MMP2. Dengan demikian, apoptosis aHSCs dalam kaitannya dengan peran kolagen, TIMP, dan MMP masih kontroversial (Birukawa dkk, 2004).

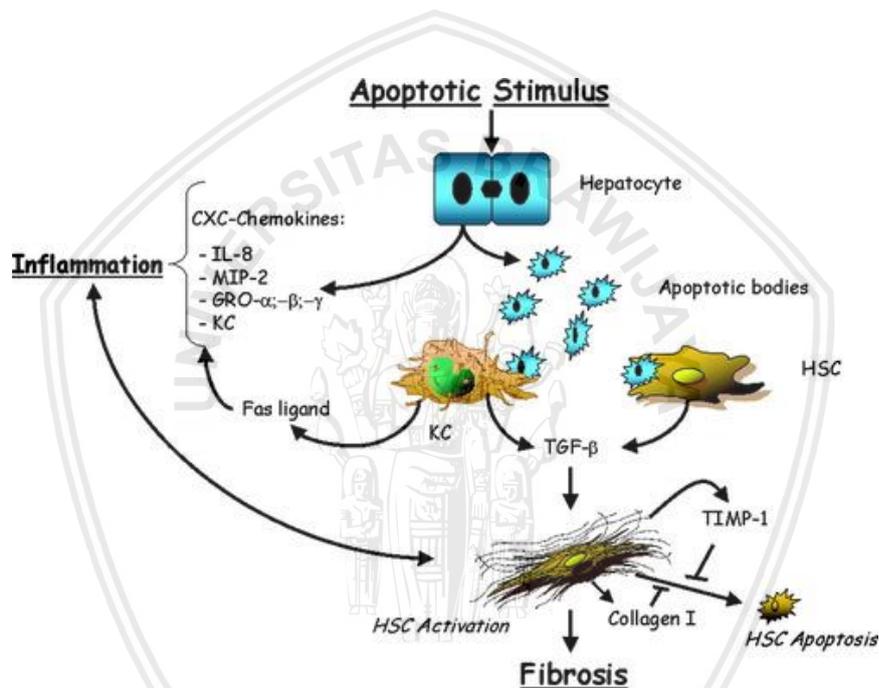


**Gambar 2.5 Skema Loop Autokrin aHSC untuk Bertahan Hidup (Birukawa dkk, 2004)**

aHSC menjadi tergantung pada kolagen, yang dibelah oleh MT1-MMP-nya sendiri, yang mengekspos motif RGD internal dan berinteraksi dengan integrin V1, sehingga mentransduksi sinyal survival PI3K / AKT / I B. kolagen yang dibelah oleh MT1-MMP ditemukan memainkan peran kunci dalam kelangsungan hidup HSC dengan memasok motif RGD yang terbuka pada permukaannya ke V1, yang mentransduksi sinyal bertahan hidup pada interaksi dengan RGD. Oleh karena itu, strategi untuk memblokir loop autokrin ini bisa berpotensi menjadi modalitas anti fibrosis (Birukawa dkk, 2004).

Berbeda halnya dengan penelitian yang dilakukan oleh Wang dkk, yang menyimpulkan bahwa TIMP-1 mempunyai dua fungsi dalam fibrosis hati yaitu menstimulasi fibrosis melalui pencegahan apoptosis HSC dan menghambat fibrosis hati melalui pencegahan cedera hati, dengan menghambat apoptosis hepatosit. Pada tikus model, berkembang lebih progresif fibrosis daripada tikus kontrol. Efek akhir dari TIMP-1 tergantung pada keseimbangan antara stimulasi dan inhibisi (Wang dkk, 2011). Pada studi yang dilakukan oleh Murphy dkk telah

dipelajari peran TIMP-1 sebagai anti apoptosis dengan mempertahankan kelangsungan hidup HSC. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa efek antiapoptosis TIMP-1 untuk HSC bergantung pada inhibisi MMP. Selain itu, ekspresi TIMP-1 yang terus-menerus dalam model 12 jam sirosis yang diinduksi tetraklorida 12 dikaitkan dengan persistensi HSC dan penurunan pemulihan fibrosis hati (Murphy dkk, 2012)



**Gambar 2.6 Representasi Skematis dari Model yang Diusulkan yang Menghubungkan Apoptosis Hepatosit dengan Peradangan dan Fibrosis (Canbay dkk, 2004)**

Stimulus proapoptotik menginduksi apoptosis hepatosit. Sel-sel apoptosis ini melepaskan sinyal lipid untuk serapan mereka oleh sel Kupffer dan sel stellate hati (HSC). *Engulfment* dari badan apoptosis oleh HSC dan sel Kupffer meningkatkan ekspresi gen pro-fibrogenik dan ligan kematian (misalnya FasL). Aktivasi dari sel-sel ini mempromosikan apoptosis hepatosit lebih lanjut, yang memuncak pada peradangan hati, dengan generasi kemokin CXC (Interleukin-8, makrofag inflamasi protein-2, onkogen terkait pertumbuhan -α; -β; -γ, dan CXC

ligand-1) dan aktivasi HSC lebih lanjut dalam proses umpan-maju-loop. Sinyal anti-apoptosis termasuk TIMP-1 dan kolagen I yang terakumulasi selama fibrogenesis membuat stellate teraktivasi menjadi sel-sel yang relatif resisten terhadap rangsangan apoptosis, lebih lanjut mengabadikan akumulasi matriks bekas luka (Canbay dkk, 2004).

## 2.5 Karbon Tetraklorida

### 2.5.1 Definisi Karbon Tetraklorida

$\text{CCl}_4$  dahulu digunakan sebagai pelarut dan pembersih untuk penggunaan industri dan rumah tangga.  $\text{CCl}_4$  sudah digunakan sebagai antihelminthes, insektisida, *dry-cleaning* dan pendingin.  $\text{CCl}_4$  sekarang dilarang digunakan untuk kegunaan rumah tangga, saat ini masih digunakan sebagai pemadam api (NTP, 2005a).  $\text{CCl}_4$  ditemukan menjadi substansi penting percobaan untuk menelaah mekanisme efek hepatotoksik seperti degenarasi lemak, fibrosis, kematian sel hepar dan karsinogenesis. Dosis, waktu ekspos, keberadaan agen potensial dan regenerasi dapat mengembalikan dari kerusakan hati (Weber, 2003). Pada manusia dan hewan percobaan,  $\text{CCl}_4$  dengan cepat dieliminasi oleh pasif difusi melalui pernafasan, fraksi lebih kecil dieliminasi melalui urin dan feses (IARC, 1979).

$\text{CCl}_4$  merupakan senyawa kovalen yang bersifat non polar. Oleh karena itu,  $\text{CCl}_4$  mudah menguap dan tidak larut dalam air (senyawa polar) tetapi larut dalam senyawa non polar atau senyawa organik.  $\text{CCl}_4$  memiliki ciri tidak berwarna, memiliki bau yang ringan, sedikit manis mirip dengan *chloroform* (NTP 2005a). Dalam kondisi anaerobik  $\text{CCl}_4$  akan berubah menjadi *chloroform* dan *dichlorocarbene* (Vullimiri dkk, 2011).

## 2.6 Moringa Oleifera

### 2.6.1 Definisi Moringa Oleifera

*Moringa oleifera* adalah salah satu dari 14 spesies keluarga *Moringaceae*, asli India, Afrika, Arab, Asia Tenggara, Amerika Selatan, dan Kepulauan Pasifik dan Karibia (Iqbal dan Bhangar, 2006). Daun dari *Moringa oleifera* dapat dimakan renyah atau dimasak, dan laporan telah menunjukkan bahwa daun dapat dijadikan sebagai bubuk kering yang dapat disimpan dalam waktu yang lama tanpa kehilangan kualitas baik dari Moringa (Sadek dkk, 2017).

Semua bagian dari tanaman kelor memiliki banyak kandungan yang bermanfaat untuk kesehatan, seperti daun, biji, akar, kulit kayu, buah, bunga, kelopak muda. (Sulistiyorini, 2015). Manfaat *Moringa oleifera* antarlain sebagai stimulan kardiak dan peredaran darah, memiliki antitumor, antipiretik, antiepilepsi, antiinflamasi, antiulser, antispasmodik, diuretik, antihipertensi, penurun kolesterol, antioksidan, antidiabetes, hepatoprotektif, aktivitas antibakteri dan antijamur (Anwar dkk, 2007). Daun *Moringa oleifera* memiliki komposisi nutrisi kimia, asam amino, asam lemak, beta karoten, mineral, dan vitamin E (Sulistiyorini, 2015). Uji fitokimia yang dilakukan oleh Putra diketahui bahwa ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* L.) mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenolat, triterpenoid/steroid dan tannin (Putra, 2013).

### 2.6.2 Daun Moringa Oleifera dalam Fibrosis Hati sebagai Antioksidan

Daun *Moringa Oleifera* memiliki efek antioksidan karena mengandung senyawa polifenol yaitu kaempferol, rhamnetin, quercetin, *chlorogenic acid*, rutin, apigenin. Kombinasi antioksidan ditemukan dalam daun *Moringa oleifera* terbukti lebih efektif daripada satu antioksidan, hal ini karena mekanisme sinergis dan meningkatkan mekanisma kaskade antioksidan (Jimenez 2007). Senyawa

polifenol ini merupakan pertahanan multifaktor melawan stres oksidatif. Senyawa polifenol, termasuk quercetin menurunkan peroksidasi lipid (MDA) yaitu sebagai agen pereduksi oksigen scavenger dan donator atom hidrogen. Selanjutnya menstabilisasi radikal bebas menjadi senyawa stabil yang tidak menginisiasi oksidasi. Senyawa fenol juga terlibat dalam anti inflamasi dan analgesik (El-bakry, 2016). Quercetin adalah salah satu flavonoid yang banyak pada daun *Moringa oleifera* (Sulistiyorini, 2013). Flavonoid sebagai senyawa fenolik dapat memproteksi sel dengan mengaktifkan aktivitas *glutathione reductase* dan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan lainnya yang pada akhirnya membantu hepatoproteksi (El-bakry, 2017). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Putra dkk, pada 2016, semakin besar kandungan etanol maka semakin besar kandungan antioksidan aktif pada *Moringa oleifera* (Putra dkk, 2013).

Studi saat ini menunjukkan bahwa pemberian *Moringa oleifera* setelah intoksikasi  $\text{CCl}_4$  dapat menyebabkan peningkatan signifikan level serum dari ALT, AST, ALP, albumin dan protein total amelioration. Aktivitas reduksi ALT, AST, dan ALP hasil dari ekstrak daun *Moringa oleifera* memiliki peran awal dalam perbaikan integritas membrane sel dari sel hepar yang merupakan peran antihepatotoksik. Terjadi perbaikan disorganisasi arsitektur hepar, degenerasi lemak hati dengan infiltrasi sel inflamasi menyebabkan penyembuhan hepar setelah intoksikasi ekstrak moringa pada tikus. Hasil dari penelitian bahwa ekstrak daun *Moringa oleifera* dapat memperbaiki hepatomegali yang diinduksi oleh pemberian  $\text{CCl}_4$  kronis pada tikus. Hal ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak tanaman ini dapat menghambat perkembangan fibrosis hati (El-bakry, 2016).

### 2.6.3 Daun *Moringa Oleifera* sebagai Penginduksi Apoptosis dalam Fibrosis Hati

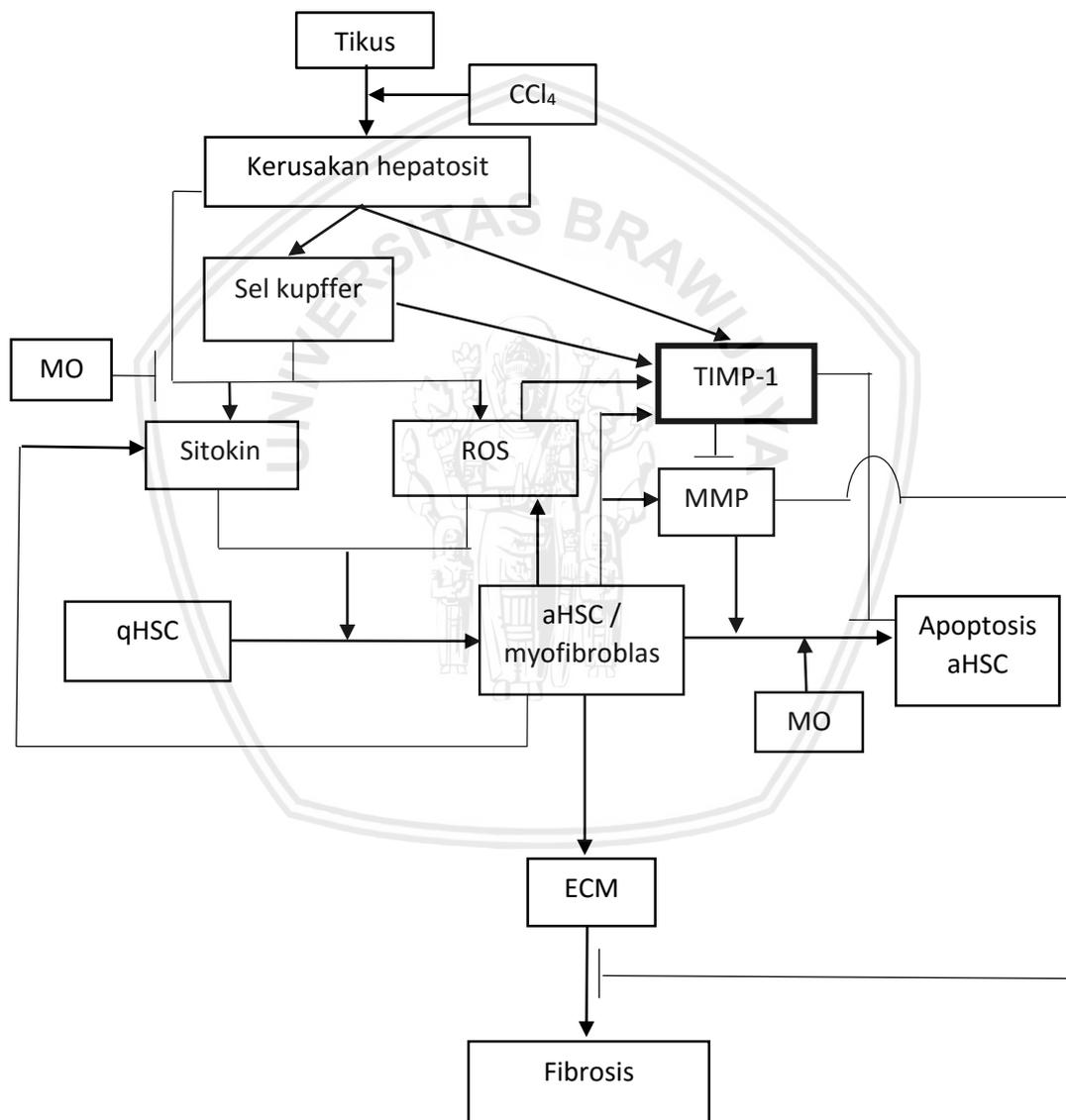
Antioksidan, terutama fenol mempengaruhi sinyal apoptosis yang akan menyebabkan kematian sel dengan aktivasi protein proapoptosis dan menghambat aksi protein anti apoptosis. Sadek dkk mengungkapkan pada penelitiannya mengenai peran *Moringa* sebagai penginduksi apoptosis pada *hepatocellular carcinoma* bahwa ekstrak daun *Moringa Oleifera* dapat menginisiasi apoptosis dengan menyebabkan down regulation BCL-2 dan BCL-XL dan *up-regulation* dari Bax dan caspase-3 pada aHSC. Hal tersebut harus dipertimbangkan bahwa salah satu mekanisme beberapa bahan kimia eksogen yang menginduksi apoptosis juga meningkatkan produksi ROS. Secara hipotesis, bahan kimia yang menginduksi antioksidan beracun berdampak terhadap apoptosis. Selain itu, beberapa bahan kimia menghambat pertumbuhan dengan menerapkan aktivitas antioksidan dan pada saat bersamaan memulai apoptosis. Sehingga, tidak diragukan bahwa ekstrak daun *Moringa oleifera* menunjukkan sifat antioksidan yang kuat disamping sebagai proapoptosis. Pemberian awal ekstrak daun *Moringa oleifera* menurunkan generasi ROS, namun hal tersebut tidak mencegah aktivitas apoptosis dari ekstrak daun *Moringa oleifera* (Sadek dkk, 2017).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

→ = memproduksi/menginduksi

—| = menghambat

▭ = yang diteliti

- MO = *Moringa oleifera*  
aHSC = *activated Hepatic Stellate Cell*  
qHSC = *quiescent Hepatic Stellate Cell*

### 3.2 Uraian Kerangka Konsep Penelitian

Tikus diinduksi CCl<sub>4</sub> secara intra peritoneal yang menyebabkan kerusakan sel hepatosit. Sel hepatosit yang rusak akan merangsang aktivasi sel kupffer dan memproduksi sitokin serta ROS. Sitolin dan ROS yang diproduksi oleh sel hepatosit dan sel Kupffer akan mengaktifkan qHSC menjadi aHSC. HSC yang teraktivasi tersebut akan memproduksi lebih banyak ECM dan mengubah kualitasnya sehingga menyebabkan fibrosis. Selain itu, HSC yang teraktivasi juga memproduksi sitokin, ROS, MMP dan TIMP-1. TIMP-1 bertugas menghambat MMP dalam mendegradasi ECM sehingga ECM semakin menumpuk dan terjadi fibrosis. TIMP-1 yang diproduksi juga akan menghambat apoptosis aHSC melalui pencegahan degradasi matriks yang dilakukan oleh MMP sehingga aHSC terproteksi dari kematian sel. Selain itu, TIMP-1 berikatan dengan CD63 pada sel yang menyebabkan antiapoptosis serta akan terjadi peningkatan BCL-2 dan menghambat caspase-3 pada aHSC sehingga apoptosis terhambat.

### 3.3 Hipotesis Penelitian

Pemberian ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* dapat menurunkan ekspresi TIMP-1 jaringan hati pada tikus model fibrosis hati.

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian berbentuk eksperimental laborator dengan design *true experimental laboratory*. Penelitian ini termasuk ke dalam eksperimental *in vivo* pada hewan coba tikus. Metode yang digunakan adalah *randomized posttest only controlled group design*. Hewan coba dibuat model fibrosis hati dengan cara diinduksi CCl<sub>4</sub> dan diberi perlakuan ekstrak etanol dari *Moringa oleifera*. Sebelum diberi perlakuan, tikus dibagi menjadi 5 kelompok secara acak, sebagai berikut :

**Tabel 4.1 Kelompok Perlakuan Tikus**

No	Kelompok	Perlakuan	
		CCl <sub>4</sub> 10%	Ekstrak Daun <i>Moringa oleifera</i>
1.	K-negatif	-	Sonde aquades 2,5 cc setiap hari
2.	K-positif	Intraperitoneal 2x/minggu selama 97 hari	Sonde aquades 2,5 cc setiap hari
3.	KP-1	Intraperitoneal 2x/minggu selama 97 hari	Diberi MO 5 cc/kgBB/hari selama 97 hari
4.	KP-2	Intraperitoneal 2x/minggu selama 97 hari	Diberi MO 7,5 cc/kgBB/hari selama 97 hari
5.	KP-3	Intraperitoneal 2x/minggu selama 97 hari	Diberi MO 10 cc/kgBB/hari selama 97 hari

Tikus kelompok kontrol negatif tidak diberikan injeksi CCl<sub>4</sub> tetapi diinjeksi dengan NaCl 1 cc/kgBB selama 97 hari sedangkan yang kelompok kontrol positif

diberikan injeksi  $\text{CCl}_4$  10% 1 ml/KgBB 2x/minggu selama 12 minggu dan dilanjutkan dengan 2 ml/KgBB selama 13 hari. Lalu untuk kelompok perlakuan 1 (KP-1), perlakuan 2 (KP-2), dan perlakuan 3 (KP-3) semua diberi injeksi  $\text{CCl}_4$  seperti kelompok kontrol positif tetapi ditambah dengan pemberian *Moringa oleifera* peronde dengan dosis yang berbeda yaitu, 5 cc/KgBB atau 150 mg/kgBB, perlakuan 2 diberikan dosis 7,5 cc/KgBB atau 300 mg/kgBB, dan perlakuan 3 diberikan dosis 10 cc/KgBB atau 600 mg/kgBB.

#### 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan tikus model di Laboratorium Farmakologi FK UB. Pemeriksaan ekspresi TIMP-1 dilakukan di Lab Biomedik dan Bioscience. Penelitian mulai dilaksanakan bulan Juli 2018 sd Maret 2019.

#### 4.3 Populasi dan Sampel

##### 4.3.1 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan tikus putih *Rattus norvegicus strain wistar*. Penelitian ini mempunyai kriteria inklusi dan eksklusi. Adapun kriteria inklusinya yaitu :

Kriteria inklusi :

- Tikus jantan, berusia  $\pm$  3 bulan, dengan berat badan 160-260 gram
- Belum pernah mengalami perlakuan apapun Tikus sehat (gerak aktif dan bulu tidak rontok)

Kriteria eksklusi :

- Tikus tidak mau makan atau sakit selama penelitian
- Tikus mati selama penelitian

### 4.3.2 Estimasi Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang akan digunakan dalam eksperimen dengan metode *random* (acak), menggunakan rumus Federer (1963), yaitu :  $(t-1)(r-1) \geq 15$ , dimana:

t : banyaknya kelompok perlakuan

r : jumlah pengulangan (replikasi)

Pada penelitian ini  $t=5$ , sehingga didapatkan pengulangan sebesar :

$$(5-1)(r-1) \geq 15$$

$$4(r-1) \geq 15$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 15+4$$

$$r \geq 19/4$$

$$r \geq 4,75 \text{ (dibulatkan menjadi 5)}$$

Jumlah tikus untuk pengulangan yang diperlukan di setiap kelompok perlakuan minimal 5. Sehingga total semua tikus yaitu  $5 \times 5 = 25$  tikus. Untuk mengantisipasi adanya kematian tikus selama penelitian, akan ditambahkan faktor koreksi sebesar 20% di setiap kelompok. Sehingga jumlah sampel setiap kelompok adalah  $5 + (5 \times 20\%) = 5 + 1 = 6$ . Jadi total  $6 \times 5 = 30$  tikus.

## 4.4 Variabel Penelitian

### 4.4.1 Variabel bebas

Paparan *Moringa oleifera*

### 4.4.2 Variabel tergantung

Ekspresi TIMP-1

#### 4.5 Definisi Operasional

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus *Rattus norvegicus* strain wistar jantan yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi FKUB.
2. Diet normal berupa pakan standar konsentrat BRI-1 30 gram, tepung terigu 10 gram dan air secukupnya
3. Paparan CCl<sub>4</sub> adalah pemberian injeksi CCl<sub>4</sub> 10% (CCl<sub>4</sub> : minyak jagung = 1:9 volume) intraperitoneal dengan dosis 1,0 ml/KgBB, 2 kali seminggu (Li, et al., 2012) selama 14 minggu.
4. *Moringa oleifera* yang digunakan berupa serbuk yang diperoleh dari Materia Medica Batu, Malang.
5. Ekstrak *Moringa oleifera* diperoleh dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 96%
6. Paparan *Moringa oleifera* adalah pemberian peronde setiap hari. Ada tiga kelompok dengan dosis pemberian yang berbeda-beda.
7. Penentuan derajat fibrosis hati menggunakan skor Metavir, yaitu dengan tingkatan F0-F4. Keterangan dari F0-F4 yaitu :
  - 1) F0: jaringan normal
  - 2) F1: sudah terjadi fibrosis di beberapa lokasi, yaitu di bagian porta, intralobular, dan perisinusoidal
  - 3) F2: terjadi fibrosis di beberapa area porta adanya septum fibrosa antarporta, dan adanya kerusakan arsitektur intralobular
  - 4) F3: septum fibrosis berada di porta sentral, ada kerusakan struktural intralobular, tetapi belum terjadi sirosis
  - 5) F4: sudah terjadi sirosis

8. Ekspresi TIMP-1 pada jaringan hati diukur dengan metode *immunofluorescence*, dengan menghitung jumlah sel yang mengekspresikan TIMP-1 dengan aplikasi Image Raster.

## 4.6 Alat dan Bahan Penelitian

### 4.6.1 Alat

- Alat Ekstraksi *Moringa oleifera*  
Erlenmeyer 500 ml, *shaker*, penyaringan, *rotary evaporator*
- Alat Pemeliharaan Tikus  
Kandang dari kotak berukuran 27,4 cm x 20,7 cm x 10 cm, 29,3 cm x 20,8 cm x 8 cm dan 30,5 cm x 23,7 cm x 10,5 cm dengan alas sekam yang bersih dan kering serta diganti tiga hari sekali, tutup kandang dari anyaman kawat dan botol air. Penimbangan berat badan dengan menggunakan neraca sartorius.
- Alat Pembuatan Pakan Tikus  
Baskom plastik, timbangan, gelas ukur, handscoon
- Alat Pembedahan Tikus: gunting, jarum pentul, pinset, lillin, kapas
- Alat Pembuatan dan Pemberian Larutan  $CCl_4$   
Pipet, gelas ukur, botol kaca gelap, aluminium foil
- Alat Pewarna *Immunofluorescence*: pipet, eppendorf, mikropipet, oven, pendingin, wadah plastik (*chamber*), tisu, lemari pendingin

### 4.6.2 Bahan

- Bahan proses ekstraksi *Moringa oleifera*: serbuk daun *Moringa oleifera* dan pelarut
- Hewan coba: tikus *rattus norvegicus* strain wistar sesuai kriteria inklusi.

- Hewan perawatan tikus: air, sekam, pakan tikus.
- Bahan pembuatan pakan standar: konsentrat BRI-1, tepung terigu, dan air secukupnya
- Bahan pembuatan larutan  $\text{CCl}_4$  10%, minyak jagung.
- Bahan reagensia sesuai dengan penelitian payung
- Bahan bedah tikus: alkohol, ketamin
- Bahan pengukur ekspresi TIMP-1: antibodi antimouse dengan pewarna rhodamin, PBS, Triton 0,1%.

#### **4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data**

##### **4.7.1 Proses Pegeringan dan Ekstraksi *Moringa oleifera*.**

1. Serbuk daun kering *Moringa oleifera* diambil dan ditimbang sebanyak 100 mg direndam dengan pelarut yaitu etanol 96% sebanyak 900 mL lalu dikocok selama 30 menit dan direndam satu m sampai mengendap.
2. Diambil lapisan atas yang merupakan campuran pelarut dan zat aktif. Ekstrak dan residu dipisahkan dengan penyaringan menggunakan kertas saring Whatman No.1
3. Residu diekstraksi dua kali dengan pelarut yang baru dan ekstrak digabung lalu masukkan ke tabung evaporasi 1 L
4. Water bath diisi dengan air sampai penuh. Suhu water bath diatur dibawah tekanan rendah pada suhu 70°C (titik didih etanol) dengan *rotary evaporator* agar ekstrak yang digabung dipekatkan dan dibebaskan dari pelarut.
5. Semua rangkaian alat dipasang dan disambungkan dengan aliran listrik. Pelarut dibiarka terpisah dengan zat aktif atau ekstrak.

6. Aliran pelarut dibiarkan sampai berhenti menetes pada labu penmapung (kurang lebih 1,5 – 2 jam) 900 ml yang akan menghasilkan ekstraksi kira-kira 1/5 dari bahan alam kering atau 15 gram.
7. Hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam botol plastik atau kaca lalu disimpan di dalam freezer.

#### 4.7.2 Pembuatan $\text{CCl}_4$

- Di dalam gelas ukur  $\text{CCl}_4$  ini dilarutkan dengan minyak jagung dengan rasio perbandingan 1:9, dimana 1 mL  $\text{CCl}_4$  dan 9 mL dengan konsentrasi 10%, lalu diaduk hingga rata.
- $\text{CCl}_4$  ini lalu disimpan dalam botol kaca berwarna gelap yang ditutupi aluminium foil agar tidak mengalami oksidasi
- Kemudian masukkan dalam kulkas dengan suhu  $-9^\circ \text{C}$

#### 4.7.3 Pemeliharaan dan Perlakuan pada Tikus

1. Persiapan sebelum pemeliharaan
  - Tikus *Rattus norvegicus* strain wistar didapatkan dari Laboratorium Farmakologi FK UB.
  - Mempersiapkan kandang tikus sejumlah 30 dibagi untuk 5 kelompok. Setiap kandang berisi 1 ekor tikus dan kandang diberi label sesuai dengan perlakuan, yaitu label K-Negatif 1-6, K-Positif 1-6, KP-1 1-6, KP-2 1-6, dan KP-3 1-6.
  - Kandang ditutup dengan menggunakan anyaman kawat berongga sehingga tikus tetap bisa bernafas dengan ventilasi udara yang cukup.
  - Ruang untuk menempatkan kandang bersuhu  $25-28^\circ \text{C}$  dengan kelembaban udara 50-70%.

- Alas kandang berupa sekam dengan ketebalan secukupnya dan melakukan pergantian sekam setiap 2 kali dalam seminggu.
2. Perlakuan tikus
- Sebelum diberi perlakuan, tikus diadaptasikan terlebih dahulu selama satu minggu terhadap kondisi laboratorium. Tikus diberikan diet normal. Tikus ditimbang saat awal adaptasi dan akhir adaptasi untuk bisa dipantau bahwa tikus tidak mengalami penurunan berat badan dan tetap dalam kondisi yang sehat.
  - Minum yang diberikan setiap hari adalah aquades yang ditempatkan pada botol minum ukuran 100 mL dan ada pipa dengan bola katup tempat keluarnya air minum dan ini diletakkan di atas kawat penutup kandang.
  - Memberikan pakan yang berupa konsentrat BRI-1 30 gram, tepung terigu 10 gram, dan air secukupnya yang dicampur sebanyak 40 gram untuk setiap tikus.
  - Tikus dikeluarkan dari kandang untuk diberikan perlakuan seperti menimbang berat badan dan induksi fibrosis hati dengan karbon tetraklorida ( $CCl_4$ ). Pengeluaran tikus dari kandang dengan memegang ekor yang dekat dengan badan, setelah itu tikus didekatkan ke bagian lengan tangan yang memegang ekor tikus. Sedangkan tangan satunya memegang tubuh bagian atas dengan posisi kaki depan tikus diantara jari telunjuk dan jari tengah peneliti. Saat memegang bagian tubuh yang atas jangan terlalu kencang agar tikus dapat bernafas. Lalu, tangan lain memegang tubuh bagian bawah kemudian tikus diposisikan secara vertikal.

- Untuk kelompok kontrol negatif di injeksi NaCl 10 % dengan dosis 1 ml/kgBB dengan frekuensi dua kali seminggu yang digunakan sebagai placebo.
3. Memberikan ekstrak *Moringa oleifera* peronde dengan dosis berbeda: 150 mg/kgBB/hari untuk KP-1, 300 mg/kgBB/hari untuk KP-2 dan 600 mg/kgBB/hari untuk KP-3. Pemberian ini dimulai pada hari pertama saat injeksi CCl<sub>4</sub>.
4. Pemberian CCl<sub>4</sub>
- Setelah adaptasi selama satu minggu, dilakukan injeksi CCl<sub>4</sub> secara intraperitoneal.
  - Untuk setiap injeksi dosisnya yaitu 1 cc/KgBB setiap 2 kali per minggu selama 12 minggu, 2 minggu selanjutnya diberi dosis 2 cc/KgBB untuk kelompok perlakuan. Dan sebelum melakukan injeksi timbang dahulu berat badannya untuk menentukan dosis karbon tetraklorida.
  - CCl<sub>4</sub> disuntikkan di bagian kuadran kanan bawah abdomen untuk menghindari tertusuknya organ-organ vital.
5. Pembedahan
- Sebelum dilakukan pembedahan tikus harus di euthanasia terlebih dahulu. Euthanasia ini dilakukan dengan injeksi ketamin. Berikut langkah/tahapan yang harus dilakukan saat pembedahan :
- Tikus di euthanasia terlebih dahulu diinjeksi dengan ketamine
  - Tikus di tempatkan di atas papan bedah yang dialasi oleh lilin
  - Dipastikan, tubuh, terutama tangan dan kaki tikus terfiksasi dengan baik agar mudah dalam melakukan pembedahan.
  - Pembedahan dilakukan di bagian abdomen

- Pembedahan dilakukan dengan menggunakan gunting.
- Ambil organ yang diperlukan yang ingin diteliti
- Lalu organ dipindah ke cawan petri untuk ditimbang. Catat hasil timbangan.
- Organ yang sudah di timbang di masukkan ke dalam pot berisi formalin 10%.
- Pembedahan dilakukan sesuai dengan waktu yang sudah ditentukan untuk munculnya fibrosis.
- Setelah dilakukan pembedahan maka tubuh tikus dikuburkan dan area pembedahan dibersihkan.

#### 6. Tindakan euthanasia

Proses euthanasia di penelitian ini menggunakan ketamin. Metode ini dilakukan dengan cara intraperitoneal. Sampai dengan tikus tidak bergerak, lalu tikus ditekan untuk memastikan tikus tersebut sudah mati atau belum.

#### 4.7.4 Pembedahan dan Pengambilan Organ

Pembedahan ini dilakukan setelah dilakukan euthanasia pada hewan coba dengan menggunakan ketamine. Berikut langkah/tahapan-tahapan yang dilakukan pada pembedahan hewan coba:

- Pembedahan sesuai dengan waktu yang sudah ditentukan untuk mendapat semua derajat fibrosis hati.
- Tikus di euthanasia dengan ketamine 50 mg/cc sebanyak 0,35 cc – 0,4 cc disuntikan di bagian paha intramuscular, membutuhkan waktu selama 10-30 menit sampai tikus hilang kesadaran, setelah itu baru dilakukan pembedahan.

- Tikus ditempatkan di papan bedah yang keras dan dialasi dengan lilin. Kaki dan tangan tikus difiksasi dengan jarum pentul di atas lilin tersebut serta bagian leher dijepit dengan pinset.
- Toraks dan abdomen tikus dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median dengan gunting.
- Organ liver diambil dan dimasukkan ke tabung berisi formalin sampai terendam semua
- Selanjutnya dikirim ke Lab Patologi Anatomi untuk dibuat preparat jaringan

#### **4.7.5 Pengukuran Ekspresi TIMP-1 Jaringan Hati Tikus Model Fibrosis Hati dengan Metode *Immunofluorescence***

Setelah dilakukan *Immunofluorescence* dilakukan pemfotografan dengan FSX 100 sebanyak 5 lapang pandang dengan perbesaran 200x dan dengan menghitung jumlah sel pada hati yang mengekspresikan TIMP-1.

1. slide preparat diinkubasi di inkubator selama 60 menit dalam suhu 60°
2. Direndam dalam larutan dibawah ini secara berurutan
  - Xilol (2 x 10 menit)
  - Etanol absolut (2x10 menit)
  - Etanol 90%
  - Etanol 80%
  - Etanol 70%
  - Aquades steril (1 x 5 menit)
3. Slide direndam dalam chamber berisi buffer nitrat pH 6,0 kemudian di masukkan ke dalam *microwave* pada suhu 95° selama 15 menit
4. Slide dikeluarkan dari oven, tunggu selama 20 menit

5. slide dicuci PBS
6. Bagian belakang preparat dikeringkan dengan tisu, lalu pada jaringan, ditetesi PBS selama 3x2 menit, lalu buang PBS pada slide tersebut dengan memiringkan slide
7. PBS dan Triton 0,1 % dicampur dalam tabung ukur lalu dihomogenisasi selama 10 detik dengan vortex kemudian campuran tersebut ditetaskan dengan menggunakan mikropipet sebanyak 200 microlite per preparat kemudian diamkan selama 5 menit.
8. Ditetesi PBS 3x 2 menit
9. Sekitar jaringan dikeringkan dan belakang preparat dengan kertas tisu lalu tetesi dengan BSA 1%
10. Preparat dimasukkan dalam chamber yang bawahnya dilapisi tisu yang dibasahi air lalu diinkubasi selama 1 jam seelah itu preparat dibersihkan dengan tisu pada sekitar jaringan dan bawah preparat
11. Antibodi TIMP-1 dimasukkan ke dalam eppendorf lalu di homogenisasi
12. Antibodi tersebut ditetesi pada preparat dengan mikropipet, lalu dimasukan ke dalam chamber, kemudian disimpan dalam lemari pendingin *overnight*
13. Chamber dikeluarkan dari lemari pendingin diamkan beberapa menit lalu ditetesi PBS 3x2 menit
14. Dalam keadaan tanpa penerangan antibodi antimouse rhodamin 1:1000 ditutupi dengan kertas aluminium foil lalu dihomogenisasi dengan vortex 10 detik (larutan didalam Eppendorf)
15. Slide dibersihkan pada bawah dan sekitar jaringan yang sudah ditetesi PBS
16. Ditetesi antibodi antimouse rhodamin 1:1000, 100 *microlite*

17. Dimasukkan ke dalam chamber (jangan sampai tumpah) lalu diinkubasi dalam ruangan gelap selama 1 jam
18. Ditetesi PBS 3x2 menit (ruangan gelap)
19. Dilakukan mounting dengan larutan gliserol tutup dengan cover glass
20. pengamatan dengan mikroskop Olympus FSX 100

#### 4.7.5.1 Cara Pemfotografan Preparat dengan Mikroskop Olympus FSX 100

a. Cara Menghidupkan Mikroskop

Stop kontak dihubungkan dengan sumber tenaga, alat dinyalakan dengan menekan tombol POWER pada posisi ON, alat menyala, diamkan mikroskop selama 30 menit.

b. Cara Menggunakan Mikroskop

Nyalakan tombol ON pada layar, klik *icon software* pada layar (FSX-BSW), pilih menu pada layar, tekan tombol tempat preparat lalu masukan preparat, tutup kembali, lalu amati.

c. Cara Menggunakan Software

Klik *start*, klik *specimen check*, *next*. Pada *macrosearch* tentukan perbesaran dan area yang akan difoto. Pada *acquisition: exposure time, focus, magnification, direct overlay (filter)*, memfokuskan dan menentukan filter, pilih warna filter yang diinginkan (terdapat 1-3 warna), jika satu 1 filter pilih hanya satu, jika 3 filter, pilih ketiganya. Klik *snap*. Pada *toolbar view*, pilih *export* lalu *save*, kembali ke *macrosearch* untuk tentukan area selanjutnya.

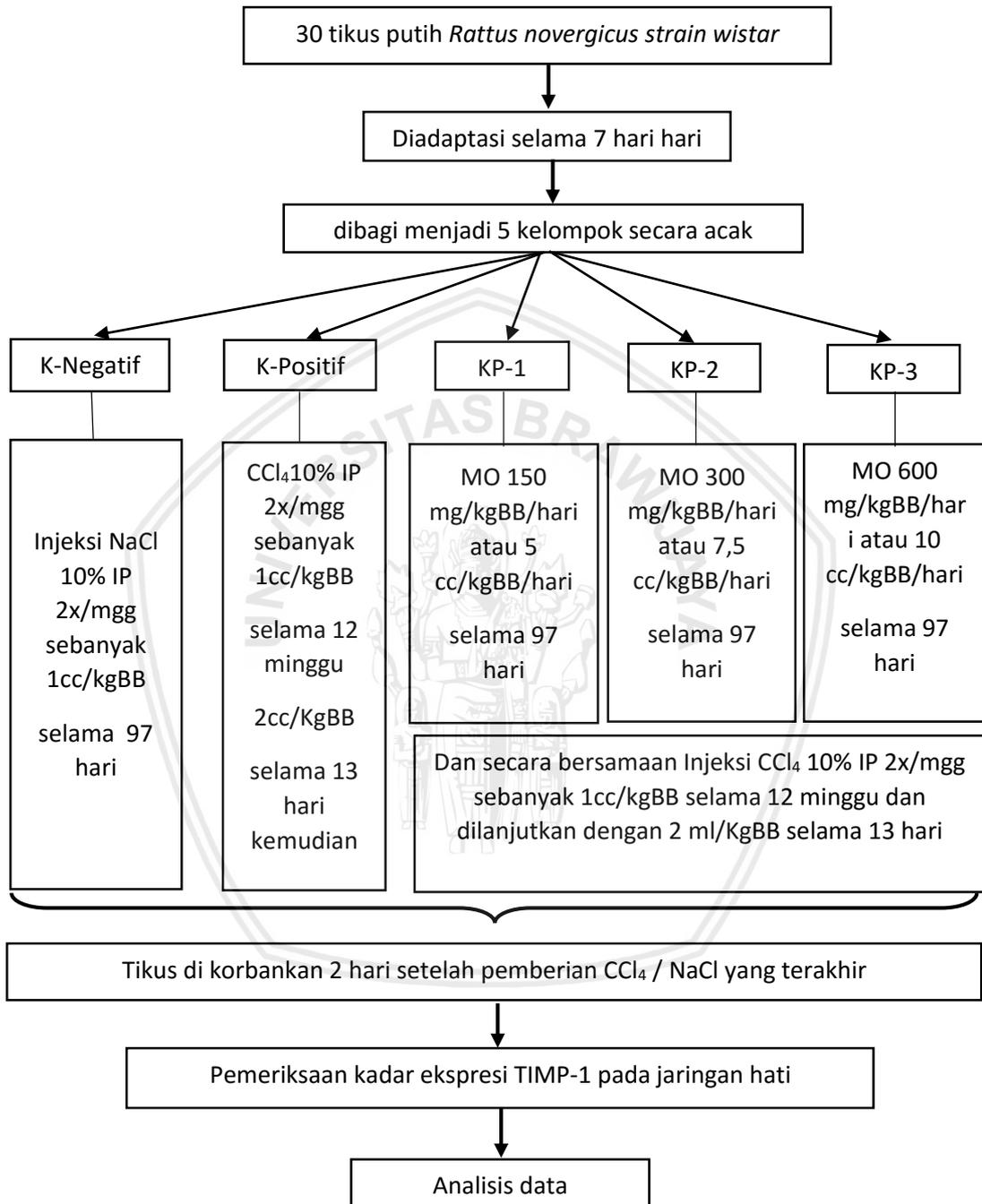
## 4.8 Pengolahan Data

### 4.8.1 Uji Analisis

Hasil perhitungan kadar TIMP-1 jaringan hati dianalisis secara statistic dengan menggunakan program SPSS 22 untuk Windows 8 dengan tingkat signifikansi ( $p=0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha= 0,05$ ).



#### 4.9 Alur Penelitian





## BAB 5

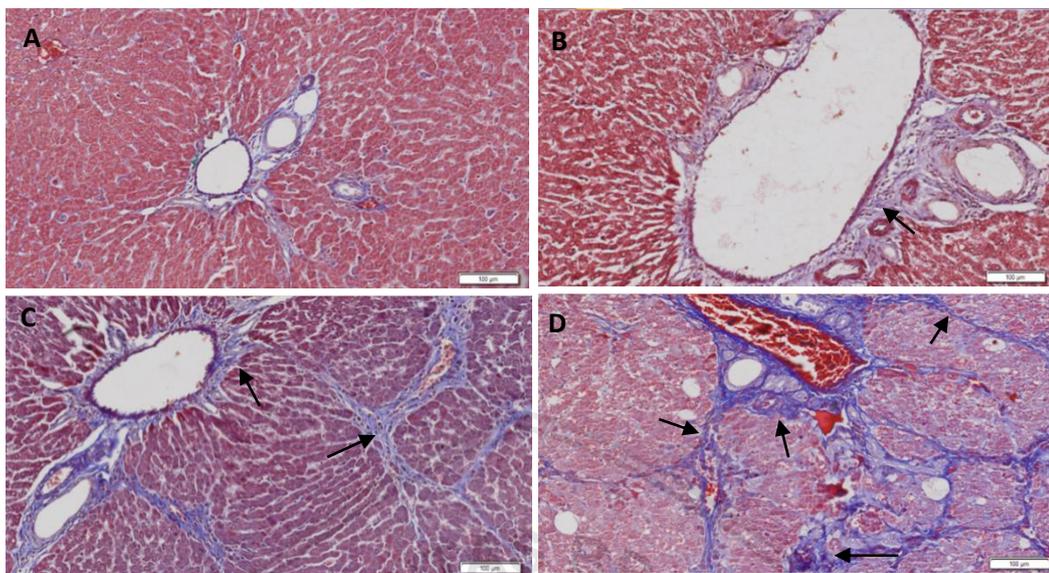
### HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Permbuatan Tikus Model Fibrosis

Keadaan umum seluruh sampel tikus selama penelitian menunjukkan kondisi yang cukup baik. Hal ini ditunjukkan dengan peningkatan berat badan seluruh sampel tikus dari awal penelitian hingga sebelum pembedahan. Pembuatan tikus model fibrosis dapat dikatakan berhasil dengan derajat fibrosis (F0) pada tikus yang sehat sudah mengalami peningkatan menjadi F3 setelah induksi CCl<sub>4</sub>.

Dihasilkan derajat F0 untuk semua kelompok kontrol negatif dan derajat F3 untuk seluruh kelompok kontrol positif dengan induksi CCl<sub>4</sub> (K-Pos) pada minggu ke-14. Pada Gambar 5.1 tikus tanpa perlakuan dengan derajat fibrosis F0 pada sekitar vena porta terlihat bersih tidak ada fibrosis ataupun sel-sel radang, hanya terlihat kolagen dan jaringan ikat normal, tidak ada perubahan struktur lobul. Sedangkan pada tikus kelompok kontrol positif (F3) terbentuk multisepta hingga multilobular fibrosis disertai dengan kerusakan struktur intralobular dan adanya steatosis. Pada tikus derajat fibrosis F1 terbentuk fibrosis terbatas di area vena porta dan terdaoat sel radang. Selanjutnya, pada tikus dengan derajat fibrosis F2 terbentuk fibrosis di area vena porta dan beberapa septa.

Berikut ditampilkan gambar derajat fibrosis hati dengan pengecatan *Masson's Trichome* (MT):



**Gambar 5.1 Hasil Pengamatan Histopatologi Hati Tikus Model Fibrosis Hati dengan Pengecatan *Masson's Trichrome* (MT) Perbesaran 40x dengan Skala 200 $\mu$ m**

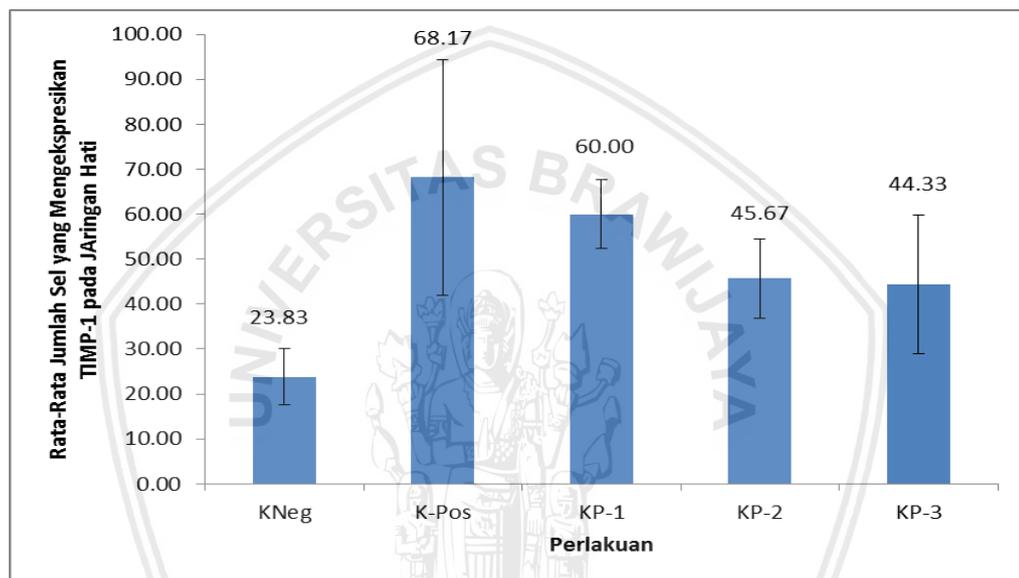
A : tikus tanpa perlakuan, B : derajat fibrosis F1. C : derajat fibrosis F2 D : derajat fibrosis F3. Fibrosis (tanda panah hitam)

## 5.2 Hasil Pengamatan TIMP-1 pada Jaringan Hati

Ekspresi TIMP-1 pada jaringan hati dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel pada jaringan hati yang mengekspresikan TIMP-1. Secara univariat hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabulasi yang berisi nilai rata-rata dan standar deviasi jumlah sel yang mengekspresikan TIMP-1 pada jaringan hati. Kemudian secara bivariat, hasil analisis akan yang akan diuraikan adalah uji ANOVA untuk mengetahui efek perlakuan terhadap jumlah sel yang mengekspresikan TIMP-1 pada jaringan hati serta analisis korelasi pearson untuk mengetahui kekuatan hubungan antara peningkatan dosis dengan jumlah sel yang mengekspresikan TIMP-1 pada jaringan hati.

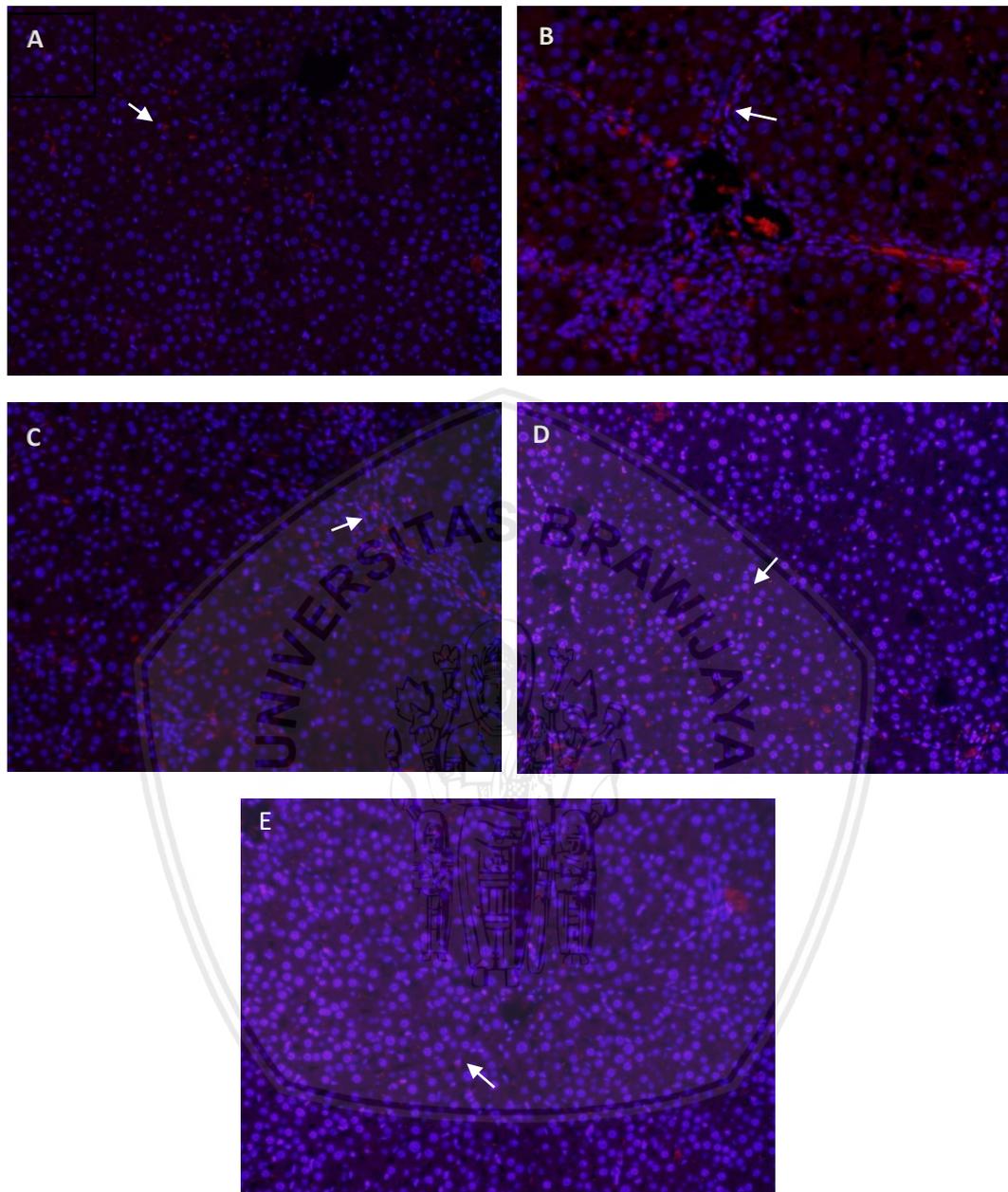
Berdasarkan hasil statistik deskriptif diketahui bahwa pada kelompok tanpa perlakuan (K-Neg) diperoleh rata-rata sebesar 23.83. Pada kelompok kontrol positif dengan induksi  $\text{CCl}_4$  (K-Pos) terjadi peningkatan tiga kali lipat (68.17)

dibandingkan kelompok tanpa perlakuan. Kemudian pada kelompok tikus dengan 150 mg/KgBB ekstrak daun *Moringa oelifera* (KP-1) terjadi penurunan menjadi 60.00 dan terus menurun sampai pada kelompok perlakuan dengan dosis ekstrak daun *Moringa oleifera* 600 mg/KgBB (KP-3) menjadi 44.33. Dalam bentuk grafik akan terlihat trend yang menurun seperti berikut:



**Gambar 5.2 Grafik Rerata Ekspresi TIMP-1 Pada Jaringan Hati Tikus dengan Model Fibrosis**

Dari grafik histogram terlihat bahwa pada rata-rata terendah terdapat pada kelompok tikus tanpa perlakuan dan paling tinggi pada kelompok tikus dengan induksi  $\text{CCl}_4$ . Kemudian akan terus menurun hingga pada kelompok perlakuan dengan 600 mg/KgBB ekstrak daun *Moringa oleifera*.



**Gambar 5.3 Hasil Immunofluorescence dari Jaringan Hati pada Tikus Model Fibrosis Hati dengan berbagai dosis ekstrak daun *Moringa oleifera* pada Perbesaran 200x.**

A : Tikus tanpa perlakuan/non fibrosis, B : Tikus kontrol positif dengan induksi  $\text{CCl}_4$ , C: Tikus diinduksi  $\text{CCl}_4$  dan ekstrak daun *Moringa oleifera* 150 mg/KgBB, D : Tikus diinduksi  $\text{CCl}_4$  dan ekstrak daun *Moringa oleifera* 300 mg/KgBB, E : Tikus diinduksi  $\text{CCl}_4$  dan ekstrak daun *Moringa oleifera* 600 mg/KgBB. Ekspresi TIMP-1 (merah), marker inti sel : DAPI (biru/ungu), sel yang mengekspresikan TIMP-1 (tanda panah putih).

### 5.3 Analisis Data

Data pada penelitian ini dianalisis dengan *software* SPSS versi 22 dan output analisis dapat dilihat pada lampiran.

#### 5.3.1 Uji Asumsi Data

Sebelum data diatas dianalisis dengan menggunakan uji statistik, perlu dilakukan pengujian terhadap beberapa asumsi data, yaitu uji normalitas distribusi data dan uji homogenitas data.

##### 5.3.1.1 Normalitas Distribusi Data

Untuk mengetahui efek penggunaan ekstrak *Moringa oleifera* terhadap jumlah sel yang mengekspresikan TIMP-1 pada jaringan hati akan digunakan uji komparatif numerik tidak berpasangan >2 kelompok yaitu One Way ANOVA. Sebelum menggunakan One Way ANOVA harus didahului uji normalitas menggunakan *Shapiro Wilk* karena jumlah tikus tiap kelompok <50. Data akan berdistribusi normal apabila nilai sig > 0.05. Jika hasil data menunjukkan tidak normal maka data ditransformasi dulu. Jika data tetap tidak normal maka uji One Way ANOVA diganti dengan uji Kruskal Wallis. Dari hasil uji normalitas diketahui bahwa semua diperoleh nilai sig >0.05 yang menunjukkan bahwa data memenuhi asumsi normalitas. Oleh karena itu dapat dilanjutkan dengan ANOVA.

##### 5.3.1.2 Homogenitas Ragam Data

Sebelum melanjutkan dengan uji ANOVA maka akan dilakukan pemeriksaan dulu terhadap ragam data dengan uji Levene's Test. Data akan memiliki ragam homogen jika sig > 0.05. Dari hasil diketahui bahwa ragam data tidak homogen (sig < 0.05).

### 5.3.2 Uji ANOVA

Berdasarkan hasil uji One Way ANOVA diketahui bahwa nilai sig yang diperoleh adalah 0.000. Nilai tersebut  $<0.05$  yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan jumlah sel yang mengekspresikan TIMP-1 jaringan hati pada kelima kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak etanol daun *Moringa oleifera*.

### 5.3.3 Uji Beda Post Hoc Tukey

Untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan maka dilanjutkan dengan post hoc tukey. Berdasarkan hasil uji post hoc tukey diketahui bahwa:

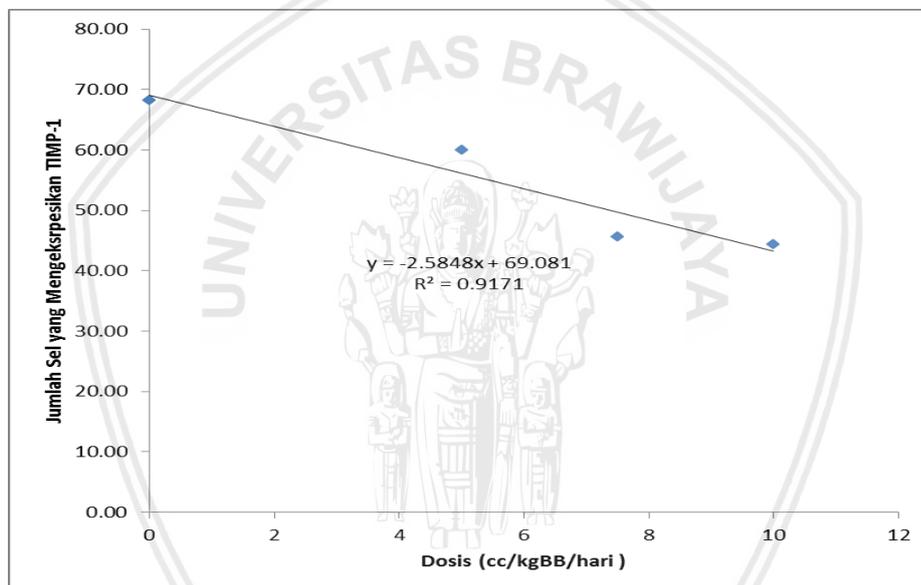
**Tabel 5.1 Hasil Uji Post Hoc Tukey dengan Jumlah Sel yang Mengekspresikan TIMP-1 pada Jaringan Hati**

Kelompok		Sig	Keterangan
K-Negatif	K-Positif	0.000	Signifikan
	KP-1	0.002	Signifikan
	KP-2	0.111	Tidak Signifikan
K-Positif	KP-3	0.150	Tidak Signifikan
	KP-1	0.873	Tidak Signifikan
	KP-2	0.095	Tidak Signifikan
KP-1	KP-3	0.069	Tidak Signifikan
	KP-2	0.467	Tidak Signifikan
KP-2	KP-3	0.379	Tidak Signifikan
	KP-3	1.000	Tidak Signifikan

- Kelompok yang memberikan hasil berbeda jika dibandingkan dengan K-negatif adalah K-Pos dan P1.
- Dibandingkan dengan K+, kelompok yang berbeda hanya K-Neg
- Antar kelompok perlakuan tidak terdapat perbedaan yang nyata.

### 5.3.4 Uji Korelasi

Nilai sig korelasi yang diperoleh adalah 0.000 yang bernilai  $<0.05$ . Maka dapat disimpulkan terdapat korelasi yang signifikan antara dosis ekstrak dengan jumlah sel yang mengekspresikan TIMP-1 pada jaringan hati. Besarnya korelasi adalah -0.534 yang masuk dalam rentang cukup kuat. Selain itu arah korelasi yang bertanda negatif memberikan kesimpulan bahwa setiap penambahan dosis akan menurunkan jumlah sel yang mengekspresikan TIMP-1 pada jaringan hati.



**Gambar 5.4 Grafik Korelasi Dosis Ekstrak Etanol Daun *Moringa oleifera* dengan Jumlah Sel yang Mengekspresi TIMP-1 Jaringan Hati Tikus Model Fibrosis**

## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Pembuatan Tikus Model Fibrosis

*Carbon tetrachloride* ( $\text{CCl}_4$ ) adalah hepatotoksin yang menyebabkan cedera hati akut dan, bila diberikan secara berulang dengan dosis rendah, akan menginduksi fibrosis hati. Ini merupakan salah satu penginduksi hati yang paling banyak dipelajari dalam fibrosis (Scholten dkk,2015).  $\text{CCl}_4$  dimetabolisme di hati oleh superfamili sitokrom P450 monooksigenase (keluarga CYP) dalam hepatosit untuk menjadi senyawa radikal triklorometil ( $\text{CCl}_3$ ). Selanjutnya, untuk menghasilkan senyawa reaktif metabolit radikal ini bereaksi dengan asam nukleat, protein, lipid, dan karbohidrat atau merubah molekul target melalul pembentukan ikatan sekunder (peroroksidasi lipid, pembentukan ROS, perubahan dari glutathion reduksi atau glutathion oksidasi, GSH/GSSG, sehingga mengganggu homeostasis seluler (Weber, 2003). Di hati, radikal  $\text{CCl}_3$  terbentuk, yang menginduksi kerusakan hepatosit dan aktivasi sel stellate hati, mengarah ke produksi matriks ekstraseluler. Pemberian  $\text{CCl}_4$  menyebabkan infiltrasi seluler inflamasi, nekrosis hepatoseluler, pembentukan septum fibrosa, deposisi serat kolagen, dan pembentukan lobus semu (Gan dkk, 2018).

Gangguan seluler hati dapat terjadi 15 menit setelah  $\text{CCl}_4$  memasuki tubuh, yang mencapai nilai puncak pada 48 jam. Selanjutnya, hati memasuki tahap renovasi dan administrasi  $\text{CCl}_4$  terus dilakukan sengan interval 3-4 hari. Renovasi itu dicerai berulang kali, dan terjadilah fibrosis hati. Model hewan fibrosis hati yang diinduksi oleh  $\text{CCl}_4$  menunjukkan aspek morfologis dan patofisiologis mirip dengan fibrosis hati manusia. Selain itu, pengembangbiakan tikus itu sederhana,

pemodelan pada tikus itu mudah, biaya waktu rendah, dan fitur patologis stabil dan dapat diandalkan (Li, 2012).

$\text{CCl}_4$  adalah cairan bening yang mudah menguap ke udara. Oleh karena itu  $\text{CCl}_4$  disimpan didalam botol yang tertutup rapat dan di dalam lemari pendingin dengan suhu 2-8 derajat selsius (ASTDR). Selama waktu penelitian,  $\text{CCl}_4$  disimpan di dalam botol kaca gelap disimpan di dalam lemari pendingin.  $\text{CCl}_4$  dikeluarkan dari lemari pendingin jika melakukan penginduksian pada tikus, sekitar setengah jam setiap harinya selama 12 minggu. Hal tersebut yang kemungkinan menyebabkan terjadi penguapan  $\text{CCl}_4$  yang akan menyebabkan berkurangnya konsentrasi  $\text{CCl}_4$  dan perubahan perbandingan dengan minyak jagung sebagai pelarutnya, sehingga kualitasnya menurun.

Pada penelitian ini, digunakan  $\text{CCl}_4$  10% 1 ml/KgBB 2 kali seminggu, (Li dkk, 2012; Scholten dkk, 2015). Pada awal penelitian direncanakan untuk melakukan perlakuan selama 9 minggu sampai tikus mengalami fibrosis pada derajat F3 untuk melihat penurunan derajat fibrosis, tetapi setelah dilakukan pengecekan pada salah satu tikus grup kontrol positif yang dikorbankan, berdasarkan skor Metavir tikus masih berada pada derajat F1, sehingga waktu perlakuan diperpanjang menjadi 12 minggu. Pada minggu ke-12 tikus kontrol menunjukkan derajat F2, tidak sesuai dengan penelitian Li tahun 2012, yaitu pada minggu ke-9 sampai dengan minggu ke-12 patologi tikus menunjukkan derajat F3. Selanjutnya, dosis dinaikan menjadi 2 ml/KgBB  $\text{CCl}_4$  10% (Wang dkk, 2016) 2x seminggu pada minggu ke-13 sampai minggu ke-14. Pada minggu ke-14 semua tikus sudah memberikan hasil derajat fibrosis hati F3, yaitu terbentuk multisepta hingga multilobular fibrosis disertai dengan kerusakan struktur intralobular dan adanya steatosis. Hal tersebut berbeda dengan penelitian Li tahun 2012, yang

menyebutkan bahwa pada minggu ke-13 sampai dengan minggu ke-15 fibrosis di daerah portal menunjukkan hiperplasia yang jelas, septum fibrosa melebar, pembagian jaringan terbentuk dalam sel-sel hati, lobus semu hati terbentuk, dan fibrosis hati atipikal terbentuk, yang menunjukkan tahap sirosis hati atau derajat fibrosis hati F4.

Perbedaan dengan penelitian yang dilakukan oleh Li (2012) kemungkinan adalah menggunakan minyak jagung sebagai pelarut  $\text{CCl}_4$  dan penelitian tersebut menggunakan tikus Sprague-dawley. Pada penelitian yang dilakukan oleh Khedr (2014) yang menggunakan minyak jagung sebagai pelarut  $\text{CCl}_4$  dengan perbandingan 1:1 diinjeksikan sebanyak 1 ml/KgBB 2x seminggu selama 12 minggu pada tikus Wistar jantan, menghasilkan fibrosis hati derajat F3 (Khedr, 2014). Minyak jagung merupakan salah satu jenis pelarut yang dapat digunakan selain minyak zaitun sebagai pelarut  $\text{CCl}_4$  dalam menginduksi fibrosis (Delire, 2015). Sedangkan pada penelitian yang dilakukan oleh Dong, tikus jenis wistar diinduksi 50% larutan  $\text{CCl}_4$  minyak zaitun pada 1 ml/KgBB 2x seminggu, selama 9 minggu menghasilkan 3 tikus dengan derajat F2, 4 ekor tikus derajat F3 dan satu ekor tikus derajat F4 (Dong, 2016). Oleh karena itu, tidak ada protokol pasti untuk pelarut dan jenis tikus.

## **6.2 Efek Moringa oleifera terhadap Eksperi TIMP-1 pada Jaringan Hati Fibrosis**

Hasil dari studi ini menunjukkan bahwa induksi  $\text{CCl}_4$  menyebabkan peningkatan ekspresi TIMP-1 pada jaringan hati tikus model fibrosis hati. Dapat diketahui dari perbedaan jumlah sel yang mengekspresikan TIMP-1 pada kelompok tikus tanpa perlakuan atau kontrol negatif (K-Neg) dengan tikus yang

diinduksi CCl<sub>4</sub> atau tikus kelompok positif (K-Pos), yang mana jumlahnya jauh lebih banyak pada tikus diinduksi CCl<sub>4</sub>. Sejalan dengan hasil studi Wang dkk, 2017, bahwa ekspresi TIMP-1 jaringan hati meningkat pada tikus model fibrosis hati. Selanjutnya, terdapat penurunan ekspresi TIMP-1 jaringan hati pada kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak daun *Moringa oleifera*, Selain itu peningkatan dosis ekstrak daun *Moringa oleifera* akan semakin menurunkan ekspresi TIMP-1 pada jaringan hati.

Ekspresi TIMP-1 pada jaringan hati memiliki perbedaan yang signifikan hanya pada kelompok yang tidak diberi perlakuan (K-Neg) dengan kelompok yang diinduksi CCl<sub>4</sub> (K-Pos), dan kelompok yang tidak diberi perlakuan (K-Neg) dengan kelompok yang diberi ekstrak daun *Moringa oleifera* peronde dengan dosis 150 mg/KgBB (KP-1), hal tersebut mengindikasikan bahwa pemberian CCl<sub>4</sub> secara kronik secara signifikan meningkatkan ekspresi TIMP-1 pada jaringan hati yaitu pada hepatosit, HSC dan sel Kupffer (Wang dkk,2011) dan ekstrak daun *Moringa oleifera* dengan dosis 150 mg/KgBB sudah dapat menurunkan ekspresi TIMP-1 jaringan hati dengan signifikan pada tikus fibrosis jika dibandingkan tikus yang sehat.

Selanjutnya, terdapat penurunan ekspresi TIMP-1 pada jaringan hati antara kelompok yang diinduksi CCl<sub>4</sub> (K-Pos) dengan ke-3 kelompok perlakuan model fibrosis yang diberi dosis ekstrak daun *Moringa oleifera* yang berbeda dan ekspresi TIMP-1 jaringan hati semakin menurun seiring dengan peningkatan dosis ekstrak daun *Moringa oleifera*. Namun, secara statistik perbandingan antara kelompok yang diinduksi CCl<sub>4</sub> (K-Pos) dengan kelompok perlakuan 1 yang diberi ekstrak daun *Moringa oleifera* 150 mg/KgBB memiliki nilai  $p=0,873$ , kelompok induksi CCl<sub>4</sub> dengan kelompok perlakuan 2 dengan dosis ekstrak daun *Moringa*

*oleifera* 300 mg/KgBB memiliki nilai  $p=0,095$  dan kelompok yang diinduksi  $CCl_4$  dengan diberi ekstrak daun *Moringa* sebanyak 600 mg/KgBB ( $p=0,069$ ), yang artinya ketiga perbandingan tersebut tidak signifikan. Walaupun demikian, hasil uji post hoc tukey tersebut terus mendekati angka 0,05, yang selanjutnya dilakukan uji korelasi dengan hasil cukup kuat. Secara keseluruhan hal tersebut menjelaskan bahwa pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* tidak dapat menurunkan ekspresi TIMP-1 jaringan hati pada model fibrosis hati.

Senyawa fenolik yang terkandung dalam *Moringa oleifera* memiliki berbagai efek proteksi terhadap stres oksidatif. Ini karena senyawa fenolik tersebut dapat berfungsi sebagai agen pereduksi melalui *singlet oxygen scavenger* dan donor atom hidrogen dengan stabilisasi radikal bebas yang selanjutnya membentuk senyawa stabil yang tidak menginisiasi atau menyebabkan oksidasi. Selain itu, keterlibatan aktivitas anti-inflamasi dari senyawa fenolik dalam mekanisme perlindungan tidak dapat diabaikan sehingga *Moringa oleifera* juga akan menghambat sitokin pro inflamasi (Basra dkk, 2016). Oleh karena itu ROS dan sitokin yang dihasilkan oleh cedera hati dapat dihambat dan tidak mengaktifasi HSC. Jika ROS dan sitokin ini dihambat, keseimbangan MMP dan TIMP terjaga dan tidak terjadi ekspresi TIMP-1 yang berlebih oleh HSC teraktivasi, sel Kupffer dan hepatosit (Wang, dkk 2011) yang akan menyebabkan akumulasi ECM sehingga terjadi fibrosis (Yoshiji, 2000). Selain itu, TIMP1 menginduksi fibrosis hati dengan melindungi kematian HSC (Wang, dkk 2011). Ekstrak daun *Moringa oleifera* dengan kandungan antioksidannya yang tinggi, terutama fenol, dapat menyebabkan kematian sel dengan aktivasi protein proapoptosis dan menghambat aksi protein anti apoptosis (Sadek dkk, 2017). Hasil perhitungan rata-rata sel yang mengekspresikan TIMP-1 pada jaringan hati terjadi penurunan saat

peningkatan dosis ekstrak *Moringa oleifera* yaitu dari 60.00, 45.67, sampai dengan 44.33, tetapi secara statistik penurunan tersebut tidak signifikan. Dengan demikian, hasil dari studi ini tidak sesuai dengan hipotesis, kemungkinan hal ini disebabkan oleh perbedaan *exposure* saat pemfotoan *immunofluorescence*.



## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan bahwa paparan ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* tidak dapat menurunkan ekspresi TIMP-1 jaringan hati

#### 7.2 Saran

Berdasarkan kesimpulan yang telah dikemukakan, maka diberikan saran – saran yang dapat diambil untuk menyempurnakan penelitian yang telah dilakukan, yaitu sebagai berikut :

1. Perlu penggunaan marker lain untuk setiap sel yaitu HSC, sel Kupffer dan hepatosit
2. Penambahan jumlah lapang pandang menjadi 10 lapang pandang dan menggunakan perbesaran 400x
3. Penyamaan waktu *exposure*

#### 7.3 Keterbatasan Penelitian

1. Lama *exposure* pada pemfotoan *immunofluorescence* berbeda-beda
2. Penghitungan jumlah sel yang mengekspresikan TIMP-1 hanya pada 5 lapang pandang

## Daftar Pustaka

- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M. dan Gilani, A.H. Moringa oleifera: a food plant with Multiple Medicinal Uses. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 2007, 21 (1): 17-25.
- Alcolado, R., Arthur, M.J.P. and Iredale, J.P. Pathogenesis of liver fibrosis. *Clinical science*, 1997, 92(2): 103-112.
- Arriazu, E., Ruiz de Galarreta, M., Cubero, F. J., Varela-Rey, M., Pérez de Obanos, M. P., Leung, T. M., ... Nieto, N. (2014). *Extracellular Matrix and Liver Disease. Antioxidants & Redox Signaling*, 21(7): 1078–1097.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) 2005. Toxicological profile for carbon tetrachloride. Atlanta GA: US. Department of Public Health and Human Services Public Health Service. Nutritional Biochemistry of the Vitamins. Cambridge University Press. Ed 2 nd.
- Battaller, R. dan Brenner, D.A. Liver Fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115 (2): 209-218.
- Bemion, D. and Arthur, M.J.P., 2001. Extracellular Matrix Degradation and The Role of Stellate Cells.
- Birukawa N. K., Murase, K., Sato, Y., Kosaka, A., Yoneda, A., Nishita, H., Miyazaki, M. Activated Hepatic Stellate Cells are Dependent on Self-Collagen, Cleaved by Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase for Their Growth. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289 (29): 20209-20221.
- Bourbouliou, D. and Stetler-Stevenson, W.G. Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs): Positive and Negative Regulators in Tumor Cell Adhesion. *In Seminars in cancer biology*, 2010, Academic Press. 20(3): 161-166
- Brenner, D., A. Molecular pathogenesis of Liver Fibrosis. 2009, 120: 361–368.
- Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular cell research*, 2010, 1803 (1): 55-71.
- Calabro, S.R., Maczurek, A.E., Morgan, A.J., Tu, T., Wen, V.W., Yee, C., Mridha, A., Lee, M., d'Avigdor, W., Locarnini, S.A. and McCaughan, G.W. Hepatocyte Produced Matrix Metalloproteinases are Regulated by CD147 in Liver Fibrogenesis. *PloS one*, 2014, 9(7): e90571.

- Caley, M. P. Martins, V. L. C. dan O'Toole E. A. Metalloproteinases and Wound Healing. *Advances In Wound Care*, 2014, 4(4).
- Campana, L. dan Iredale, J. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors. *In: Stellate Cells in Health and Disease*, 2015, 107-124.
- Canbay, A., Friedman, S., dan Gores, G. J. Apoptosis: The Nexus of Liver Injury and Fibrosis. *Hepatology*, 2004, 39 (2): 273-278.
- Czaja, A.J. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2014, 20(10): 2515.
- Constandinou, C., Henderson, N., dan Iredale, J. P. Modeling liver fibrosis in rodents. *In Fibrosis Research, 2005*, 237-250.
- de Andrade, K., Moura, F., dos Santos, J., de Araújo, O., de Farias Santos, J. and Goulart, M., 2015. Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine. *International journal of molecular sciences*, 16(12): 30269-30308.
- Delire, B., Stärkel, P. dan Leclercq, I. Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What is Under Development. *Journal of clinical and translational hepatology*, 2015, 3 (1): 53.
- Depkes 2014, *Situasi dan Analisis Hepatitis*. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI, Jakarta, hal.1.
- Duarte, S., Baber, J., Fujii, T., dan Coito, A.J. Matrix Metalloproteinases in Liver Injury, Repair and Fibrosis. *Matrix Biology*, 2015, 44: 147-156.
- Duval, F., Moreno-Cuevas, J.E., González-Garza, M.T., Maldonado-Bernal, C. and Cruz-Vega, D.E. Liver fibrosis and Mechanisms of The Protective Action of Medicinal Plants Targeting Inflammation and The Immune Response. *International Journal of Inflammation*, 2014, 2015
- El-bakry, K., Toson, E. S., Serag, M., dan Aboaser, M. Hepatoprotective Effect of Moringa oleifera Leaves Extract Against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Damage in Rats. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 2016, 5 (5): 76-89.
- Elsharkawy, A.M., Oakley, F. and Mann, D.A. The Role and Regulation of Hepatic Stellate Cell Apoptosis in Reversal Of Liver Fibrosis. *Apoptosis*, 2005, 10(5): 927-939.
- Fujita, T. and Narumiya, S. Roles of Hepatic Stellate Cells in Liver Inflammation: a New Perspective. *Inflammation and regeneration*, 2016, 36(1): 1
- Friedman, S.L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1655-1669.

- Gan, D., Zhang, W., Huang, C., Chen, J., He, W., Wang, A., Li, B. dan Zhu, X. Ursolic Acid Ameliorates CCl<sub>4</sub>-induced Liver Fibrosis through The NOXs/ROS pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 233(10): 6799-6813.
- Gandhi, C.R., 2012. Oxidative stress and hepatic stellate cells: A paradoxical relationship. *Trends in cell & molecular biology*, 7, p.1.
- Giannandrea, M., & Parks, W. C. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Disease models & mechanisms*, 2014, 7 (2): 193-203.
- Grünwald, B., Schoeps, B., dan Krüger, A. Recognizing the Molecular Multifunctionality and Interactome of TIMP-1. *Trends in cell biology*. 2019, 29 (1)
- Hemann, S., Graf, J., Roderfeld, M., dan Roeb, E. Expression of MMPs and TIMPs In Liver Fibrosis—A Systematic Review with Special Emphasis on Anti-Fibrotic Strategies. *Journal Of Hepatology*, 2007, 46 (5): 955-975.
- Henderson, N.C. and Iredale, J.P. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clinical Science*, 2007, 112(5): 265-280.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1979) Carbon Tetrachloride. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum 20: 371–99, Lyon, France
- Iredale, J. P., Thompson, A., dan Henderson, N. C. Extracellular Matrix Degradation in Liver Fibrosis: Biochemistry and Regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2013, 1832 (7): 876-883.
- Iqbal, S., Bhangar, M. I. Effect of Season and Production Location on Antioxidant activity of Moringa oleifera Leaves Grown In Pakistan. *J. of Food Comp. and Anal*, 2006, 19: 544-551
- Jadeja, R.N., Devkar, R.V. and Nammi, S., S. Oxidative stress in liver diseases: pathogenesis, prevention, and therapeutics. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 2017.
- Kessenbrock, K., Plaks, V. dan Werb, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of The Tumor Microenvironment. *Cell*, 2010, 141 (1): 52-67.
- Khedr, N.F. dan Khedr, E.G. Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Curcumin on CCl<sub>4</sub>-induced liver Fibrosis in Rats. *Am. J. Biomed. Sci*, 2014, 6 (3): 191-200.
- Kusumobroto, H., 2007. Sirosis Hati, dalam: Buku Ajar Ilmu Penyakit Hati Edisi I. FK Universitas Indonesia, Jakarta.

- Knockaert L, Berson A, Ribault C, Prost PE, Fautrel A, Pajaud J, Lepage S, Lucas-Clerc C, Bégué JM, Fromenty B, Robin MA. Carbon Tetrachloride-Mediated Lipid Peroxidation Induces Early Mitochondrial Alterations in Mouse Liver. *Laboratory Investigation*, 2012, 92 (3): 396.
- Koyama, Y., Xu, J., Liu, X. dan Brenner, D.A. New Developments on The Treatment of Liver Fibrosis. *Digestive Diseases*. 2016, 34 (5): 589-596.
- Lee, U.E. and Friedman, S.L., 2011. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 25(2): 195-206.
- Liu, T., Wang, X., Karsdal, M.A., Leeming, D.J., dan Genovese, F. Molecular serum Markers of Liver Fibrosis. *Biomarker Insights*, 2012, 7: 105–117
- Liedtke, C., Luedde, T., Sauerbruch, T., Scholten, D., Streetz, K., Tacke, F., Tolba, R., Trautwein, C., Trebicka, J. dan Weiskirchen, R. Experimental Liver Fibrosis Research: Update on Animal Models, Legal Issues and Translational Aspects. *Fibrogenesis & tissue repair*, 2013, 6 (1): 19.
- Luangmonkong, T., Suriguga, S., Mutsaers, H.A., Groothuis, G.M., Olinga, P. and Boersema, M., 2018. Targeting oxidative stress for the treatment of liver fibrosis. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 175* : 71-102. Springer, Cham.
- Martin, M.D. dan Matrisian, L.M. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2007, 26 (3-4): 717
- Masciantonio, M.G., Lee, C.K., Arpino, V., Mehta, S. dan Gill, S.E. The balance between metalloproteinases and TIMPs: Critical Regulator Of Microvascular Endothelial Cell Function In Health And Disease. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2007, Academic Press, 147: 101-131.
- Murphy, F., Issa, R., Zhou, X., Ratnarajah, S., Nagase, H., Arthur, M.J., Benyon, C., dan Iredale, J. P. Inhibition of Apoptosis of Activated Hepatic Stellate Cells by Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 is mediated Via Effects on Matrix Metalloproteinase Inhibition :Implications for Reversibility Of Liver Fibrosis. *J.Biol.Chem*, 2002, 277: 11069–11076
- Nagase, H., Visse, R. dan Murphy, G. Structure and Function of Matrix Metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*, 2006, 69 (3): 562-573
- NTP (National Toxicology Program) (2005a) Carbon tetrachloride CAS No. 56-23-5. Report on Carcinogens, Eleventh Edition, 1–2, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program: Research Triangle Park, NC

- Putra, I.W.D.P., Dharmayudha, A.A.G.O. dan Sudimartini, L.M. Identifikasi Senyawa Kimia Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera* L) di Bali. *Indonesia Medicus Veterinus*, 2016, 5 (5): 464-473.
- Panjaitan, R.G.P., Handharyani, E., Chairul, M., Zakiah, Z. dan Manalu, W. Pengaruh Pemberian Karbon Tetraklorida Terhadap Fungsi Hati dan Ginjal Tikus. *Makara Kesehatan*, 2007, 11 (1): 11-16.
- Potts, J.R., Maybury, C.M., Salam, A., Barker, J.N., Agarwal, K. dan Smith, C.H. Diagnosing Liver Fibrosis: A Narrative Review of Current Literature for Dermatologists. *British Journal of Dermatology*, 2017, 177 (3): 637-644.
- Reyes-Gordillo, K., Segovia, J., Shibayama, M., Vergara, P., Moreno, M. G., dan Muriel, P. Curcumin Protects Against Acute Liver Damage in The Rat by Inhibiting NF-Kb, Proinflammatory Cytokines Production and Oxidative Stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2007, 1770 (6): 989-996.
- Roeb, E., Matrix Metalloproteinases and Liver Fibrosis (translational aspects). *Matrix Biology*, 2018, 68: 463-473.
- Rockey, D.C. dan Friedman, S.L. *Hepatic Fibrosis and Cirrhosis*. Zakim and Boyer's Hepatology, 6th edn Elsevier Saunders, Philadelphia, 2012. pp.64-85.
- Sadek, K.M., Abouzed, T.K., Abouelkhair, R. dan Nasr, S. The Chemo-Prophylactic Efficacy of an Ethanol *Moringa Oleifera* Leaf Extract Against Hepatocellular Carcinoma in Rats. *Pharmaceutical biology*, 2017, 55 (1): 1458-1466.
- Scholten, D., Trebicka, J., Liedtke, C. dan Weiskirchen, R. The Carbon Tetrachloride Model in Mice. *Laboratory Animals*, 2015, 49 (1\_suppl): 4-11.
- Su, T.H., Kao, J.H. dan Liu, C.J. Molecular Mechanism and Treatment of Viral Hepatitis-Related Liver Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15 (6): 10578-10604.
- Sulaiman A. Lesmana dan Noer. Buku ajar ilmu penyakit hati. Jakarta: Jayabadi. 2007.
- Sulistyorini, R., Johan, A. dan Djamiatun, K. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) pada Ekspresi Insulin dan Insulinitis Tikus Diabetes Melitus. *Majalah Kedokteran Bandung*, 2015, 47 (2): 69-76.
- Takehara, T., Tatsumi, T., Suzuki, T., Rucker III, E.B., Hennighausen, L., Jinushi, M., Miyagi, T., Kanazawa, Y. and Hayashi, N. Hepatocyte-Specific Disruption of Bcl-XI Leads to Continuous Hepatocyte Apoptosis and Liver Fibrotic Responses. *Gastroenterology*, 2004, 127(4): 1189-1197.

- Tanaka, M. and Miyajima, A. Liver Regeneration and Fibrosis after Inflammation. *Inflammation and regeneration*, 2016, 36(1): 19.
- Thiele, N.D., Wirth, J.W., Steins, D., Koop, A.C., Ittrich, H., Lohse, A.W. dan Kluwe, J. TIMP-1 is Upregulated, but Not Essential in Hepatic Fibrogenesis and Carcinogenesis in Mice. *Scientific reports*, 2017, 7 (1): 714.
- Vulimiri, S.V., Pratt, M.M., Kulkarni, S., Beedanagari, S. dan Mahadevan, B. Reproductive and Developmental Toxicology: Toxic Solvents and Gases. *In Reproductive and Developmental Toxicology*, 2011, 303-315. Academic Press.
- Wang, K. Molecular Mechanisms of Hepatic Apoptosis. *Cell death & disease*, 2014, 5(1): e996.
- Wu, L., Zhang, Q., Mo, W., Feng, J., Li, S., Li, J., Liu, T., Xu, S., Wang, W., Lu, X. dan Yu, Q. Quercetin Prevents Hepatic Fibrosis by Inhibiting Hepatic Stellate Cell Activation and Reducing Autophagy via The TGF-B1/Smads and PI3K/Akt Pathways. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 9289.
- Weber, L.W., Boll, M. dan Stampfl, A. Hepatotoxicity and Mechanism of Action of hHloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. *Critical Reviews in Toxicology*, 2003, 33 (2): 105-136.
- Yoshiji, H., Kuriyama, S., Miyamoto, Y., Thorgeirsson, U. P., Gomez, D. E., Kawata, M., Nakatani, T., dkk. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Promotes Liver Fibrosis Development in A Transgenic Mouse Model. *Hepatology*, 2000, 32 (6): 1248-1254.
- Zeisberg, M., Yang, C., Martino, M., Duncan, M.B., Rieder, F., Tanjore, H. and Kalluri, R. Fibroblasts Derive from Hepatocytes in Liver Fibrosis Via Epithelial to Mesenchymal Transition. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(32): 223337-23347.
- Zhu, W. dan Fung, P.C.W. The Roles Played by Crucial Free Radicals like Lipid Free Radicals, Nitric Oxide, and Enzymes NOS and NADPH In CCl<sub>4</sub>-Induced Acute Liver Injury of Mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 29 (9): 870-880.

LAMPIRAN 1 :

**Hasil Uji Statistik Ekspresi TIMP-1 Pada Jaringan Hati**  
**Hasil Uji Normalitas**  
**Shapiro Wilk**

**Tests of Normality**

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah Sel	K-Neg	.279	6	.156	.880	6	.267
	K-Pos	.318	6	.058	.804	6	.063
	P1	.182	6	.200*	.928	6	.565
	P2	.229	6	.200*	.844	6	.140
	P3	.158	6	.200*	.991	6	.991

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

**Hasil Uji Homogenitas**  
**Levene's Test**

**Test of Homogeneity of Variances**

Jumlah Sel

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.815	4	25	.015

**ANOVA**

Jumlah Sel

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6916.867	4	1729.217	7.868	.000
Within Groups	5494.333	25	219.773		
Total	12411.200	29			

**Tabel Hasil Uji Post Hoc Tukey**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Jumlah Sel  
 Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K-Neg	K-Pos	-44.33333*	8.55908	.000	-69.4702	-19.1964
	P1	-36.16667*	8.55908	.002	-61.3036	-11.0298
	P2	-21.83333	8.55908	.111	-46.9702	3.3036
	P3	-20.50000	8.55908	.150	-45.6369	4.6369
K-Pos	K-Neg	44.33333*	8.55908	.000	19.1964	69.4702
	P1	8.16667	8.55908	.873	-16.9702	33.3036
	P2	22.50000	8.55908	.095	-2.6369	47.6369
	P3	23.83333	8.55908	.069	-1.3036	48.9702
P1	K-Neg	36.16667*	8.55908	.002	11.0298	61.3036
	K-Pos	-8.16667	8.55908	.873	-33.3036	16.9702
	P2	14.33333	8.55908	.467	-10.8036	39.4702
	P3	15.66667	8.55908	.379	-9.4702	40.8036
P2	K-Neg	21.83333	8.55908	.111	-3.3036	46.9702



	K-Pos	-22.50000	8.55908	.095	-47.6369	2.6369
	P1	-14.33333	8.55908	.467	-39.4702	10.8036
	P3	1.33333	8.55908	1.000	-23.8036	26.4702
P3	K-Neg	20.50000	8.55908	.150	-4.6369	45.6369
	K-Pos	-23.83333	8.55908	.069	-48.9702	1.3036
	P1	-15.66667	8.55908	.379	-40.8036	9.4702
	P2	-1.33333	8.55908	1.000	-26.4702	23.8036

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

### Tabel Korelasi

#### Correlations

		Jumlah Sel	Dosis
Jumlah Sel	Pearson Correlation	1	-.534**
	Sig. (2-tailed)		.007
	N	24	24
Dosis	Pearson Correlation	-.534**	1
	Sig. (2-tailed)	.007	
	N	24	24

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

#### Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.534 <sup>a</sup>	.285	.253	15.80529

a. Predictors: (Constant), Dosis

#### ANOVA<sup>a</sup>

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2192.201	1	2192.201	8.776	.007 <sup>b</sup>
	Residual	5495.757	22	249.807		
	Total	7687.958	23			

a. Dependent Variable: Jumlah Sel

b. Predictors: (Constant), Dosis

#### Coefficients<sup>a</sup>

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	69.081	5.873		11.762	.000
	Dosis	-2.585	.873	-.534	-2.962	.007

a. Dependent Variable: Jumlah Sel

## LAMPIRAN 2. Berat Badan Tikus dan Ekspresi TIMP-1

Perlakuan	Tikus	BB Awal (gram)	BB Akhir (gram)	Jumlah Sel yang Mengekspresikan TIMP-1 Jaringan Hati	Rerata Jumlah Sel yang Mengekspresikan TIMP-1
<b>K-Neg</b> (injeksi NaCl 1 cc/kgBB IP 2x/minggu sonde aquades 2,5 cc selama 101 hari)	2	143	368	19	24
	3	175	268	19	
	4	204	380	17	
	5	201	363	27	
	7	246	392	29	
	8	205	338	32	
<b>K-Pos</b> (injeksi CCl <sub>4</sub> 10% 1 cc/kgBB IP 2x/minggu sonde aquades 2,5 cc selama 101 hari)	3	183	241	51	68
	4	182	294	115	
	5	181	362	48	
	6	194	288	54	
	7	190	334	58	
	8	188	317	83	
<b>KP-1</b> (injeksi CCl <sub>4</sub> 10% 1 cc/kgBB IP 2x/minggu sonde MO dosis 150 mg/kgBB selama 101 hari)	1	216	349	62	60
	2	246	324	57	
	3	182	219	59	
	4	182	326	47	
	6	171	235	67	
	7	178	309	68	
<b>KP-2</b> (injeksi CCl <sub>4</sub> 10% 1 cc/kgBB IP 2x/minggu dan sonde MO dosis 300 mg/kgBB selama 101 hari)	2	164	380	41	46
	3	210	313	45	
	4	213	291	48	
	5	175	298	38	
	7	159	280	40	
	8	150	232	62	
<b>KP-3</b> (injeksi CCl <sub>4</sub> 10% 1 cc/kgBB IP 2x/minggu dan sonde MO dosis 600 mg/kgBB selama 101 hari)	2	179	298	44	44
	4	183	293	22	
	5	172	336	46	
	6	254	330	67	
	7	232	310	34	
	8	154	195	53	

### LAMPIRAN 3. Dokumentasi Kegiatan



Kandang tikus



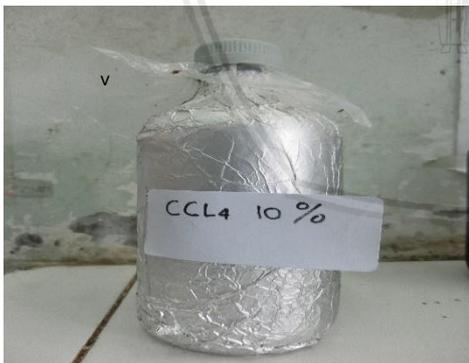
Proses pembuatan ekstrak MO



Ekstrak *Moringa oleifera*



Proses pembuatan CCl<sub>4</sub>



CCl<sub>4</sub>



Penimbangan berat badan tikus



Sonde ekstrak MO



Injeksi  $\text{CCl}_4$  intraperitoneal



Injeksi ketamine di intramuskular tikus



Pembedahan tikus



Pembedahan tikus



Organ hati tikus

## LAMPIRAN 4. Lembar Kelaikan Etik

## Lembar Kelaikan Etik



**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI**  
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN**  
**KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN**

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia  
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755  
<http://www.fk.ub.ac.id> e-mail : [kep.fk@ub.ac.id](mailto:kep.fk@ub.ac.id)

---

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK**  
**("ETHICAL CLEARANCE")**

**No. 153A / EC / KEPK / 06 / 2018**

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

**JUDUL** : Potensi Ekstrak Etanol Daun *Moringa oleifera Lamk.* dalam Menghambat Progresivitas Fibrosis Hati dan Studi Efek Sampingnya terhadap Penurunan Fungsi Ginjal pada Tikus Model Fibrosis Hati.

**PENELITI UTAMA** : dr. Supriono, Sp.PD-KGEH

**ANGGOTA** :

1. dr. Yeni Larasati	9. dr. Amanda Cininta Wowor	17. Fiorecentia Candra M
2. dr. Nadia Zerlinda Mustamsir	10. dr. Fikri Baladraf	18. Muhammad Irfan D
3. dr. Rifal Renaldi	11. dr. Ponda H Ernest Hadinata	19. Zalfa Daulah
4. dr. Edy Susanto	12. Febryana Nur Safitri, S.Ked	20. Azkiya Zahra
5. dr. Rahmantio Adi	13. Lestari Kanti Wilujeng, S.Ked	21. Zuke Ulva Diana
6. dr. Safarina Kharima Laitupa	14. Mokhamad Fahmi Rizki S	22. Alya Safira
7. dr. Ayu Cahya Andhayani	15. Kartika Widyasari	23. Yunita Lestari I
8. dr. Ade Rahmawati	16. Muth'ah Adira Juwono	24. Ruth Clarita Pradibdo
		25. Doharni Olivia N

**UNIT / LEMBAGA** : Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

**TEMPAT PENELITIAN** : Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

**DINYATAKAN LAIK ETIK.**



Malang, 28 JUN 2018  
Ketua,  
Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr.H.  
NIK. 160746683

**Catatan :**  
Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan  
Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)

