

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN *Moringa oleifera* TERHADAP
EKSPRESI CYTOKERATIN 7 (CK7) DAN VAKUOLISASI SEL HEPATOSIT**

PADA DERAJAT FIBROSIS HATI AKIBAT INJEKSI KARBON

TETRAKLORIDA (CCI4)

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

**YUNITA LESTARI INDRIANTO
NIM: 16507010111019**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN *Moringa oleifera* TERHADAP
EKSPRESI CYTOKERATIN 7 (CK7) DAN VAKUOLISASI SEL HEPATOSIT**

**PADA DERAJAT FIBROSIS HATI AKIBAT INJEKSI KARBON
TETRAKLORIDA (CCI₄)**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

**YUNITA LESTARI INDRIANTO
NIM: 16507010111019**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN *Moringa oleifera*
TERHADAP EKSPRESI CYTOKERATIN 7 (CK7) DAN VAKUOLISASI SEL**

HEPATOSIT PADA DERAJAT FIBROSIS HATI AKIBAT INJEKSI

KARBON TETRAKLORIDA (CCI₄)

Oleh :

Yunita Lestari Indrianto
NIM. 165070101111019

Telah diuji pada

Hari : Senin.

Tanggal : 9 Desember 2019

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

dr. Wening Prastowo, Sp.F
NIP. 197505082005011001

Pembimbing I/Penguji II,
II/Penguji III,

Pembimbing

dr. Supriono, Sp.PD-KGEH
NIP. 196605171998031004
2016078104062001

dr. Astri Proborini, Sp.A, M.Biomed.
NIP.

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter,

dr. Triwahju Astuti, M.Kes, Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yunita Lestari Indrianto

NIM : 165070101111019

Program Studi : Sarjana Kedokteran

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini adalah hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang,
Yang membuat pernyataan,

Yunita Lestari Indrianto
NIM. 165070101111019

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur bagi Tuhan Yesus Kristus yang hanya oleh kasih karuniaNya, penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul **PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN *Moringa oleifera* TERHADAP EKSPRESI CYTOKERATIN-7 (CK7) DAN VAKUOLISASI SEL HEPATOSIT PADA DERAJAT FIBROSIS HATI AKIBAT INJEKSI KARBON TETRAKLORIDA (CCI₄)**. Dalam hal ini, penulis hendak bersyukur lagi kepada Tuhan Yesus atas kehadiran orang-orang yang luar biasa di bawah ini

1. **Tuhan Yesus Kristus** yang dengan kasih karunia-Nya sudah memberi naungan dam penyertaan dalam pengerjaan tugas akhir ini.
2. **Orang tua saya** yang dengan memberi dukungan secara moral dan materil selama penulis berkuliah di Universitas Brawijaya.
3. **dr. Supriono, Sp.PD-KGEH** selaku Dosen Pembimbing pertama yang dengan baik hati mengizinkan penulis mengikuti penelitian pohon, meluangkan waktu untuk membimbing penulisan, dan memberi saran untuk perbaikan tugas akhir ini.
4. **dr. Astri Proborini, Sp.A, M.Biomed.** selaku Dosen Pembimbing kedua yang dengan sepenuh hati membagikan ilmu, waktu, dan perhatian bagi penulis hingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
5. **dr. Wening Prastowo, Sp.F** selaku penguji pertama yang telah memberikan arahan dalam perbaikan tugas akhir ini.
6. **dr. Triwahju Astuti, M.Kes, Sp.P(K)**, selaku Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran Universitas Brawijaya.
7. **Dr. dr. Wisnu Barlianto, Msi.Med, Sp.A(K)**, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
8. **Mas Mijan dan Pak Wibi**, yang selalu saya repotkan dalam penyediaan, pengecatan, dan pembacaan dari tugas akhir penulis ini.

9. **HU HA team (Ninda, Fira, Arab, Cumil, Sidah, Alya, Afik, Nisa, Pire,**

Kinah) yang sudah mendukung dan memotivasi serta menemani sepanjang semester ini terutama dalam pengerjaan tugas akhir ini

10. Teman-teman saya **Elva, Ruth, Shanine, dan De Britto** yang setia

mendukung dan mendoakan selama penulis menulis tugas akhir ini dan selama kehidupan perkuliahan.

11. **Melon dan Infokom LAKESMA** yang ikut menjadi tempat curhat dan

penghiburan bagi penulis di Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya.

12. **Radio Tritara FM (Ko Evan dan Ko Andre)** yang sudah menemani saya

di kos saat menemani masa-masa sulit baik dalam penulisan tugas akhir ini dan perkuliahan.

13. Dan semua pihak yang telah membantu menyelesaikan tugas akhir ini

yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Akhir kata, biarlah semuanya kembali untuk kemuliaan Bapa.

Malang,

Penulis

ABSTRAK

Indrianto, Yunita Lestari. 2019. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun *Moringa oleifera* Terhadap Ekspresi Cytokeratin-7 (CK7) dan Vakuolisasi Sel Hepatosit Pada Derajat Fibrosis Hati Akibat injeksi Karbon Tetraklorida (CCl4). Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Supriono, Sp.PD-KGEH (2) dr. Astri Proborini, Sp.A, M.Biomed.

Penyakit hati kronis menurut *Global Burden of Disease* mortalitas karena sirosis hati mencapai 1 juta kematian pada tahun 2010. Adapun kerusakan sel hepatosit masih bisa regenerasi dan melakukan reaksi duktular yang ditandai dengan adanya *cytokeratin 7* pada sitoplasma sel hepatosit. Reaksi duktular terjadi pada saat hati yang sudah mengalami kerusakan yang lebih parah dan hati tidak mampu untuk melakukan regenerasi hati. Pada hati yang mengalami fibrosis lebih parah, akan muncul adaptasi dari sel hepatosit dengan adanya vakuolisasi. Untuk mencegah progresivitas yang lebih parah bisa menggunakan *Moringa oleifera* (MO). MO dapat digunakan untuk menekan inflamasi dan menginduksi apoptosis dari sel yang rusak. Pada penelitian ini digunakan metode *randomized posttest only controlled group* yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *Moringa oleifera* (MO) terhadap *cytokeratin 7* (CK7) dan vakuolisasi sel hepatosit. Penelitian menggunakan 5 kelompok tikus dengan pembacaan menggunakan master Olyvia versi 2.4 DT for scan. Hasil uji *Kruskal Wallis* diketahui pemberian MO mencegah progresivitas kerusakan. Pemberian MO menunjukkan nilai yang signifikan pada dosis 600 mg/kgBB ($p=0,000$) dibandingkan dengan kelompok tanpa pemberian MO. akan searah dengan luas fibrosis, pada pemberian MO, vakuolisasi bertambah rendah dengan dosis MO yang tinggi yaitu pada dosis 600 mg/KgBB ($p=0,00$).

Pada uji korelasi *Spearman* menunjukkan kekuatan korelasi sangat kuat, searah, dan signifikan antara dosis MO-CK7 ($p=0,00$; koefisien= $0,798$) dan kekuatan korelasi cukup, tidak searah, dan tidak signifikan antara dosis MO- (p= $0,033$; koefisien= $0,864$). Dapat disimpulkan bahwa pemberian MO berpengaruh terhadap penurunan kadar CK7.

Kata Kunci : *Moringa oleifera*, CK7, *ductular reaction*.

ABSTRACT

Indrianto, Yunita Lestari. 2019. Effect of *Moringa oleifera* Leaf Extract on Cytokeratin-7 (CK7) Expression and Hepatocyte Cell Vacuolation in Mouse model given Chronic Carbon Tetrachloride (CCl₄) Injection. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine Brawijaya University. Pembimbing: (1) dr. Supriono, Sp.PD-KGEH (2) dr. Astri Proborini, Sp.A, M.Biomed.

Based on Global Burden of disease, hepatic cirrhosis's mortality reaches 1 million death in 2010. Hepatocyte could regenerate in acute damage. In chronic damaged liver, it would undergo ductular reaction and vacuolation would appear. Liver damage could be caused by viral and toxin such as carbon tetrachloride (CCl₄). Research had shown that *Moringa oleifera* was effective to suppress inflammation reaction and to induce apoptose of the damaged hepatocyte. This study used randomized posttest only controlled group to understand the effect between *Moringa oleifera* (MO) extract on cytokeratin 7 (CK7) and cell vacuolation. In this study, 5 groups of mice were used and for interpretation used master Olyvia versi 2.4 DT for scan. Based on Kurskal Wallis test results, noted that MO administration prevented the progression of liver damage. The administration of MO showed a significant value at dose 600 mg/kgBW ($p=0.000$) compared to the group without MO administration. Cell vacuolization would align with the extent of fibrotic area. It would decrease eventually with MO administration at 600mg/kgBW dose ($p=0.000$).

Spearman correlation showed a very strong, unidirectional and significant strenght between the MO dose – CK7 ($p=0.000$; coefficient=0.798) and on MO – cell vacuolation showed sufficient, not direct, and not significant correlation ($p=0.033$; coefficient= 0.864). It can be concluded that the administration of MO affects the decrease of CK7 level.

Keywords : *Moringa oleifera*, CK7, ductular reaction.

DAFTAR ISI

| | |
|------------------------------------|----------|
| Judul..... | i |
| Halaman Pengesahan | ii |
| Pernyataan Keaslian Tulisan | ii |
| Kata Pengantar | iv |
| Abstrak | vi |
| Abstract | vii |
| Daftar Isi | viii |
| Daftar Tabel..... | xiii |
| Daftar Gambar | xiv |
| Daftar Lampiran | xv |
| Daftar Singkatan | xvii |
| BAB 1 PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 3 |
| 1.3.1 Tujuan Umum..... | 4 |
| 1.3.2 Tujuan Khusus | 4 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 4 |
| 1.4.1 Manfaat Akademis..... | 4 |
| 1.4.2 Manfaat Praktis | 5 |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA..... | 6 |
| 2.1 Fibrosis hati..... | 6 |



| | |
|---|-----------|
| 2.1.1 Definisi Fibrosis Hati | 6 |
| 2.1.2 Etiologi Fibrosis Hati | 6 |
| 2.1.2.1 Gangguan Dengan Efek Langsung Pada Hati | 7 |
| 2.1.2.2 Gangguan Dengan Efek Pada Aliran Darah Hati..... | 9 |
| 2.1.2.3. Obat dan Zat..... | 10 |
| 2.1.2.4 Obstruksi Mekanis..... | 11 |
| 2.1.3 Patogenesis Fibrosis Hati | 11 |
| 2.2 <i>Moringa oleifera</i> | 15 |
| 2.3 Histologi hati..... | 16 |
| 2.4 Regenerasi Hati..... | 18 |
| 2.5 <i>Ductular Reaction</i> | 20 |
| 2.5.1 Mikroanatomi normal duktus biliaris | 20 |
| 2.5.2 <i>Ductular reaction</i> | 20 |
| 2.6 <i>Cytokeratin 7 (CK7)</i> | 22 |
| 2.7 Vakuolisasi sel hepatosit..... | 24 |
| 2.8 Karbon Tetraklorida (CCl ₄) | 25 |
| 2.9 Staging Fibrosis Hati..... | 26 |
| 2.9.1 METAVIR..... | 27 |
| 2.9.2 ISHAK..... | 27 |
| BAB 3 KERANGKA KONSEP PENELITIAN | 29 |
| 3.1 Kerangka Konsep Penelitian | 29 |
| 3.2 Uraian Kerangka Konsep Penelitian | 30 |
| 3.3 Hipotesis Penelitian | 30 |

| | |
|--|----|
| BAB 4 METODE PENELITIAN | 31 |
| 4.1 Rancangan Penelitian..... | 31 |
| 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian..... | 32 |
| 4.2.1 Estimasi Jumlah Sampel..... | 33 |
| 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian | 34 |
| 4.4 Variabel Penelitian | 34 |
| 4.4.1 Variabel Bebas | 34 |
| 4.4.2 Variabel Terikat | 34 |
| 4.5 Definisi Operasional..... | 34 |
| 4.6 Alat dan Bahan..... | 36 |
| 4.6.1 Alat dan Bahan untuk Pengeringan, Ekstraksi, dan Evaporasi daun <i>Moringa oleifera</i> (MO)..... | 36 |
| 4.6.2 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Tikus (Kandang dan Makanan)..... | 36 |
| 4.6.3 Alat dan Bahan untuk Pembuatan dan Penyimpanan Larutan Karbon Tetraklorida (CCl ₄)..... | 37 |
| 4.6.4 Alat dan Bahan untuk Penyimpanan Larutan Natrium Klorida (NaCl) | 37 |
| 4.6.5 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Larutan <i>Moringa oleifera</i> (MO)..... | 37 |
| 4.6.6 Alat dan Bahan untuk Injeksi Karbon Tetraklorida (CCl ₄) dan Natrium Klorida (NaCl) | 38 |
| 4.6.7 Alat dan Bahan untuk Sonde <i>Moringa oleifera</i> (MO) dan Aquades | 37 |

| | | |
|---|---|-----------|
| 4.6.8 | Alat dan Bahan untuk Pembedahan Tikus | 38 |
| 4.6.9 | Alat dan Bahan untuk Penentuan Derajat Fibrosis..... | 39 |
| 4.6.10 | Alat dan Bahan untuk Pemeriksaan CK7 | 40 |
| 4.7 | Prosedur Penelitian..... | 40 |
| 4.7.1 | Pengeringan, Ekstraksi, dan Evaporasi darun MO | 40 |
| 4.7.2 | Pemeliharaan Tikus (Kandang dan Makanan)..... | 42 |
| 4.7.3 | Pembuatan Larutan Karbon Tetraklorida (CCl ₄)..... | 44 |
| 4.7.4 | Pembuatan Larutan Natrium Klorida (NaCl) | 44 |
| 4.7.5 | Pembuatan Larutan <i>Moringa oleifera</i> (MO) | 44 |
| 4.7.6 | Injeksi Karbon Tetraklorida (CCl ₄) dan Natrium Klorida (NaCl) | 45 |
| 4.7.7 | Sonde <i>Moringa oleifera</i> (MO) dan Aquades | 46 |
| 4.7.8 | Pembedahan Tikus dan Pengambilan Organ..... | 46 |
| 4.7.9 | Pemeriksaan Ekspresi CK7 | 47 |
| 4.7.10 | Pembacaan dan Interpretasi Hasil | 51 |
| 4.8 | Pengolahan Data | 51 |
| 4.8.1 | Uji Analisis..... | 51 |
| 4.8.2 | Penulisan dan Pelaporan Hasil Penelitian | 52 |
| 4.8.3 | Alur Penelitian..... | 53 |
| BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA | | 54 |
| 5.1 | Hasil Penelitian | 54 |
| 5.2 | Analisis Data | 56 |
| 5.2.1 | Uji Asumsi data | 57 |
| 5.2.2 | Uji Normalitas Data | 57 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2.3 Uji Homogenitas Ragam Data | 57 |
| 5.2.4 Uji <i>Kruskal Wallis</i> | 58 |
| 5.2.5 Uji Korelasi <i>Spearman</i> | 60 |
| BAB 6 PEMBAHASAN | 65 |
| 6.1 Pembahasan Hasil Penelitian | 65 |
| 6.1.1 Interpretasi <i>Cytokeratin 7 (CK 7)</i> | 67 |
| 6.1.2 Interpretasi Vakuolisasi sel hepatosit | 68 |
| 6.2 Keterbatasan Penelitian | 69 |
| BAB 7 PENUTUP | 70 |
| 7.1 Kesimpulan | 70 |
| 7.2 Saran | 70 |
| DAFTAR PUSTAKA | 71 |
| LAMPIRAN | 74 |



DAFTAR TABEL

HALAMAN

| | |
|---|----|
| Tabel 5.1 Hasil ekspresi <i>Cytokerin 7</i> dari 5 Kelompok Perlakuan..... | 52 |
| Tabel 5.2 Hasil dari 5 Kelompok Perlakuan..... | 54 |
| Tabel 5.3 Hasil Luas Fibrosis dari 5 Kelompok Perlakuan | 56 |
| Tabel 5.4 Hasil Uji Normalitas CK7, Vakuolisasi Sel Hepaosit, dan Luas Fibrosis..... | 57 |
| Tabel 5.5 Hasil Uji Homogenitas CK7, Vakuolisasi Sel Hepatosit, dan Luas Fibrosis..... | 58 |
| Tabel 5.6 Hasil Uji <i>Kruskal Wallis</i> CK7, Vakuolisasi sel Hepatosit, dan Luas Fibrosis..... | 58 |
| Tabel 5.7 Hasil Uji <i>Kruskal Wallis</i> MO terhadap CK7 | 59 |
| Tabel 5.8 Hasil Uji <i>Kruskal Wallis</i> MO terhadap Vakuolisasi Sel Hepatosit..... | 59 |
| Tabel 5.9 Hasil Uji <i>Kruskal Wallis</i> MO terhadap Luas Fibrosis | 60 |
| Tabel 5.10 Hasil Uji Korelasi <i>Spearman</i> | 61 |



DAFTAR GAMBAR

HALAMAN

Gambar 2.1 Mekanisme seluler terjadinya fibrosis hati pada fase inflamasi 12

Gambar 2.2 Patofisiologi fibrosis hati 14

Gambar 2.3 Foto bagian dari *Moringa oleifera* 16

Gambar 2.4 Histologi Liver Primata (lapang pandang panorama, potongan transversal)..... 18

Gambar 2.5 Penjelasan skematik dari lobulus hepatica. 18

Gambar 2.6 Skema sel yang terlibat dalam regenerasi tergantung pada tipe *injury*. 19

Gambar 2.7 Diagram dari mikroanatomi organ hati manusia. 21

Gambar 2.8 Biopsi dari babon yang perlakuan alkohol selama 2 tahun..... 23

Gambar 2.9 Fotomikrograf dari hepatosit dengan gambaran vakuolisasi 25

Gambar 2.10 Metavir Meta-analisis Data Histologi pada Hepatitis karena virus..... 28

Gambar 5.1 Grafik rata-rata *cytokeratin 7* setiap kelompok Perlakuan 54

Gambar 5.2 Gambaran Histopatologi CK7 dengan pengecatan IHK pada tikus model fibrosis (x40) master OlyVia 55

Gambar 5.3 Grafik rata-rata jumlah setiap kelompok perlakuan..... 56

Gambar 5.4 Gambaran Histopatologi vakuolisasi se dengan pengecatan IHK pada tikus model fibrosis (x40) master OlyVia 57

Gambar 5.5 Grafik rata-rata Luas Fibrosis setiap kelompok perlakuan 58

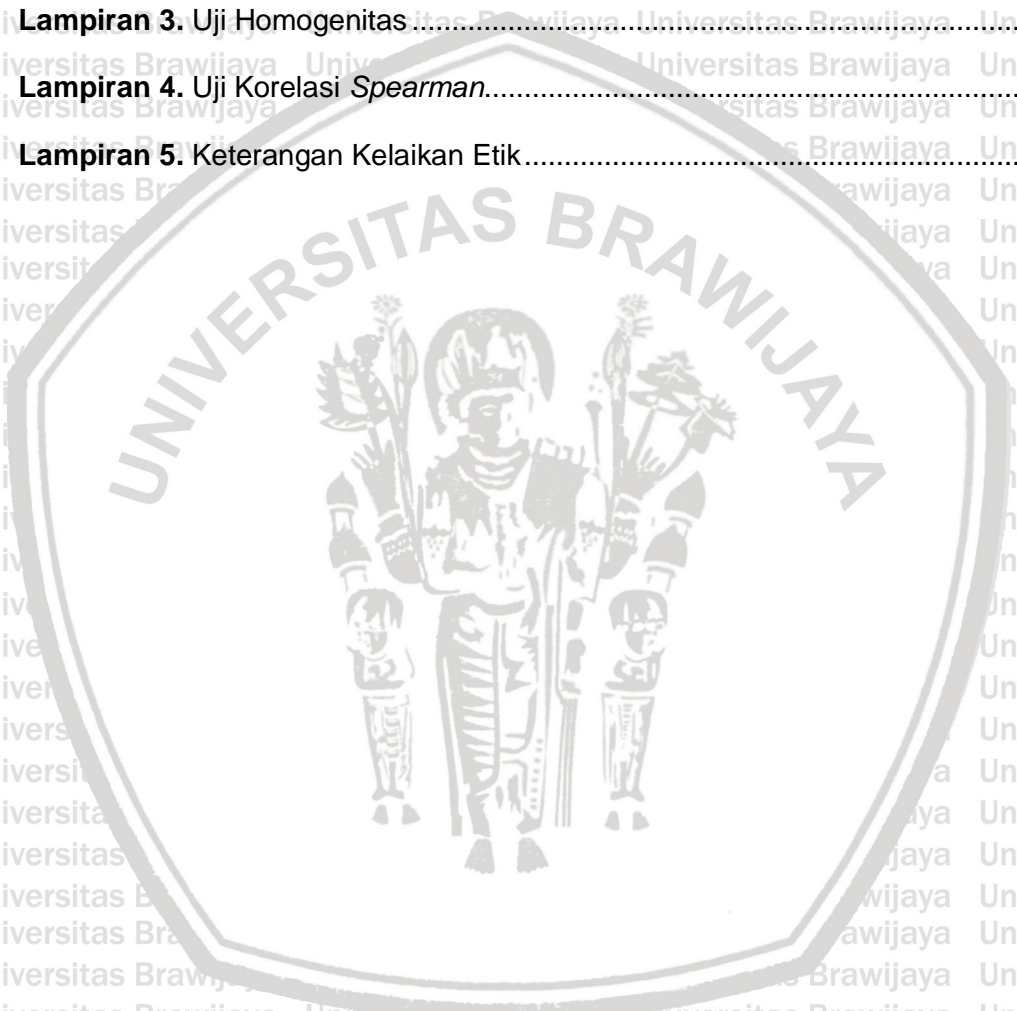
Gambar 5.6 Plot antara dosis dengan rata-rata CK, *Moringa oleifera*, dan Luas Fibrosis..... 63



DAFTAR LAMPIRAN

HALAMAN

| | |
|--|----|
| Lampiran 1. Pelaksanaan Penelitian | 74 |
| Lampiran 2. Uji Normalitas dan homogenitas | 76 |
| Lampiran 3. Uji Homogenitas | 78 |
| Lampiran 4. Uji Korelasi <i>Spearman</i> | 83 |
| Lampiran 5. Keterangan Kelaikan Etik..... | 84 |

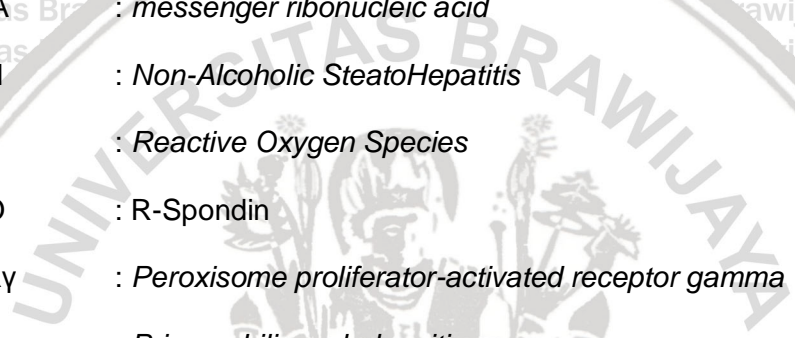


DAFTAR SINGKATAN

- CCl₄ : Karbon tetraklorida
- CD34 : *Cluster Definition 34*
- CD38 : *Cluster Definition 38*
- CK7 : *Cytokeratin 7*
- CK8 : *Cytokeratin 8*
- CK18 : *Cytokeratin 18*
- CK19 : *Cytokeratin 19*
- CK20 : *Cytokeratin 20*
- CLD : *Chronic Liver Disease*
- CYP450 : *Cytochrome P450*
- DAB : *3'3-diaminobenzidine*
- DAMPs : *Damage-associated molecular patterns*
- ECM : *Extra celluler matrix*
- EMT : *Epithelial–mesenchymal transition*
- DDR2 : *DNA damage response*
- HCV : *hepatitis C virus*
- HSC : *Hepatic stelate cell*
- IL-6 : *Interleukin-6*
- KPOS : *Kelompok Kontrol Positif*
- KNEG : *kelompok Kontrol Negatif*
- KP1 : *Kelompok Perlakuan 1*



- KP2 : Kelompok Perlakuan 2
- KP3 : Kelompok Perlakuan 3
- LGR4/5 : *Leucine-rich Repeat-containing G-protein-coupled receptor 4/5*
- LPC : *Lysophosphatidylcholines*
- MO : *Moringa oleifera*
- MMPs : *Matrix metalloproteinases*
- MPO : *Myeloperoxidase*
- MRNA : *messenger ribonucleic acid*
- NASH : *Non-Alcoholic SteatoHepatitis*
- ROS : *Reactive Oxygen Species*
- RSPO : *R-Spondin*
- PPAR γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*
- PBC : *Primary biliary cholangitis*
- PSC : *Primary sclerosing cholangitis*
- qHSC : *quiescent hepatic stellate cell*
- SPSS : *Statistical Product of Service Solution*
- SREBP-1c : *sterol regulatory element-binding protein-1c*
- TGF- β 1 : *Transforming growth factor beta 1*
- TGF- β 2 : *Transforming growth factor beta 2*
- TH2 : *T Helper 2*
- VEGF : *Vascular endothelial growth factor*
- WNT : *β -catenin signaling*



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN *Moringa oleifera*
TERHADAP EKSPRESI CYTOKERATIN 7 (CK7) DAN VAKUOLISASI
SEL HEPATOSIT PADA DERAJAT FIBROSIS HATI AKIBAT INJEKSI
KARBON TETRAKLORIDA (CCl₄)

Oleh :
Yunita Lestari Indrianto
NIM. 165070101111019
Telah diuji pada

Hari : Senin.

Tanggal : 9 Desember 2019

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

dr. Wening Prastowo, Sp.E
NIP. 197505082005011001

dr. Supriono, Sp.PD-KGEH
NIP. 196605171998031004

dr. Astri Proborini, Sp.A, M.Biomed.
NIP. 2016078104062001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter,

dr. Triwahju Astuti, M.Kes, Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001

ABSTRAK

Indrianto, Yunita Lestari. 2019. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun *Moringa oleifera* Terhadap Ekspresi Cytokeratin-7 (CK7) Dan Vakuolisasi Sel Hepatosit Pada Derajat Fibrosis Hati Akibat injeksi Karbon Tetraklorida (CCl4). Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Supriono, Sp.PD-KGEH (2) dr. Astri Proborini, Sp.A, M.Biomed.

Penyakit hati kronis menurut *Global Burden of Disease* mortalitas karena sirosis hati mencapai 1 juta kematian pada tahun 2010. Adapun kerusakan sel hepatosit masih bisa regenerasi dan melakukan reaksi duktular yang ditandai dengan adanya *cytokeratin 7* pada sitoplasma sel hepatosit. Reaksi duktular terjadi pada saat hati yang sudah mengalami kerusakan yang lebih parah dan hati tidak mampu untuk melakukan regenerasi hati. Pada hati yang mengalami fibrosis lebih parah, akan muncul adaptasi dari sel hepatosit dengan adanya vakuolisasi. Untuk mencegah progresivitas yang lebih parah bisa menggunakan *Moringa oleifera* (MO). MO dapat digunakan untuk menekan inflamasi dan menginduksi apoptosis dari sel yang rusak. Pada penelitian ini digunakan metode *randomized posttest only controlled group* yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *Moringa oleifera* (MO) terhadap *cytokeratin 7* (CK7) dan vakuolisasi sel. Penelitian menggunakan 5 kelompok tikus dengan pembacaan menggunakan master Olyvia versi 2.4 DT for scan. Hasil uji *Kruskal Wallis* diketahui pemberian MO mencegah progresivitas kerusakan. Pemberian MO menunjukkan nilai yang signifikan pada dosis 600 mg/kgBB ($p=0,000$) dibandingkan dengan kelompok tanpa pemberian MO. Vakuolisasi sel akan searah dengan luas fibrosis, pada pemberian MO, vakuolisasi bertambah rendah dengan dosis MO yang tinggi yaitu pada dosis 600 mg/KgBB ($p=0.00$).

Pada uji korelasi *Spearman* menunjukkan kekuatan korelasi sangat kuat, searah, dan signifikan antara dosis MO-CK7 ($p=0.00$; koefisien= 0.798) dan kekuatan korelasi cukup, tidak searah, dan tidak signifikan antara dosis MO-Vakuolisasi sel ($p=0.033$; koefisien= 0.864). Dapat disimpulkan bahwa pemberian MO berpengaruh terhadap penurunan kadar CK7.

Kata Kunci : *Moringa oleifera*, CK7, *ductular reaction*.

ABSTRACT

Indrianto, Yunita Lestari. 2019. Effect of *Moringa oleifera* Leaf Extract on Cytokeratin-7 (CK7) Expression and Hepatocyte Cell Vacuolation in Mouse model given Chronic Carbon Tetrachloride (CCl₄) Injection. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine Brawijaya University. Pembimbing: (1) dr. Supriono, Sp.PD-KGEH (2) dr. Astri Proborini, Sp.A, M.Biomed.

Based on Global Burden of disease, hepatic cirrhosis's mortality reaches 1 million death in 2010. Hepatocyte could regenerate in acute damage. In chronic damaged liver, it would undergo ductular reaction and vacuolation would appear. Liver damage could be caused by viral and toxin such as carbon tetrachloride (CCl₄). Research had shown that *Moringa oleifera* was effective to suppress inflammation reaction and to induce apoptose of the damaged hepatocyte. This study used randomized posttest only controlled group to understand the effect between *Moringa oleifera* (MO) extract on cytokeratin 7 (CK7) and cell vacuolation. In this study, 5 groups of mice were used and for interpretation used master Olyvia versi 2.4 DT for scan. Based on Kurskal Wallis test results, noted that MO administration prevented the progression of liver damage. The administration of MO showed a significant value at dose 600 mg/kgBW ($p=0.000$) compared to the group without MO administration. Cell vacuolization would align with the extent of fibrotic area. It would decrease eventually with MO administration at 600mg/kgBW dose ($p=0.000$).

Spearman correlation showed a very strong, unidirectional and significant strenght between the MO dose – CK7 ($p=0.000$; coefficient=0.798) and on MO – cell vacuolation showed sufficient, not direct, and not significant correlation ($p=0.033$; coefficient= 0.864). It can be concluded that the administration of MO affects the decrease of CK7 level.

Keywords : *Moringa oleifera*, CK7, ductular reaction.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit hati kronik dapat terjadi pada semua usia, jenis kelamin dan berujung pada kerusakan hati permanen yaitu sirosis hati. Berdasarkan *Global Burden of Disease*, didapatkan mortalitas sirosis hati adalah lebih dari 1 juta kematian pada tahun 2010 disebabkan oleh sirosis hati dan diperkirakan masih lebih banyak karena *liver cancer* dan *acute hepatitis* (Peter, 2014). Sedangkan, menurut lembaga statistik Inggris, penyakit hati menempati posisi ke 5 sebagai penyakit yang sering menyebabkan mortalitas di Inggris, dan nomor kedua di antara penyakit digestif di Amerika (Lim dan Kim, 2008). Sirosis hati sendiri tidak memiliki tanda dan gejala yang khas, seringnya bersifat asimtomatis. Pada kerusakan hepatosit pasti melalui tahap fibrosis hati dahulu di mana hati masih memiliki kemampuan untuk regenerasi. Fibrosis hati adalah mekanisme penyembuhan tubuh dinamis sebagai respon terhadap kerusakan *hepatocellular* yang merupakan masalah utama dalam kesehatan dengan derajat morbiditas dan mortalitas yang penting, ditandai dengan adanya peningkatan berlebih *Extracellular Matrix protein* (ECM) (Hamza, 2010). Penyebab utama dari fibrosis hati ini adalah *HCV infection*, konsumsi alkohol, dan *nonalcoholic steatohepatitis* (NASH) (Bateller dan Brenner, 2015).

Menurut Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam edisi kelima oleh DR. dr. Aru W Sudoyo, Sp. PD-KHOM, FACP (2003). Hati tersusun atas kurang lebih 60% sel hepatosit dan sisanya terdiri atas sel-sel epithelial dari sistem empedu dalam jumlah yang bermakna dan sel-sel non parenkimal yang termasuk di dalamnya sel

endothelium, sel Kupffer (sel yang berperan dalam sistem imunologi hati), dan sel

Stellata (disebut Sel ito, liposit atau perisit). Berbeda dengan organ lainnya, hati mampu beregenerasi setelah terjadi kerusakan ataupun setelah dilakukan hepatektomi hingga 2/3 bagian dari seluruh hati. Hepatosit dapat beregenerasi walaupun terbatas, pada saat hepatosit tidak mampu lagi beregenerasi maka sel pluripontensial oval yang berasal dari duktulus empedu akan berproliferasi sehingga terbentuk kembali sel hepatosit dan sel bilier (kolangiosit) yang juga memiliki kemampuan untuk beregenerasi (Sudoyo et al, 2009).

Centrilobular hepatocytes menghasilkan sitokrom P450s yang dapat memetabolis alkohol dan bermacam larutan yang bersifat hepatotoksin contohnya asetaminofen, karbon tetraklorida (CCl_4) dan tioasetamid sehingga menghasilkan *reactive free radicals* yang dapat merusak sel hepatosit. CCl_4 dapat menginduksi nekrosis dari sel hepatosit dan menyebabkan disorganisasi dari sinusoid di sekeliling *central vein*. Dalam respon ini, sel hepatosit yang rusak karena radikal bebas akan menghasilkan *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) untuk menginduksi inflamasi yang akan mengaktifkan regenerasi sel non-parenkim. Pada sel Kupffer yang teraktivasi akan menghasilkan interleukin-6 (IL-6) yang secara langsung menginduksi beberapa *hepatic expression* dari gen - gen yang berhubungan dengan fase protein akut. Pada kerusakan hati akut seperti yang sudah dikutip pada paragraph sebelumnya bahwa sel hepatosit mampu berproliferasi untuk mengembalikan sel yang rusak meskipun terbatas, sehingga stem cell tidak dibutuhkan. Namun pada kerusakan hati yang kronis, ditemukan bahwa *liver progenitor cell* (LPCs) atau disebut sel pluripotensial oval berkontribusi pada regenerasi liver. Kerusakan hati yang kronis selalu disertai dengan *ductular reaction* yang mengaktifasi LPC dewasa yang ada di *biliary tree* atau *the canals*

of Hering, struktur yang menghubungkan hepatosit dan *bile ducts*. LPC dapat berproliferasi menjadi sel hepatosit dan sel bilier (kolangeosit) (Tanaka dan Miyajima, 2016).

Untuk mencegah progresivitas dari kerusakan sel hepatosit yang permanen, peneliti menghubungkan dengan antioksidan yang ada pada *Moringa oleifera* (MO). MO berasal dari india dan tumbuh di daerah tropis dan subtropis di seluruh dunia termasuk Indonesia. MO sangat kompatibel dengan lingkungan yang sangat kering dan dengan semua bagian dari MO yang dapat bermanfaat baik secara nutrisi dan komersil. MO mengandung banyak komponen bioaktif. MO sangat berguna dalam mencegah penyakit kronis. MO memiliki efek hipolidemik, antioksidan, antiinflamasi dan imunodilator, hepatoprotektif, antihiperlipidemik, hipotensif, antikanker, dan efek pada penyakit yang melibatkan okuli. Beta karoten pada daun MO berperan signifikan sebagai antioksidan. Kombinasi antioksidan pada MO telah dibuktikan lebih efektif dibandingkan dengan antioksidan saja tanpa kombinasi (Vergara-Jimenez *et al*, 2017). Pada penelitian *cholangiocarcinoma* dengan tatalaksana MO menunjukkan bahwa adanya sifat antiproliferasi pada ekstrak daun serta biji MO, dan melalui mitokondria dapat menginduksi apoptosis sel (Leelawat, 2014).

Maka dari itu, dalam penelitian ini menggunakan marker *cytokeratin 7* (CK7) yang merupakan bagian dari protein filamen intermediet dan menghasilkan jaringan fibrous. CK7 merupakan marker yang aktif saat reaksi duktular yang terjadi akibat sel hepatosit tidak mampu regenerasi lagi. CK7 juga biasanya digunakan untuk marker *adenocarcinoma* bersama CK-20. Pada penelitian oleh Chaoling Ren pada babon yang diberi alkohol dapat ditemukan bahwa juga ada peningkatan pada kadar CK7. Sehingga CK7 dapat mengindikasikan adanya

progresivitas menuju fibrosis yang lebih parah pada sel hepatosit (Ren, 2003).

Selain itu kita bisa melihat progresivitas fibrosis menjadi lebih parah melalui vakuolisasi yang ada pada sitoplasma sel hepatosit. hepatosit berjalan sebanding dengan luas fibrosis, dan bertolak belakang dengan konsep CK7. Maka dari itu untuk mengetahui mencegah adanya progresivitas menjadi lebih parah, peneliti akan meneliti baik CK7 dan adanya pada sel hepatosit.

1.2 Rumusan Masalah

- Apakah hubungan pemberian *Moringa oleifera* dengan ekspresi *cytokeratin-7* (CK7) pada tikus model fibrosis hati akibat injeksi karbon tetraklorida (CCl₄)?
- Apakah hubungan pemberian *Moringa oleifera* dengan vakuolisasi sel hepatosit pada tikus model fibrosis hati akibat injeksi karbon tetraklorida (CCl₄)

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* terhadap peningkatan ekspresi CK7 dan penurunan hepatosit tikus model yang diberikan injeksi kronis CCl₄.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengukur ekspresi CK7 serum pada tikus model injeksi kronis CCl₄ yang diberikan ekstrak daun *Moringa oleifera*.
2. Mengukur ekspresi vakuolisasi sel hepatosit pada tikus model injeksi kronis CCl₄ yang diberikan ekstrak daun *Moringa oleifera*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

- Menambah wawasan mengenai biomarker *cytokeratin-7* (CK7) sebagai marker *liver progenitor cell*.

- Menambah wawasan mengenai adanya ekspresi *cytokeratin-7* (CK7) pada tikus model fibrosis hati akibat injeksi karbon tetraklorida (CCl₄).

- Mengetahui hubungan *cytokeratin 7* (CK7) dan hubungannya dengan vakuolisasi sel hepatosit.

1.4.2 Manfaat Praktis

Menjadi referensi untuk penelitian mengenai *Moringa oleifera* sebagai bahan pengobatan yang murah dan mudah didapatkan. Penelitian ini juga dapat digunakan sebagai rujukan dalam penelitian *cytokeratin 7* (CK7) selanjutnya.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.3 Fibrosis Hati

2.1.1 Definisi Fibrosis Hati

Fibrosis hati adalah hasil penyembuhan dengan pembentukan jaringan ikat yang berlebihan pada hati. Hal ini bisa disebabkan oleh produksi ekstraselular matriks secara berlebihan, atau proses degradasinya yang kurang baik, atau karena keduanya. Fibrosis hati disebabkan karena adanya cedera kronis, terutama jika terdapat komponen inflamasi. Fibrosis sendiri tidak memiliki gejala yang terlihat tapi dapat menyebabkan portal hipertensi (jaringan parut yang menyebabkan gangguan aliran darah di hati) atau sirosis (jaringan parut yang terbentuk akibat gangguan struktur normal hati dan gangguan fungsi hati yang kronis) (Chivan, 2018).

2.1.2 Etiologi Fibrosis Hati

Penyebab dari kerusakan hati kronis yang menyebabkan fibrosis adalah beragam sedangkan kerusakan hati akut ataupun yang parah tidak mengakibatkan kerusakan struktur normal hati, sehingga tidak menyebabkan fibrosis meskipun mengakibatkan kerusakan banyak sel hepatosit. Pada tahap awal, fibrosis hati bisa mengalami regresi sehingga bisa reversibel (misalkan karena virus). Setelah hitungan bulan dan tahun akibat kronis atau kerusakan yang berulang, fibrosis menjadi permanen. Fibrosis dapat berkembang lebih cepat akibat terjadinya obstruksi duktus biliaris.

Penyebab fibrosis menurut *Hepatic Fibrosis MSD Manual Professional*

Version (2018), dapat diklasifikasikan berdasarkan mekanisme kerusakannya baik karena obat atau kelainan lainnya, antara lain:

2.1.2.1 Gangguan Dengan Efek Langsung Pada Hati

a. Hepatitis autoimun, penyakit kronis akibat sistem imun tubuh yang menyerang sel-hepatosit dan menyebabkan peradangan. Peradangan yang berlangsung berulang kali, dapat menyebabkan *scarring* yang bersifat *irreversible*.

b. Gangguan penyimpanan dan kelainan metabolisme bawaan

1. Defisiensi Alpha-1 antitripsin, tubuh tidak memproduksi protein alpha-1 antitripsin yang berfungsi untuk melindungi hati. Penyakit ini dapat menyebabkan peradangan dan *scarring* yang parah dan berulang sehingga juga dapat menyebabkan keganasan.

2. Gangguan penyimpanan zat tembaga (contoh: *Wilson disease*)

3. Fruktosemia (*autosomal recessive deficiency* aldolase B sehingga tidak bisa secara sempurna memetabolisme fruktosa dan dapat menyebabkan hepatomegali)

4. Galaktosemia, ketidak mampuan tubuh untuk memetabolisme galaktosa.

5. Gangguan penyimpanan glikogen (terutama tipe III, IV, VI, IX, dan X), akumulasi glikogen di hati menyebabkan penumpukan yang mengakibatkan hepatomegali)

6. Sindrom kelebihan zat besi (hemokromatosis) sering dihubungkan dengan infeksi Hepatitis C dan Alcoholic liver disease, sindrom yang muncul salah satunya adalah kelainan enzim hati dan hepatomegali.

7. Gangguan lemak (contoh: *Gaucher disease*), pada penyakit gaucher menyebabkan penumpukan lemak di organ hati, paru-paru, otak, dan limpa.

8. Peroxisomal disorders (contoh: Sindrom Zellweger), sindrom ini menyebabkan degenerasi dari otak, hati, atau ginjal dan biasanya diikuti kematian 6 bulan setelah onset.

9. Tirosinemia (tubuh tidak mampu untuk memecah asam amino tirosin dan menyebabkan gangguan ginjal, hati dan susunan saraf pusat.

c. Fibrosis hati kongenital, biasanya bersifat fibrokistik yang disertai dengan proliferasi duktus interlobular yang dapat menyebabkan hipertensi portal, fibrosis ini tidak mengubah susunan mikroskopik dari hepatosit.

d. Infeksi

1. Bakteri (contoh: brucellosis), infeksi yang diakibatkan oleh genus *brucella* yang dapat menyerang sistem reproduksi, hati, jantung, dan susunan saraf pusat.

2. Parasit (contoh: echinococcosis), disebabkan oleh *Echinococcus granulosus* yang dapat mengakibatkan munculnya kista di organ yang diserang.

3. Virus (contoh: Hepatitis kronis B dan C), infeksi virus dapat menyebabkan peradangan pada hati yang dapat menyebabkan fibrosis dan sirosis hati.

e. Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH), keadaan setelah NAFLD (Non-alcoholic fatty liver disease) keadaan dimana terdapat perlemakan yang mengakibatkan inflamasi dan kerusakan pada hati.

f. Kolangitis bilier primer / *Primary biliary cholangitis* (PBC), disebabkan oleh autoimun yang dapat menyebabkan kerusakan progresif pada ductus dan menyebabkan penumpukan toksin di hati, toksin tersebut akan mengakibatkan kerusakan pada sel hepatosit.

g. Kolangitis sklerosis primer / *Primary sclerosing cholangitis* (PSC), keadaan kronis yang menyerang hati dan kandung empedu ditandai dengan adanya inflamasi dan skaring pada ductus. Inflamasi berulang akan menyebabkan penebalan dan pembentukan abnormal dari jaringan ikat pada ductus biliaris.

2.1.2.2 Gangguan Dengan Efek Pada Aliran Darah Hati

a. *Budd-Chiari syndrome*, merupakan penyakit kongestif hepatopati yang disebabkan oleh oklusi dari vena hepatikum yang berfungsi sebagai drainase hati, dengan trias nyeri perut, asites, dan pembesaran hati. Sehingga dengan adanya kerusakan akibat hipoksia jaringan dapat menyebabkan fibrosis daerah *centrilobular*.

b. Gagal Jantung, pada gagal jantung yang parah dapat menyebabkan darah kembali dari jantung ke vena cava inferior sehingga menyebabkan peningkatan tekanan dan pembesaran hati. Gagal jantung menyebabkan penimbunan cairan pada hati. Penumpukan cairan di hati dapat menyebabkan munculnya *scarring*, sehingga mengganggu fungsi hati.

c. *Hepatic veno-occlusive disease*, diakibatkan oleh adanya kerusakan pada kapiler sinusoid yang mengakibatkan adanya obstruksi pada vena hepatikum. Darah cenderung akan kembali lagi ke jantung, menyebabkan hati tidak mendapatkan oksigen dan membawa ke kondisi hipoksia.

d. *Portal vein thrombosis*, kerusakan hepatosit dengan adanya blokade dan penyempitan dari vena portal karena penyumbatan darah. Umumnya gejala yang muncul adalah asaites, pembesaran limpa, dan varises esofagus.

2.1.2.3 Obat dan Zat

a. Alkohol, dapat menyebabkan destruksi dari hepatosit yang menyebabkan skaring pada hati yang berujung pada sirosis, hepatitis karena alkohol, dan mutasi sel yang bisa menyebabkan pada keganasan.

b. Amiodarone, bersifat agen lipofilik yang mempunyai kecenderungan untuk mengakumulasi lipid, dan menyebabkan kerusakan hati dengan salah satunya melalui mekanisme fosfolipidosis.

c. Chlorpromazine, bersifat dapat dimetabolisme secara masif oleh hati melalui sulfosidasi dan oksidasi, dan adanya peningkatan serum aminotransferase. Hal ini semua dapat menyebabkan produksi zat toksin yang mempengaruhi metabolisme.

d. Methotrexate, tidak umum dalam menyebabkan kerusakan hati biasanya dapat menyebabkan gejala akut atau kronis, diawali dengan peningkatan nilai *liver function test*.

e. Methyldopa, dapat menyebabkan kolestasis dan *prolong jaundice*, bersifat hepatotoksik.

f. Oxyphenisatin, mekanisme kerusakan hati mirip dengan hepatitis akut karena virus, meskipun kolestasis dan steatosis cenderung lebih terlihat pada jaundice karena oxyphenisatin.

g. Tolbutamide, menyebabkan gangguan pada metabolisme karbohidrat di hati.

2.1.2.4 Obstruksi Mekanis

- a. skar karena operasi hati
- b. Penyempitan duktus biliaris karena batu empedu

2.1.3 Patogenesis Fibrosis Hati

Fibrosis hati merupakan respon penyembuhan luka akibat kerusakan (*injury*) yang berulang. Setelah kerusakan yang akut, sel parenkimal akan beregenerasi dan mengganti sel yang sudah nekrosis atau sel apoptosis. Proses ini berhubungan dengan respon inflamasi, sehingga jika kerusakan hati tetap persisten terjadi maka regenerasi akan tidak berhenti dan hepatosit akan disubstitusi dengan matriks ekstraseluler yang banyak, termasuk kolagen fibrin. Jaringan fibrosa didistribusikan berdasarkan lokasi kerusakan hati, pada kerusakan hati kronis karena virus (hepatitis dan kolestasis kronis), jaringan fibrosa biasanya terletak disekitar portal (Batteler dan Brenner, 2005).

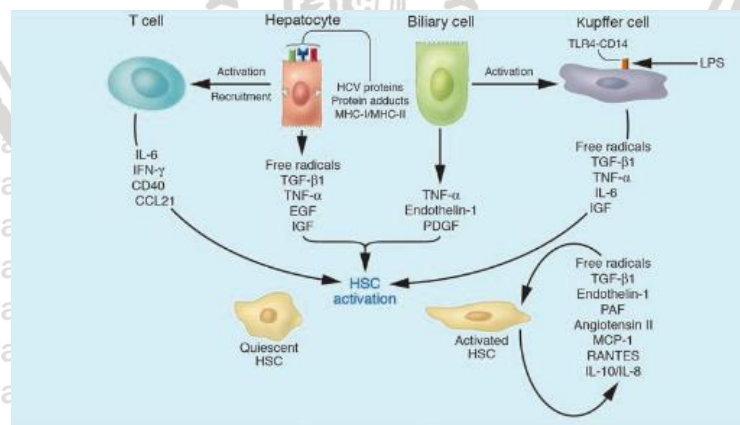
Pada kerusakan hati disebabkan oleh alkohol, jaringan fibrosa akan muncul di daerah perisentral dan perisinusoidal area. Pada fibrosis hati tahap lanjut, matriks ekstraseluler menjadi 6 kali lebih banyak dari normal, termasuk kolagen (I, II, dan IV), fibronektin, undulin, elastin, laminin, hyaluronan, dan proteoglikan. Akumulasi dari matriks ekstraseluler merupakan akibat dari peningkatan sintesis dan penurunan degradasi dari matriks ekstraseluler.

Penurunan kemampuan degradasi matriks ekstraseluler oleh *Matrix Metalloproteinase* (MMPs) disebabkan karena ekspresi berlebihan dari inhibitor spesifik yaitu *Tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMPs) (Batteler dan Brenner, 2005).

Matriks ekstraseluler diproduksi oleh *Hepatis stellate cell* (HSCs) pada hati yang mengalami kerusakan. Pada sel yang normal, HSCs terdapat di celah Disse

dan merupakan tempat penyimpanan Vitamin A yang utama, HSCs akan teraktivasi dan transdiferensiasi menjadi *myofibroblast-like cells*, yang dilengkapi dengan kemampuan kontraktile, proinflamasi, dan fibrogenik. HSCs yang sudah teraktivasi akan bermigrasi dan terakumulasi pada jaringan yang rusak, kemudian akan mensekresi sekaligus meregulasi matriks ekstraseluler dalam jumlah yang besar. *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF), yang diproduksi terutama oleh sel Kupffer, merupakan pemicu utama mitosis untuk mengaktifasi HSCs (Batteler dan Brenner, 2005).

Sintesis kolagen di HSCs diregulasi pada tingkat transkripsi dan postranskripsi. Peningkatan kolagen mRNA memediasi peningkatan sintesis kolagen pada HSCs yang teraktivasi. Postranskripsi yang meregulasi kolagen diatur berdasarkan sekuens 3' yang belum diterjemahkan melalui RNA-binding protein α CP2 bersamaan dengan struktur stem-loop pada akhir 5' dari kolagen mRNA tersebut. HSCs sendiri mengekspresikan beberapa marker neuroendokrin (contoh: relin, nestin, neurotrofin, sinaptofisin, dan protein asam glial-fibril) dan mempunyai reseptor untuk neurotransmitter (Batteler dan Brenner, 2005).



Gambar 2.1 Mekanisme seluler terjadinya fibrosis hati pada fase inflamasi. (Bateller and Brenner, 2015)
 Hepatosit dan sel empedu yang rusak akan mengaktifasi sel T, dan juga memproduksi sitokin inflamasi yang merangsang sel Kupffer dan aktivasi HSCs.



Quiescent HSCs mengekspresikan marker yang bersifat adiposit (PPARY, SREBP-1c, dan leptin), sementara HSCs yang teraktivasi akan mengekspresikan marker myogenic (aktin otot polos, c-myb, dan *myocyte enhancer factor-2*). Hepatosit selain HSCs juga memiliki kemampuan fibrogenik. Miofibroblas dari pembuluh darah portal kecil akan berproliferasi di sekitar duktus biliaris pada fibrosis yang diinduksi oleh kolestasis untuk menginisiasi deposisi dari kolagen (Batteler dan Brenner, 2005).

Perbedaan antara HSCs dan miofibroblas portal adalah pada ekspresi marker yang berbeda sebagai respon atas apoptosis sel. Setelah dilakukan kultur dari CD34 + CD38 stem sel hematopoietik, ditemukan bahwa sel yang berasal dari sumsum tulang memiliki kemampuan untuk memproduksi HSCs dan miofibroblas yang bisa menginfiltrasi hati manusia yang mengalami kerusakan sehingga bisa diremodel. Dari kultur tersebut maka dapat disimpulkan bahwa sel yang berasal dari sumsum tulang belakang bisa menjadi sumber sel fibrosa untuk hati yang mengalami kerusakan (Batteler dan Brenner, 2005).

Sel yang digunakan untuk fibrogenesis bergantung pada di mana letak kerusakan dari hati, HSCs adalah penghasil jaringan fibrosa pertama di daerah perisentral, sedangkan miofibroblas portal lebih mendominasi pada kerusakan yang dekat pada jalur portal. Hepatosit merupakan target untuk agen yang bersifat hepatotoksik, termasuk virus hepatitis, metabolisme alkohol, dan asam empedu (*bile acids*). Hepatosit yang rusak akan mengeluarkan *reactive oxygen species* (ROS) dan mediator fibrogenik yang mendorong pembentukan sel darah putih untuk inflamasi.

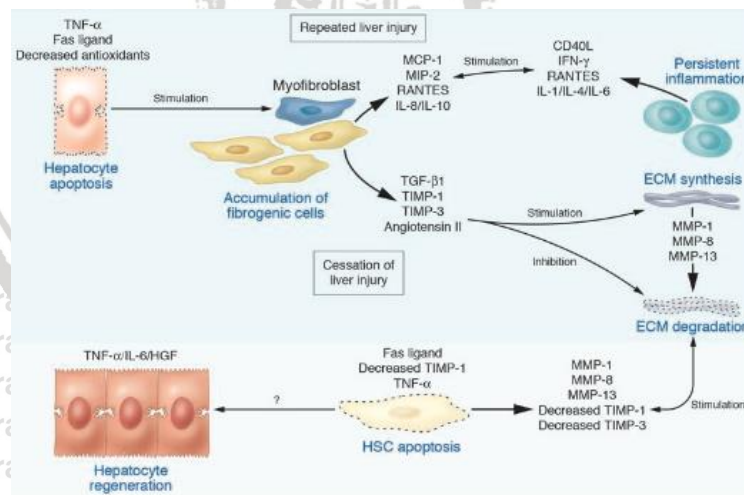
Sel inflamasi, baik limfosit dan sel polimorfonuklear, akan mengaktivasi HSCs untuk mensekresi kolagen. HSCs yang teraktivasi akan mengeluarkan

kemakin inflamasi untuk mengekspresikan adesi antar molekul dan memodulasi aktivasi limfosit, sehingga pada proses inflamasi memungkinkan untuk terjadi saling aktifasi satu sama lain. Fibrosis distimulai oleh *T helper* yang berbeda, Th2 mengasosiasi lebih ke fibrogenesis. Sel Kupffer berperan penting dalam proses inflamasi dengan melepaskan ROS dan sitokin (Batteler dan Brenner, 2005).

Dalam gangguan kolestasis kronis, sel epitel akan menstimulasi akumulasi miofibroblas portal untuk menginisiasi deposisi kolagen di sekitar duktus biliaris.

Akhirnya, perubahan komposisi dari matriks ekstraseluler bisa menstimulasi langsung fibrogenesis. Kolagen tipe IV, fibrinogen, dan aktivator plasminogen urokinase menstimulasi HCSs dengan mengaktivasi sitokin laten seperti TGF- β .

Kolagen fibril bisa berikatan dan menstimulasi HSCs lewat *discoidin* reseptor domain DDR2 dan integrin. Terlebih lagi, matriks ekstraseluler yang mengalami perubahan akan menjadi tempat akumulasi dari *growth factors* and MMPs (Batteler dan Brenner, 2005).



Gambar 2.2 Patofisiologi fibrosis hati. (Bateller and Brenner, 2015)

Fibrosis hati akan bersifat *irreversible* jika penyebab etiologinya tidak dihilangkan. Kolagen akan terdegradasi dengan peningkatan aktivitas MMPs didorong dengan penurunan TIMPs.

2.2 *Moringa oleifera*

Moringa oleifera adalah sejenis tanaman topis yang digunakan biasanya untuk makanan, pengobatan, dan produksi minyak. Secara medis *Moringa* memiliki banyak manfaat farmako termasuk antitumor, antihiperqlikemi, antiinflamasi (Anwer et al., 2007). Ekstak *Moringa oleifera* juga telah dibuktikan mempunyai antioksidan yang poten secara in vivo dan ekstrak biji dari *Moringa oleifera* memiliki fungsi hepatoprotektif terhadap kerusakan ginjal karena natrium diklofenak (Hamza, 2007). Sifat hepatoprotektif dapat ditemukan pada isolasi hepatosit yang rusak akibat CCL₄ yaitu dengan mengurangi skor nekroinflamasi hati. Pada penelitian menurut Tsukada (2006) dalam *Mechanism of Fibrosis* didapatkan bahwa *Moringa oleifera* mampu menurunkan aktivitas MPO (Myeloperoxidase), menurunkan lebel globulin, dan menurunkan sel inflamasi secara histopatologi. *Moringa oleifera* juga bekerja sebagai antifibrosis dengan mengurasi HSC yang dapat menginduksi sintesis kolagen pada saat inflamasi berangsur lama (Torok, 2008). *Moringa oleifera* juga memiliki fungsi untuk menekan jumlah vakuolisasi dari hepatosit yang rusak (Halaby, 2015).

Pada isolasi komponen dari *Moringa* ditemukan adanya Daun dari MO adalah mengandung vitamin, kerotenoid, polifenol, asam fenolik, flavonoid, alkaloid, glukosinolat, isothiocyanate, tanin dan saponin (Vergara-Jimenez et al, 2017). Vitamin A diproduksi secara besar di daun MO. Vitamin A memiliki efek yang bagus pada penglihatan, reproduksi, pertumbuhan dan perkembangan embrio. Ekstak daun MO memiliki sumber karoten yang baik dengan pro-vitamin A. Polifenol juga terkandung dalam ekstrak daun MO yaitu seperti flavonoid dan *phenolic acids*. Flavonoid dihasilkan sebagai respon akan infeksi mikroba. Intake flavonoid juga dapat melindungi sel dari stress oksidatif, termasuk penyakit

kardiovaskular dan kanker. Tanin pada MO juga berfungsi sebagai antikanker, antiaterosklerosis, anti-inflamasi, dan anti-hepatotoxic agen (Vergara-Jimenez *et al*, 2017). MO juga memiliki kemampuan untuk mencegah progresivitas menjadi kronis. MO memiliki fungsi hipolipidemik, di mana komponen bioaktif pada MO yaitu flavonoid dan komponen fenolik, mempengaruhi hemostasis lemak dengan mengurangi penyerapan konsentrasi kolestrol plasma. Komponen fenolik merupakan antioksidan utama yang dapat menginaktivasi *lipid free radical*, atau mencegah dekomposisi hidrosiperoksida menjadi radikal bebas. Sifat hepatoprotektif diperoleh karena kemampuan MO untuk mereduksi inflamasi dan ekspresi dari gen yang mempengaruhi lipid intake (Vergara-Jimenez *et al*, 2017).



Gambar 2.3. Foto bagian dari *Moringa oleifera*. (Saini *et al*, 2016)
i) pohon ii) daun iii) bunga iv) buah.

2.3 Histologi Hati

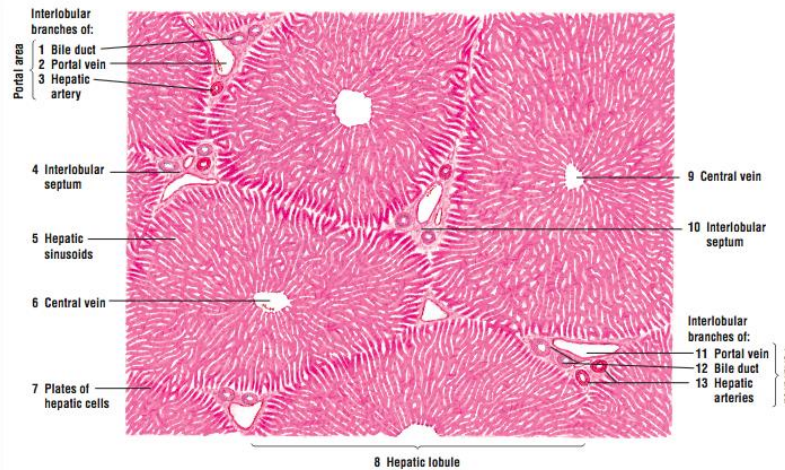
Hati terdiri atas 60% sel hepatosit dan sisanya merupakan sel epitel empedu dan sel parenkimal termasuk sel endotel, sel Kupffer, dan sel stelata (Sudoyo, 2009). Unit fungsional dari hati terdiri atas lobulus hati, yang terdapat vena sentralis atau trias portal poligonal yang terdiri atas vena porta, arteri hepatis, dan duktus biliaris. Vena sentralis dapat berhubungan dengan portal triad melalui sinusoid yang berjalan diantara lembaran hepatosit (Tanaka dan Miyajima, 2016). Sinusoid memisahkan antar hepatosit dibatasi oleh sel *Kupffer* yaitu sel fagosit, yang bertugas untuk menghancurkan bakteri sehingga hati mempunyai peran sebagai salah satu organ pertahanan tubuh terdapat bakteri

dan zat toksik dalam tubuh. (Sudoyo, 2009). *Canal of hering* terletak di antara hepatosit dan sel kelangiosit di mana terdapat sel *Cytokeratin-7* (CK7) dan *Cytokeratin-19* (CK19) yang merupakan sel *marker* progenitor (Saxena *et al.*, 2004).

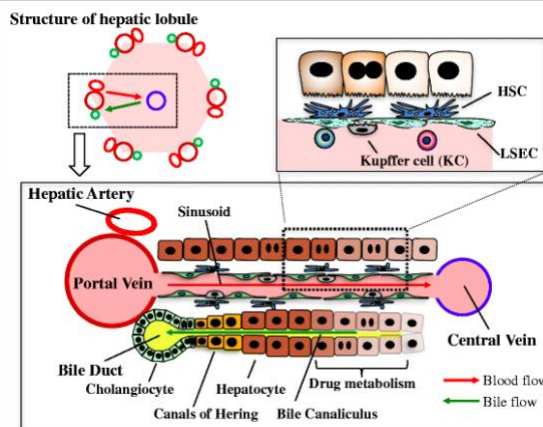
Meskipun sel hepatosit secara morfologi terlihat sama, namun memiliki fungsi yang berbeda-beda tergantung dengan lokasi tiap sel hepatosit di masing-masing unit fungsionalnya (Tanaka dan Miyajima, 2016). Hepatosit periportal berfungsi khusus dalam oksidasi hati misalkan dalam proses glukoneogenesis, β -oksidasi Asam lemak, sintesis kolesterol, sedangkan hepatosit perisentral lebih penting untuk glikolisis, lipogenesis, dan detoksifikasi berbasis sitokrom P450.

Zona metabolik tersusun atas dari jalur *Wnt/ β -catenin signaling* (regulasi stem sel pluripotent dan perkembangannya) (Sekine *et al.*, 2006). Penelitian terbaru membuktikan bahwa reseptor LGR4/5 dan ligan RSPO (R-Spondin) meningkatkan *Wnt/ β -catenin signaling* dan menkontrol zona metabolik hati (Planaz-pas *et al.*, 2016). Hepatosit sentrilobular mengekspresikan sitokrom P450s (Cyps), yang memetabolis alkohol dan bermacam-macam zat kimia yang bersifat hepatotoksin seperti asetaminofen, karbon tetraklorida (CCl_4), dan thioasetamid, untuk mengurangi zat oksigen reaktif yang dapat merusak sel hepatosit. Pada dosis tunggal CCl_4 dapat menginduksi oksigen reaktif bebas yang dapat merusak hepatosit dan mengganti struktur sinusoid yang terdapat di sekitar vena sentralis.

Proliferasi dari hepatosit dimulai dalam waktu 24 jam, dan puncaknya pada waktu 48 jam, dan terminasi pada waktu 72 jam di tikus (*mice*) (Bateller dan Brenner, 2005).



Gambar 2.4 Histologi Liver Primata (lapang pandang panorama, potongan transversal).
 (diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations, 2012)
 Pengecatan: Hematoksilin dan eosin. Perbesaran kecil.



Gambar 2.5 Penjelasan skematik dari lobulus hepatica. (Tanaka dan Miyajima, 2016)

Aliran darah mengalir ke hati melalui vena portal dan dari arteri hepatica menuju vena sentralis. Melalui sinusoidal endotelial cells (LSECs). Empedu dihasilkan oleh sel hepatosit dan disimpan dalam duktus biliaris melalui duktus kanalikuli empedu yang dikelilingi oleh membran hepatosit apikal. Sel *Kupffer* yaitu sel makrofag di hati, terletak di sisi luminal dari hepatosit, sedangkan *Hepatic Stellate Cell* (HSCs) terletak di sisi proksimal dekat LSECs. *Canal of Hering* adalah penghubung antara sel hepatosit dan duktus biliaris.

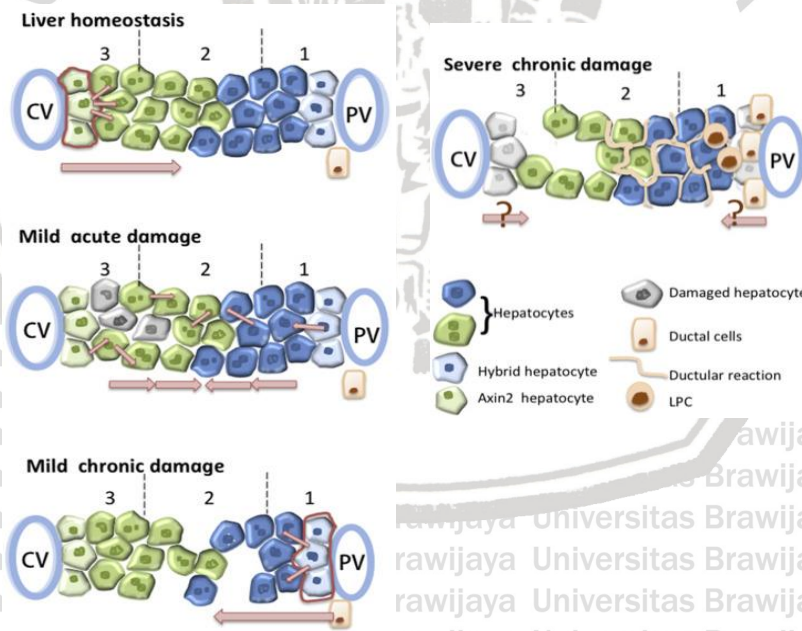
2.4 Regenerasi Hati

Berbeda dengan organ lainnya, hati memiliki kemampuan untuk beregenerasi. Regenerasi dimulai ketika hepatosit yang dapat melakukan regenerasi sudah tidak mampu untuk memperbaiki lagi. Maka, sel-sel pluripotensial oval yang berasal dari duktus biliaris akan berproliferasi untuk menjadi sel-sel hepatosit dan sel-sel bilier (kolangiosit). Dari penelitian model binatang dapat

ditemukan bahwa satu sel hepatosit saja dapat melakukan pembelahan hingga 34 kali (Sudoyo, 2009).

Setelah kerusakan sel hepatosit yang akut terjadi, hepatosit yang tidak rusak akan masuk ke siklus sel. Pada saat kerusakan kronis telah terjadi, *hybrid hepatocytes* (sel yang terletak di dekat trias porta yang berpotensi untuk meretorasi sel hepatosit yang rusak setelah kerusakan hati kronis) yang terletak di antara vena portal yang biasanya berusaha mengganti sel yang rusak. Kerusakan sel hepatosit yang kronis akan memicu reaksi duktular dan sel progenitor (LPCs). Masih belum diketahui secara pasti apakah sel ini berperan aktif dalam regenerasi.

Zona 1 menggambarkan daerah periportal, zona 2 menggambarkan regio intermediate. Zona 3 berhubungan dengan regio *centrilobular* (Gilgenkrantz dan l'Hortety, 2018).



Gambar 2.6 Skema sel yang terlibat dalam regenerasi, tergantung tipe *injury*. (Gilgenkrantz dan l'Hortety, 2018)

Pada homeostasis tikus, axin2-positif hepatocytes (hijau) terletak di antara vena sentralis dan mempunyai kemampuan proliferasi lebih tinggi daripada hepatosit yang terletak pada mediolobular (hijau dan biru) atau didaerah periportal.

2.5 Ductular Reaction

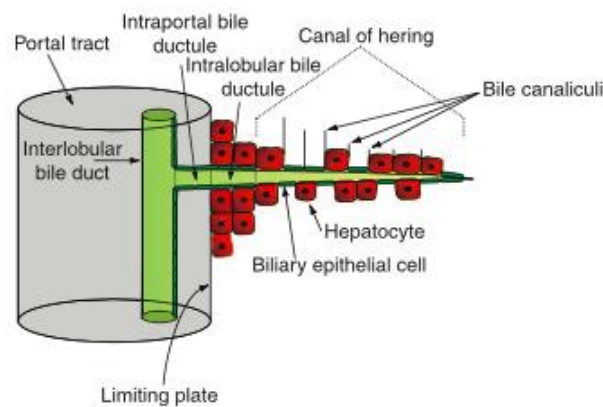
2.5.1 Mikroanatomomi normal duktus biliaris

Duktus biliaris terdiri atas struktur ductular yang banyak dan kecil, dan lumina yang terdapat pada ujung portal di antara reaksi akut dan kronis penyakit hati termasuk kerusakan kronis dari duktus biliaris. Reaksi duktular merupakan reaksi yang kompleks antara hepatosit, hepatic progenitor cell, hepatic stellate cells, dan ekstraseluler matriks serta sel inflamasi dan sel endotel. Reaksi duktular dipicu oleh adanya perubahan suplai darah dan perubahan aliran bilier. Interaksi ini dimodulasi oleh banyak faktor yang bersifat soluble contohnya *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor receptor-beta* (TGF- β), VEGF, dan berbagai macam interleukin yang menginervasi langsung sel stelata dan proses transisi epitel-mesenkimal. Reaksi duktular dibentuk oleh *pre-existing bile ductules* (reaksi duktular tipikal, lumen dapat dibedakan dengan jelas) terlihat pada obstruksi ekstrabiliaris, metaplasia hepatosit periportal (reaksi duktular atipikal, lumen tidak terlihat dengan jelas) terlihat pada penyakit biliaris kronis yang berhubungan dengan hilangnya saluran empedu dan progenitor hepatosit. Progenitor hepatosit merupakan penyebab utama dari reaksi duktular dibuktikan adanya fenotip intermediet hepatobilier pada reaksi duktular yang mampu berdeferensiasi menjadi duktus biliaris dan hepatosit (Bateman dan Hubscher, 2010).

2.5.2 Respon Ductular Reaction

Ductular reaction (DR) mempunyai hubungan yang erat dengan fibrosis termasuk alkohol dan non-alkohol perlemakan lemak, ataupun infeksi karena virus. Liver fibrosis berjalan searah dengan DR karena hubungan histologi yang dekat antara HSC dan sel biliaris (Sato, 2019). Dengan terjadinya reaksi duktular maka

juga menandakan terjadinya inflamasi, yang terdiri atas banyak kolagiosis, fibrosis periportal, dan neovaskularisasi. Patogenesis fibrosis periportal terjadi berhubungan dengan reaksi duktular, yaitu produksi langsung dari matriks ekstraseluler (laminin dan kolagen) oleh epitel biliaris, stimulasi fibrogenesis oleh produksi faktor yang menstimulasi fibroblast dan miofibroblas (contoh: TGF- β 1, TGF- β 2, inhibitor metaloproteinase dan PDGF), dan fenomena transisi epitelial-mesenkimal (*epithelial-mesenchymal transition* (EMT)) di mana sel epitel akan mengalami transisi menjadi fibroblast yang membantu dalam proses fibrosis. Duktus biliaris yang mengalami destruksi dan berhubungan dengan reaksi duktular pada penyakit biliaris kronis akan mengekspresikan marker dari TGF- β , EMT/mesenkimal yaitu S100A4, vimentin dan matrix metalloproteinase-2 dan marker bilier CK7, CK19 dan e-caderin. Maka dari itu bisa disimpulkan kerusakan duktus biliaris bisa mengakibatkan proliferasi miofibrobas melalui EMT, dimediasi oleh TGF- β (Bateman dan Hubscher, 2010).



Gambar 2.7 Diagram dari mikroanatomi organ hati manusia. (Bateman & Stefan G Hubscher, 2010):
Gambaran letak *canal of Hering*

2.6 Cytokeratin 7 (CK7)

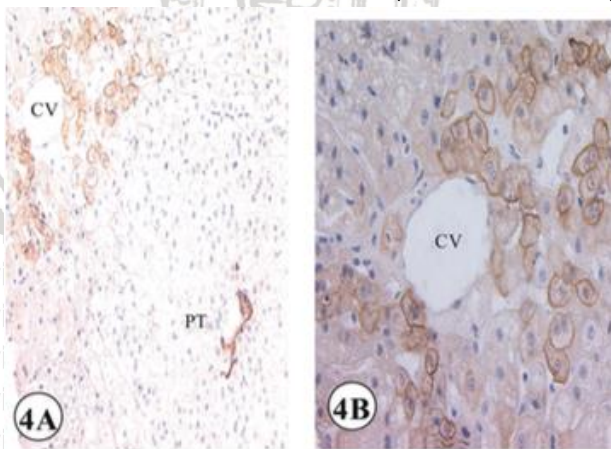
Cytokeratin 7 merupakan marker epitel dan biasanya ditemukan pada neoplasma, dan tidak spesifik sebagai tumor marker. Namun, CK7 dapat digunakan untuk membedakan mekanisme dari diferensiasi epitel dan dapat digunakan untuk mengklasifikasi subtipe dari epitel. CK7 dapat membantu dalam menentukan diagnosis dan asal dari karsinoma (Pernick, 2016).

Cytokeratin-7 merupakan komponen dari sel pluripotent oval yang terdapat di duktus biliaris pada empedu. Pengecekan menggunakan imunohistokimia digunakan untuk membantu mengidentifikasi komponen dari system biliaris intrahepatik pada hepatosit normal. Marker seperti poliklonal karsinoembrionik antigen dan CD10 juga sering digunakan untuk menandai adanya diferensiasi kanalikular pada neoplasma hepatoseluler. CK7 dan CK19 diekspresikan oleh duktus interlobular, intraportal, duktus intralobular, dan sel epitel bilier yang merupakan bagian dari kanal heping. Hal ini mungkin terjadi karena CK7 dan CK19 merupakan sel yang terdapat pada kanal Hering yang mewakili sel progenitor hati. Sel biliaris juga mengekspresikan CK8 dan CK18. Hepatosit normal akan mengekspresikan CK8 dan CK18, bukan CK7 atau CK19 (Bateman dan Hubscher, 2010).

Konsep bahwa sel progenitor memiliki kemampuan maturasi untuk menjadi sel epitel biliaris dan hepatosit, didukung dari penelitian *in vivo* penyakit hati manusia, contohnya imunohistokimia CK 7 pada hepatitis kronis karena virus dan autoimun hepatitis, menunjukkan terjadinya reaksi duktular dan munculnya sel progenitor yang ada di dalam lobulus hati. Ekspresi dari CK 7 terlihat pada hepatosit pada kondisi tersebut. Hal ini terlihat pada uji *in vivo*, sel progenitor bisa berdeferensiasi menjadi sel duktular dan sel hepatosit matur sebagai respon dari

kerusakan hati yang kronis, yang bertolak belakang dengan penelitian sebelumnya di mana dijelaskan bahwa hepatosit akan bermetaplasia menjadi sel duktus biliaris. Tingkat dari reaksi duktus biliaris, jumlah sel progenitor, dan hepatosit yang mengekspresikan CK 7 meningkat bersamaan dengan peningkatan grading dan staging dari penyakit hati tersebut. Hubungan ekspresi hepatosit CK7 dan staging dapat menandakan adanya peningkatan matriks ekstraseluler pada fibrosis yang parah dan pada sirosis bisa memproduksi faktor maturase untuk sel progenitor (Bateman dan Hubscher, 2010).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Chaoling Ren (2003), terkait dengan marker CK7 dan CK19 pada uji coba babon yang terpapar alkohol didapatkan adanya peningkatan marker CK7 sementara CK19 jarang ditemukan pada hepatosit. CK7 ditemukan pada zona perivenular. Pada analisis histologi semiquantitatif ditemukan bahwa peningkatan jumlah CK7 dan CK19 berkorelasi dengan peningkatan dan progresivitas dari fibrosis hati. Pada babon yang terpapar alkohol ditemukan sensitivitas dan spesifitas yang tinggi jika dibandingkan dengan pasien kerusakan hati bukan karena alkohol (Ren *et al.*, 2003).



Gambar 2.8 Biopsi dari babon yang perlakuan alkohol selama 2 tahun dengan pengecatan imunohistokimia (Ren, 2003).

(A) pada perbesaran rendah didapatkan hepatosit positif marker disekitar vena sentralis. PT (*portal tract*) menunjukkan ekspresi CK7 tipikal dan atipikal sel duktular (x200). (B) CK7 terlihat di sitoplasma dan membran disekeliling vena sentralis (x400)

2.7 Vakuolisasi sel Hepatosit

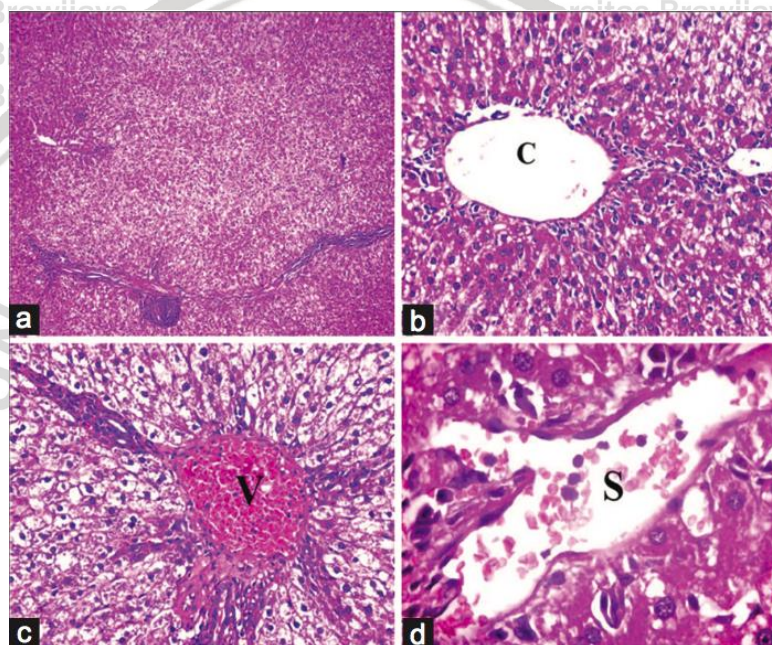
Pembengkakan hepatosit tanpa adanya lemak di sitoplasma sel, seringkali ditemukan pada kerusakan hati yang bersifat akut dan penyebab terseringnya karena virus hepatitis dan agen hepatotoksik. Bentuk morfologi ini telah diketahui merupakan cara dari hepatosit untuk bertahan dengan perubahan secara hidrofik. CCl₄ telah digunakan selama bertahun-tahun sebagai agen prototipe dalam penelitian mengenai kerusakan hati. CCl₄ dapat mengakibatkan degenerasi dan nekrosis dari hepatosit pasca intoksikasi akut. Hal ini paling terlihat pada daerah tengah lobulus dan hal ini bergantung pada dosis yang diberikan. Pada suatu penelitian oleh Nayak *et al* mengenai *The Nature and Significance Of Liver Vacuolation Following Hepatocellular Injury – An Analysis Based On Observations On Rats Rendered Tolerant To Hepatotoxic Damage* (1996), dikatakan bahwa pada penelitian sebelumnya pada tikus dengan diberikan CCl₄ dosis rendah, dapat ditemukan adanya sel nekrosis dan perubahan dari perleahan yang menyebabkan beberapa hepatosit yang terletak didaerah tengah lobulus. Hepatosit di luar daerah tersebut masih tidak didapati adanya kerusakan sel oleh CCl₄ namun, sel-sel tersebut berubah menjadi bengkak berbatas tegas dengan adanya vakuolisasi yang bersifat non lemak. hepatosit ini terlihat sangat jelas pada keadaan akut. Pada kelompok penelitian tanpa diberikan tatalaksana, vakuolisasi bertahan dalam jumlah yang besar dan mungkin bersifat letal dengan dosis yang berbeda (Nayak, 1996).

adalah perubahan yang jinak dan berhubungan dengan NAFLD.

Vakuolisasi hepatosit sering ditemukan secara histologis pada tikus yang digunakan untuk penelitian mengenai zat toksin. Vakuolisasi terdiri dari eosinofilik, dan bisa ditemukan pada orang normal di sekitar area sentral dari lobus hepatosit.

Vakuolisasi merupakan akibat dari anoxia. Sel-sel yang tervakuolisasi akan bergerak menuju ruang Disse dan plasma hepatosit akan bergerak ke sel.

Vakuolisasi anoxic dikatakan berhubungan dengan kenaikan berat hati. Hal ini sangat penting karena dari sisi morfologi dan dari rasio makros hati. Pada tikus yang memiliki jumlah sel yang banyak tervakuolisasi biasanya pada saat diseksi tidak dapat secara langsung mengalami perdarahan (Nayak, 1996).



Gambar 2.9 Fotomikrograf dari hepatosit dengan gambaran vakuolisasi. (Hassan *et al*, 2018). (a) gambaran histologi yang mulai mengalami kerusakan. (b) gambaran hepatosit yang tidak normal. (C) dilatasi dari vena sentralis. (c) (V) terlihat dilatasi dan kongesti dari vena portal. (d) (S) terlihat dilatasi dan kongesti darah di sinusoid. Dapat dilihat jumlah dari hepatosit ekspresi yang paling banyak adalah pada pengecatan HE perbesaran $\times 100$, b dan c: H dan E, $\times 400$, d: H dan E, $\times 1000$)

2.8 Karbon Tetraklorida (CCl₄)

Pemberian CCl₄ akan mengakibatkan adanya infiltrasi sel inflamasi dan mengakibatkan kerusakan hepatosit yang berujung pada fibrosis. Progresivitas patologi dari fibrosis hati sangat berkaitan dengan respon fibrotik dan adanya proliferasi dari jaringan ikat. Eksposur hepatosit pada CCl₄ akan memunculkan proses yang kompleks terkait resistensi terhadap toksin. Metabolisme dari CCl₄

pada liver akan menghasilkan radikal bebas dan memicu adanya stress oksidatif yang merupakan respon patologis dan dapat mengakibatkan kerusakan hepatosit yang progresif (Dong *et al.*, 2016).

Stress oksidatif akan menginisiasi produksi dari sitokin inflamasi yang akan mengakibatkan nekrosis dari sel hepatosit dan akan menyebabkan fibrogenesis hati. Saat kerusakan hati menjadi kronis, sel HSCs akan teraktivasi dan berproliferasi, menyebabkan deposisi dari ECM, dan hepatosit akan digantikan oleh ECM yang banyak dan mengakibatkan pembentukan skar dan fibrosis (Dong *et al.*, 2016).

Peningkatan produksi ECM juga dapat digolongkan dalam sistem parakrin atau endokrin, karena mempengaruhi fenotip sel, fungsi, dan hubungan, serta homeostasis. Hati merupakan organ utama untuk metabolisme gluconeogenesis, biasanya setelah terdapat kerusakan akan mengakibatkan kelainan metabolisme glukosa dan perkembangan hati yang abnormal (Dong *et al.*, 2016).

2.9 Staging Fibrosis Hati

Ishak (skor Knodell yang dimodifikasi) dan skor METAVIR adalah sistem penilaian yang paling banyak digunakan untuk menentukan derajat fibrosis dan nekroinflamasi dalam menangani hepatitis C kronis. METAVIR menjelaskan hubungan antara hepatitis dan nekrosis lobular yang akhirnya menentukan derajat keparahannya, sementara Ishak, juga menilai infiltrasi portal dan nekrosis konfluen bersama dengan dua parameter sebelumnya. Nekrosis konfluen sangat jarang terjadi pada hepatitis C kronis, skor batas rata-rata pasien adalah 12 bukan 18 (skor Ishak), yang utamanya terkait dengan nekroinflamasi. Infiltrasi sel inflamasi di portal lebih cenderung adalah respon imunologis daripada nekroinflamasi (Chou

dan Wasson, 2013). Di bawah ini merupakan perbedaan dan keuntungan dari penggunaan skoring Ishak dan METAVIR:

2.9.1 METAVIR

Skoring METAVIR digunakan untuk mengevaluasi derajat keparahan dari fibrosis dilihat dari hasil biopsy. *Grading* akan mengindikasikan seberapa banyak terjadi inflamasi pada hati, sedangkan *staging* mempresentasikan luasnya skaring atau fibrosis pada hati. Staging METAVIR adalah sebagai berikut (Shiha, 2011):

F0 : Tidak Fibrosis

F1 : Pembesaran sel stelata pada portal tanpa septa

F2 : Pembesaran jalur portal dengan septa

F3 : Banyak septa

F4 : Sirosis hati

2.9.2 ISHAK

Staging Ishak merupakan modifikasi dari system Knodell dan mempunyai 6 derajat fibrosis (0-6). Pada awalnya Ishak tidak terlalu terkenal, Ishak mulai dipakai beberapa tahun ini dan menjadi system staging yang umum digunakan untuk digunakan dalam uji klinis, terutama di Amerika Serikat. Karenakan tiap derajat dari *staging* Ishak mencerminkan hubungan erat dengan adanya skaring daripada tahap sebelumnya, maka dapat disimpulkan bahwa seiring dengan kenaikan derajat akan mengakibatkan penyakit hati yang lebih parah lagi. Di bawah ini adalah penjelasan tentang staging dari Ishak (Chou dan Wasson, 2013):

0: tidak fibrosis

1: pelebaran fibrosa pada beberapa daerah portal tanpa septa fibrosa pendek

2: pelebaran fibrosa mencangkup hampir seluruh area portal atau tanpa septa fibrosa pendek

- 3: pelebaran fibrosa mencangkup hampir seluruh area portal dengan terkadang adanya bridging antar portal
- 4: pelebaran fibrosa seluruh area portal dengan adanya *bridgging* antar portal dan bridging antara portal dan sentral
- 5: *Bridgging* (antar portal / antar portal dengan sentral) dengan terkadang terdapat nodulus (sirosis tidak sempurna)
- 6: Sirosis (kemungkinan atau diagnosis pasti)

Appendix Table 2. METAVIR and Ishak Scoring Systems for Hepatic Fibrosis*

| Stage | Description |
|----------------|---|
| METAVIR | |
| F0 | No fibrosis |
| F1 | Stellate enlargement of portal tract without septa |
| F2 | Enlargement of portal tract with rare septa |
| F3 | Numerous septa |
| F4 | Cirrhosis |
| Ishak | |
| 0 | No fibrosis |
| 1 | Fibrous expansion of some portal areas with or without short fibrous septa |
| 2 | Fibrous expansion of most portal areas with or without short fibrous septa |
| 3 | Fibrous expansion of most portal areas with occasional portal-to-portal bridging |
| 4 | Fibrous expansion of portal areas with marked portal-to-portal bridging and portal-to-central bridging |
| 5 | Marked bridging (portal-to-portal and/or portal-to-central), with occasional nodules (incomplete cirrhosis) |
| 6 | Cirrhosis (probable or definite) |

METAVIR = Meta-analysis of Histologic Data in Viral Hepatitis.

* Clinically significant fibrosis is usually defined as METAVIR stages F2 to F4 or Ishak stages 3 to 6. Cirrhosis is typically defined as METAVIR stage F4 or Ishak stages 5 or 6; however, METAVIR stage F3 includes patients with early or developing cirrhosis.

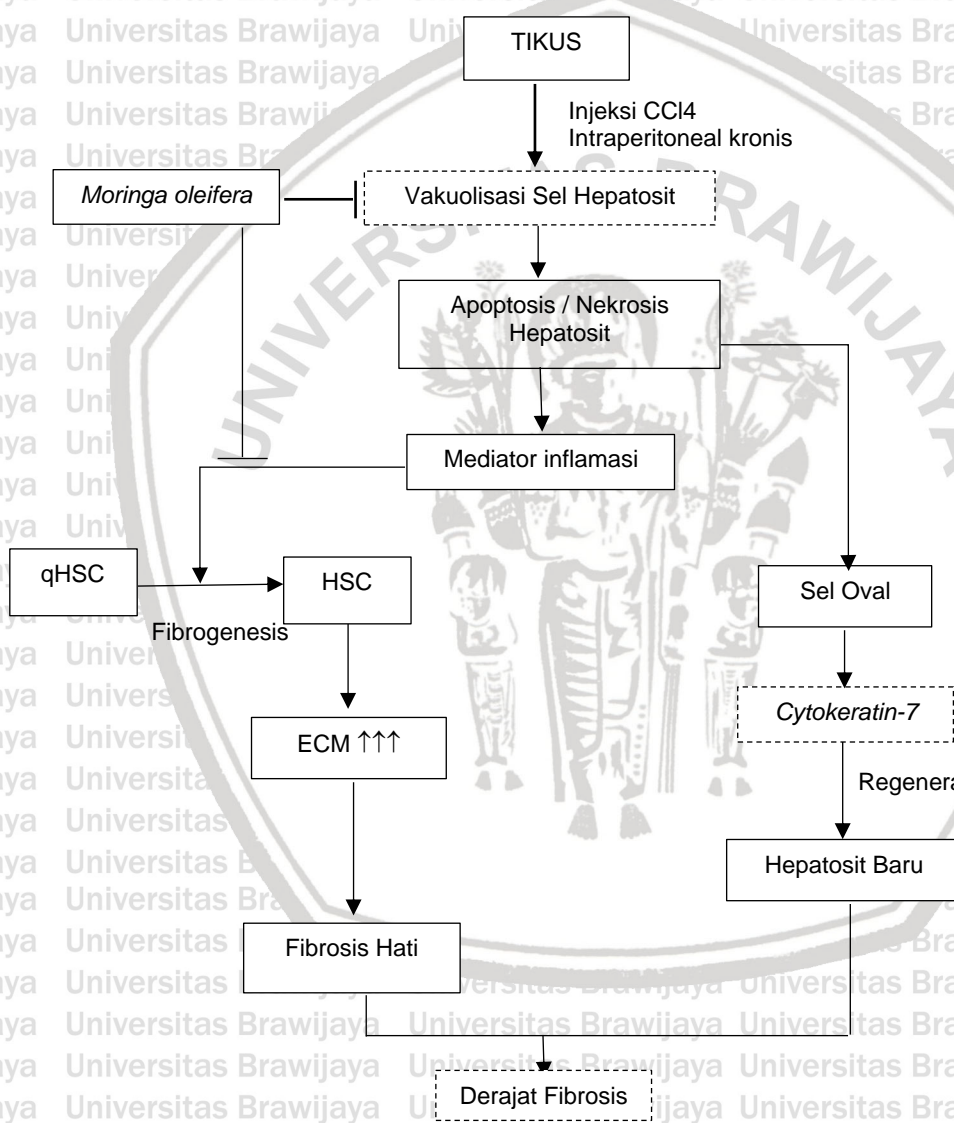
Gambar 2.10 Metavir = Meta-analisis Data Histologi pada Hepatitis karena virus. (Chou dan Wasson, 2013).

Fibrosis dalam METAVIR *stages* F2 sampai F4 atau pada Ishak *stages* 3 sampai 6. Sirosis dalam METAVIR *stages* F4 atau dalam Ishak *stages* 5 atau 6. METAVIR *stages* F3 merupakan perkembangan awal dari sirosis hati.

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan:



: Mendorong/memicu



: yang diperiksa



: Menghambat



3.2 Uraian Kerangka Konsep Penelitian

Tikus diinjeksi karbon tetraklorida (CCl_4) secara intra peritoneal, injeksi akan mengakibatkan kerusakan pada sel hepatosit. Hati akan memiliki respon untuk memetabolisme CCl_4 yang bersifat toksik. Hasil metabolisme CCl_4 akan mengakibatkan produksi mediator inflamasi dan ROS, yang akan merusak sel hepatosit dan akhirnya dapat menyebabkan nekrosis. Kerusakan akibat ROS akan mengakibatkan kerusakan sel hepatosit yang bersigat akut dan kemudian bisa berproses menjadi kerusakan sel hepatosit kronis yang ditandai adanya *ductular reaction*. Pada *Ductular Reaction* terdapat kanal Hering yang mempunyai 2 jalur regenerasi yaitu sel kolangiosit dan sel hepatosit dengan marker CK7. CK7 muncul saat terdapat kerusakan yang kronis pada sel hepatosit. Kadar CK7 akan ditemukan semakin banyak pada kerusakan hati yang makin parah. Bersamaan dengan CK7 dapat dilihat vakuolisasi pada sel tersebut. Vakuolisasi hepatosit akan berbanding lurus dengan jumlah sel yang fibrosis.

3.3 Hipotesis Penelitian

1. Pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi *cytokeratin 7* (CK 7) tikus model injeksi kronis karbon tetraklorida (CCl_4)
2. Pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi vakuolisasi sel hepatosit tikus model injeksi kronis karbon tetraklorida (CCl_4)

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian berbentuk eksperimental laboratorii dengan desain penelitian *true experimental laboratory*. Penelitian ini termasuk ke dalam eksperimental in vivo pada hewan coba tikus. Metode yang digunakan adalah *randomized posttest only controlled group*. Perlakuan yang diberikan pada hewan coba yaitu injeksi menggunakan CCl₄ untuk memicu keadaan fibrosis hati dan pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* dari UPT Materia Medica Batu dan melalui proses ekstraksi *maserasi menggunakan pelarut ethanol 96%*. Sebelum diberi perlakuan, hewan coba diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari kemudian dibagi menjadi 5 kelompok secara acak, sebagai berikut:

1. Kelompok positif (K-Pos): kelompok tikus diberi injeksi CCl₄ 10% IP 1 cc/kgBB 2x/minggu selama 12 minggu dan diberi injeksi CCl₄ 10% IP 2 cc/kgBB 2x/minggu pada minggu ke 13 dan 14. Tikus diberi sonde aquades 2,5 cc/kgBB sebagai plasebo setiap hari selama 14 minggu. Tikus dikorbankan 48 jam paska injeksi CCl₄ terakhir.
2. Kelompok negatif (K-Neg): kelompok tikus diberi injeksi NaCl 1 cc/kgBB IP 2x/minggu selama 14 minggu, dan diberi sonde aquades 2,5 cc/kgBB sebagai plasebo setiap hari selama 14 minggu. Tikus dikorbankan 48 jam paska injeksi NaCl terakhir.
3. Kelompok perlakuan-1 (K-P1): kelompok tikus diberi injeksi CCl₄ 10% IP 1 cc/kgBB 2x/minggu selama 12 minggu dan diberi injeksi CCl₄ 10% IP 2 cc/kgBB 2x/minggu pada minggu ke 13 dan 14. Tikus diberi sonde ekstrak

daun *Moringa oleifera* dosis 150 mg/kgBB/hari setara dengan 1,5 cc/kgBB/hari selama 14 minggu. Tikus dikorbankan 48 jam paska injeksi CCl₄ terakhir.

4. Kelompok perlakuan-2 (K-P2): kelompok tikus diberi injeksi CCl₄ 10% IP 1 cc/kgBB 2x/minggu selama 12 minggu dan diberi injeksi CCl₄ 10% IP 2 cc/kgBB 2x/minggu pada minggu ke 13 dan 14. Tikus diberi sonde ekstrak daun *Moringa oleifera* dosis 300 mg/kgBB/hari setara dengan 3 cc/kgBB/hari selama 14 minggu. Tikus dikorbankan 48 jam paska injeksi CCl₄ terakhir.

5. Kelompok perlakuan-3 (K-P3): kelompok tikus diberi injeksi CCl₄ 10% IP 1 cc/kgBB 2x/minggu selama 12 minggu dan diberi injeksi CCl₄ 10% IP 2 cc/kgBB 2x/minggu pada minggu ke 13 dan 14. Tikus diberi sonde ekstrak daun *Moringa oleifera* dosis 600 mg/kgBB/hari setara dengan 6 cc/kgBB/hari selama 14 minggu. Tikus dikorbankan 48 jam paska injeksi CCl₄ terakhir.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus novvergicus*) strain wistar. Adapun kriteria inklusi dan eksklusi yaitu:

Kriteria inklusi:

1. Tikus jantan
2. Umur \pm 3 bulan
3. Berat badan 150-250 gram
4. Belum pernah mengalami perlakuan apapun
5. Tikus sehat (gerak aktif dan bulu tidak rontok)

Kriteria eksklusi:

1. Tikus tidak mau makan selama penelitian
2. Tikus sakit atau mati selama perlakuan (bukan akibat injeksi ccl4)

4.2.1 Estimasi Jumlah Sampel

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

t: banyaknya kelompok perlakuan

r: jumlah pengulangan (replikasi) yang dipakai sebagai jumlah sampel

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

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

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

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 15+4$$

$$r \geq 19/4$$

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

Jadi, jumlah sampel 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 tikus yang digunakan dalam penelitian ini yaitu $6 \times 5 = 30$ tikus.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Laboratorium Sentral Ilmu Hayati

Universitas Brawijaya. Proses pemeliharaan dan perlakuan hewan coba tikus berupa injeksi CCl₄ dan pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera*. Analisis

ekspresi *Cytokeratin 7* dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FKUB.

Penelitian rencana akan dilakukan selama 14 minggu, mulai dilaksanakan bulan Juli sampai dengan Oktober 2018.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Ekspresi karbon tetraklorida (CCl₄) dan *Moringa oleifera*

4.4.2 Variabel Terikat

Ekspresi *Cytokeratin 7* (CK7), vakuolisasi sel hepatosit, dan derajat fibrosis hati.

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 standart konsentrat BR-1 yang dicampur tepung dengan perbandingan 3:1 dan air secukupnya.
3. Paparan CCl₄ adalah pemberian injeksi CCl₄ 10% (CCl₄: corn oil = 1:9 volume) intraperitoneal dengan dosis 1,0 ml/KgBB, 2 kali seminggu (Li, et al., 2012) selama 14 minggu.
4. *Moringa oleifera* (MO) yang digunakan berupa serbuk yang diperoleh dari UPT Materia Medica Batu, Malang.
5. Ekstrak MO diperoleh dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 96% (Khan, et al., 2009).
6. Paparan *Moringa oleifera* adalah ekstrak daunnya melalui sonde setiap hari. Ada tiga kelompok dengan dosis pemberian yang berbeda-beda yaitu 150 mg/kgBB/hari, 300 mg/kgBB/hari, 600 mg/kgBB/hari.
7. Setiap 1 g ekstrak daun MO dilarutkan dalam 10mL *distilled water* (Hamza, 2010) sehingga dosis yang diberikan adalah sbb: 150 mg/kgBB/hari setara

dengan 1,5 cc/kgBB/hari, 300 mg/kgBB/hari setara dengan 3 cc/kgBB/hari, dan 600 mg/kgBB/hari setara dengan 6 cc/kgBB/hari, diberikan sesuai jadwal yang ditentukan.

8. Ekspresi CK7 diukur dengan metode imunohistokimia dengan melihat reaksi imunopositif yang ditandai dengan adanya warna kecokelatan di sel sitoplasma hepatosit. Analisis data secara kuantitatif dapat diamati pada warna kecokelatan pada sitoplasma sel, dan dihitung per 20 lapang pandang (Soini *et al.*, 1998).

9. Derajat fibrosis hati dilihat dari preparat dengan pengecatan imunohistokimia (IHK), hematoxylin-eosin (H/E) dan Masson's trichrome (MT) (You, *et al.*, 2015), yang dianalisa oleh 2 ahli patologi anatomi. Penilaian derajat fibrosis menggunakan skala metavir; dimana F0: jaringan normal, F1: fibrosis terbatas pada area porta, perisinusoidal, dan intralobular, F2: fibrosis terbatas pada area porta, terbentuk septum fibrosa antar porta, terjadi kerusakan arsitektur intralobular, F3: terjadi septum fibrosa portal-*central*, disertai kerusakan struktur intralobular, belum terlihat sirosis, F4: sirosis (Goodman, 2007).

10. Vakuolisasi sel hepatosit dapat dilihat dengan pengecatan imunohistokimia (IHK), hematoxylin-eosin (H/E) dan Masson's trichrome (MT) (Hassan *et al.*, 2018). hepatosit dapat dilihat pada sitoplasma sel. Vakuolisasi dapat dilihat *ballooning* dalam sitoplasma, memiliki inti yang kecil dan kosong. Pewarnaan vakuolisasi terlihat bersih atau pucat (Nayak, 1996).

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat dan Bahan untuk Pengeringan, Ekstraksi, dan Evaporasi daun *Moringa oleifera* (MO)

1. Alat

- a. Erlenmeyer 500 ml
- b. Shaker
- c. Penyaring
- d. Rotary evaporator

2. Bahan

- a. Serbuk daun *Moringa oleifera*
- b. Pelarut etanol 80%

4.6.2 Alat dan Bahan untuk Pemeliharaan Tikus (Kandang dan Makanan)

1. Alat

- a. Kandang dari kotak berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm
- b. Alas sekam yang bersih dan kering serta diganti seminggu dua kali
- c. Tutup kandang dari anyaman kawat
- d. Botol air untuk minum tikus
- e. Wadah untuk pakan tikus
- f. Neraca sartorius untuk menimbang BB tikus dan makanan tikus
- g. Alat pembuatan pakan: baskom plastik, neraca sartorius, *handscoon*,

gelas ukur, pengaduk, penggilingan pakan, nampan

2. Bahan

- a. Air
- b. Sekam
- c. Pakan tikus : konsentrat BR-1, tepung terigu, dan air secukupnya

4.6.3 Alat dan Bahan untuk Pembuatan dan Penyimpanan Larutan Karbon

Tetraklorida (CCl_4)

1. Alat
 - a. Pipet
 - b. *Beaker glass*
 - c. Spatula
 - d. Sduit
 - e. Botol kaca berwarna gelap
 - f. *Aluminium foil*
2. Bahan
 - a. CCl_4
 - b. Minyak jagung

4.6.4 Alat dan Bahan untuk Penyimpanan Larutan Natrium Klorida (NaCl)

1. Alat
 - a. Botol kaca gelap
2. Bahan
 - a. NaCl 0.9% (diperoleh dengan dibeli)

4.6.5 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Larutan *Moringa oleifera* (MO)

1. Alat
 - a. Pipet
 - b. *Beaker glass*
 - c. Spatula
2. Bahan
 - a. Ekstrak daun *Moringa oleifera*
 - b. Air sebagai pelarut

4.6.6 Alat dan Bahan untuk Injeksi Karbon Tetraklorida (CCl_4) dan Natrium Klorida (NaCl)

1. Alat

- a. Spuit 1 cc
- b. Jarum suntik (sekali pakai)

2. Bahan

- a. larutan CCl_4 dan NaCl

4.6.7 Alat dan Bahan untuk Sonde *Moringa oleifera* (MO) dan Aquades

1. Alat

- a. alat sonde

2. Bahan

- a. larutan MO 150, 300, 600 mg/kgBB
- b. Aquades

4.6.8 Alat dan Bahan untuk Pembedahan Tikus

1. Alat

- a. Jarum pentul untuk fiksasi tikus
- b. Spuit untuk injeksi ketamin
- c. Kapas untuk alkohol
- d. Pinset anatomis

- e. Gunting

2. Bahan

- a. Ketamin
- b. Alkohol

4.6.9 Alat dan Bahan untuk Penentuan Derajat Fibrosis (Laboratorium Sentral

Ilmu Hayati Universitas Brawijaya)

1. Alat

- a. Rotasi mikrotom merek LEICA
- b. Mikroskop cahaya merek Nikon Eclipse C600
- c. Dengan kamera Nikon digital Net Camera DN 100 dengan pembesaran 40x, 100x, dan 200x, disertai lensa okuler 10x dan lensa objektif 100x

d. Kaca objek

e. Kaca penutup

2. Bahan

- a. Formalin 10%
- b. Aceton
- c. Xylol
- d. Parafin cair
- e. Parafin blok
- f. Meyer albumin
- g. Pewarnaan hematoxylin & eosin (HE)
- h. Pewarnaan Masson's tichrome (MT)
- i. Pewarnaan propidium iodide
- j. Alkohol 95%
- k. Air
- l. Lithium karbonat

4.6.10 Alat dan Bahan untuk Pemeriksaan CK7 (Lab Patologi Anatomi FKUB)

1. Alat
 - a. Biogenex
2. Bahan
 - a. pepsin 0,1%
 - b. Antibodi monoclonal CK7 dan CK19
 - c. larutan H₂O₂
 - d. larutan kromogen 3,3' diaminobenzinide
 - e. hematoksin
 - f. *biotin-streptavidin immune-peroksidase*

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pengeringan, Ekstraksi, dan Evaporasi daun *Moringa oleifera* (MO)

1. Pengeringan
 - a. Mencuci bersih daun *Moringa oleifera* segar dengan air mengalir
 - b. Memotong kecil
 - c. Memasukkan daun *Moringa oleifera* segar ke dalam oven suhu 40°-60° C
2. Ekstraksi
 - a. Menghaluskan daun *Moringa oleifera* yang sudah kering menggunakan blender
 - b. Menimbang hasil blender sebanyak 100 gram dengan neraca sartorius
 - c. Merendam hasil blender 100 gram ke dalam pelarut (aquades) sebanyak 1 L

- d. Mengocok rendaman tersebut dengan apa ya selama 30 menit dan merendamnya dalam apa ya sebanyak berapa ya selama satu malam sampai mengendap
- e. Mengambil lapisan atas yang merupakan campuran pelarut dan zat aktif
- f. Langkah d. dan e. dilakukan sebanyak 3 kali
3. Evaporasi
- a. Memasukkan hasil ekstraksi daun *Moringa oleifera* ke dalam labu evaporasi 1 L
- b. Memasang labu evaporasi pada evaporator
- c. Mengisi water bath dengan air hingga penuh (volume berapa yaa)
- d. Mengatur suhu water bath sampai 90° atau menyesuaikan dengan titik didih pelarut
- e. Memasang semua rangkaian alat dan menghubungkannya dengan arus listrik
- f. Membiarkan pelarut terpisah dengan zat aktif
- g. Membiarkan aliran pelarut sampai berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5-2$ jam) ± 900 ml
- h. Memasukkan hasil ekstraksi daun *Moringa oleifera* ke dalam botol plastic atau kaca yang diperkirakan bervolume 1/5 dari bahan alam kering
- i. Menyimpan hasil ekstraksi di freezer

4.7.2 Pemeliharaan Tikus (Kandang dan Makanan)

1. Persiapan sebelum pemeliharaan

a. Tikus *Rattus norvegicus* strain wistar didapatkan dari Laboratorium Farmakologi FKUB.

b. Mempersiapkan kandang tikus untuk 5 kelompok perlakuan. Setiap kelompok terdiri atas 6 kandang di mana 1 kandang berisi 1 tikus. Kandang diberi label sesuai dengan perlakuan, yaitu label

- Kelompok negatif: KNEG (1), KNEG (2), KNEG (3), KNEG (4), KNEG (5), KNEG (6)
- Kelompok positif: KPOS (1), KPOS (2), KPOS (3), KPOS (4), KPOS (5), KPOS (6)
- Kelompok perlakuan 1: Kp1(1), Kp1(2), Kp1(3), Kp1(4), Kp1(5), Kp1(6)
- Kelompok perlakuan 2: Kp2(1), Kp2(2), Kp2(3), Kp2(4), Kp2(5), Kp2(6)
- Kelompok perlakuan 3: Kp3(1), Kp3(2), Kp3(3), Kp3(4), Kp3(5), Kp3(6)

c. Kandang ditutup dengan menggunakan anyaman kawat berongga sehingga tikus tetap bisa bernafas dengan ventilasi udara yang cukup

d. Ruang untuk menempatkan kandang bersuhu 25-28°C dengan kelembapan udara 50-70%.

e. Alas kandang berupa sekam dengan ketebalan secukupnya dan diganti dengan sekam yang baru dua kali dalam satu minggu.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

2. Pemeliharaan tikus

a. 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.

b. 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.

c. Memberikan pakan yang berupa konsentrat BR-1 dan tepung terigu

dengan perbandingan 3:1, dan ditambahkan air secukupnya. Berat

pakan yang diberikan untuk setiap tikus sama, yaitu 40 gram.

d. Tikus dikeluarkan dari kandang untuk diberikan perlakuan seperti

menimbang berat badan dan injeksi fibrosis hati dengan karbon

tetrklorida (CCl_4). Sebelum memegang tikus, peneliti mendekatkan

diri dengan tikus agar tikus mengetahui keberadaan orang

disekitarnya dan menghindari gigitan tikus. Untuk kelompok negatif

diinjeksi NaCl 0.9% dengan dosis 1 ml/kgBB dengan frekuensi dua

kali seminggu yang digunakan sebagai plasebo setara dengan injeksi

CCl_4 kelompok lain.

e. Untuk kelompok positif dan kelompok negatif diberikan sonde

aquades 2,5 cc/kgBB sebagai plasebo setara dengan sonde ekstrak

daun *Moringa oleifera* pada kelompok lain.

f. Memberikan sonde ekstrak daun *Moringa oleifera* dengan dosis 150 mg/kgBB/hari untuk Kp1, 300 mg/kgBB/hari untuk Kp2, dan 600 mg/kgBB/hari untuk Kp3. Pemberian pertama bersamaan dengan injeksi pertama CCl₄ kemudian dilanjutkan setiap hari.

4.7.3 Pembuatan Larutan Karbon Tetraklorida (CCl₄)

1. Mengambil CCl₄ dengan pippet sebanyak 5 mL
2. Mempersiapkan minyak jagung dengan rasio perbandingan 1 CCl₄ : 9 minyak jagung
3. Melarutkan CCl₄ di dalam *beaker glass* dengan minyak jagung sehingga konsentrasi menjadi 10%

4.7.4 Pembuatan Larutan Natrium Klorida (NaCl)

Larutan NaCl yang digunakan dalam penelitian diperoleh dengan membeli

4.7.5 Pembuatan Larutan *Moringa oleifera* (MO)

1. Larutan *Moringa oleifera* 150 mg/kgBB
 - a. Mencampurkan 2400 mg ekstrak daun *Moringa oleifera* dengan 80 cc air sehomogen mungkin sehingga 1 cc larutan mengandung 30 mg ekstrak daun. Setiap 1 kg BB tikus menerima 5.00 cc larutan MO.
 - b. Mengisi larutan ke dalam botol kaca berlabel ekstrak MO 150 mg/kgBB
 - c. Menyimpan larutan di dalam kulkas dan dikeluarkan saat hendak diberikan pada tikus.

2. Larutan *Moringa oleifera* 300 mg/kgBB
 - a. Mencampurkan 4800 mg ekstrak daun *Moringa oleifera* dengan 120 cc air sehomogen mungkin sehingga 1 cc larutan mengandung 40 mg ekstrak daun. Setiap 1 kg BB tikus menerima 7.50 cc larutan MO.
 - b. Mengisi larutan ke dalam botol kaca berlabel ekstrak MO 300 mg/kgBB
 - c. Menyimpan larutan di dalam kulkas dan dikeluarkan saat hendak diberikan pada tikus.
3. Larutan *Moringa oleifera* 600 mg/kgBB
 - a. Mencampurkan 9600 mg ekstrak daun *Moringa oleifera* dengan 160 cc air sehomogen mungkin sehingga 1 cc larutan mengandung 60 mg ekstrak daun. Setiap 1 kg BB tikus menerima 10.00 cc larutan MO.
 - b. Mengisi larutan ke dalam botol kaca berlabel ekstrak MO 600 mg/kgBB
 - c. Menyimpan larutan di dalam kulkas dan dikeluarkan saat hendak diberikan pada tikus.

4.7.6 Injeksi Karbon Tetraklorida (CCl₄) dan Natrium Klorida (NaCl)

1. Setelah adaptasi selama satu minggu, dilakukan injeksi CCl₄ secara intraperitoneal.
2. Untuk setiap injeksi dosisnya yaitu 1cc/kgBB setiap 2 kali per minggu selama 14 minggu untuk kelompok KPOS, Kp1, Kp2, Kp3. Injeksi CCl₄ didahului dengan penghitungan dosis CCl₄ berdasarkan berat badan tikus pada hari terkait.

3. Di bagian yang akan disuntik harus di bersihkan dulu dengan kapas yang diberi alkohol dengan arah sirkuler dari medial ke lateral.
4. CCl₄ disuntikkan di bagian kuadran kanan bawah abdomen untuk menghindari tertusuknya organ-organ vital.
5. Injeksi CCl₄ dapat menimbulkan kondisi stres pada tikus, untuk itu lakukan dengan teknik yang tepat, tenang, dan hati-hati.
6. 1 jarum untuk injeksi digunakan untuk 1 tikus saja. Saat hendak menginjeksi tikus yang lain, harus dilakukan penggantian jarum.

4.7.7. Sonde *Moringa oleifera* (MO) dan Aquades

1. Mengambil larutan MO di dalam botol berdasarkan dosis dan volume pemberian (berdasarkan perhitungan BB hari itu) sesuai jadwal kelompok perlakuan.
2. semua tikus menerima sonde dengan volume 2.5 ml sehingga jika dosis MOnya tidak mencapai 2.5 ml ditambahkan aquades hingga 2.5 ml. aquades dimasukkan terlebih dahulu ke dalam spuit
3. memberikan sonde pada tikus dengan memasukkan alat sonde ke dalam mulut tikus

4.7.8 Pembedahan Tikus dan Pengambilan Organ

Sebelum dilakukan pembedahan, tikus harus dieuthanasia terlebih dahulu. Euthanasia ini dilakukan dengan injeksi ketamine 100. Berikut adalah tahapan yang harus dilakukan saat pembedahan:

- Pembedahan sesuai dengan waktu yang sudah ditentukan untuk mendapat semua derajat fibrosis hati.
- Tikus di euthanasia dengan injeksi ketamine 100, setelah itu baru dilakukan pembedahan.

- Tikus ditempatkan di papan bedah yang keras dan dialasi dengan streofoam. Kaki dan tangan tikus difiksasi dengan jarum pentul pada atas streofoam.

- Torak dan abdomen tikus dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median. Pembedahan ini diperluas sampai ke lateral agar organ bagian dalam rongga abdomen terlihat.

- Selanjutnya yaitu pengambilan organ hati untuk diperiksa derajat fibrosis hati dengan histopatologi jaringan hati.

4.7.9 Pemeriksaan Ekspresi CK7 (Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya)

1. Bahan untuk pemotongan dan pengecatan sel

- sampel berupa jaringan hati
- buffer formalin 10%
- acetone
- xilol
- ethanol absolut
- alkohol 90% dan alkohol 80%
- parafin
- *tissue casset*
- *object glass*
- H₂O₂
- Methanol
- larutan decloaking
- Phospat Buffer Saline

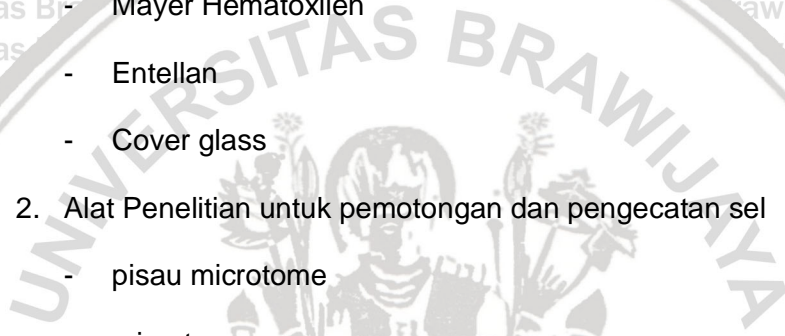
- Akuades
- background sniper
- anti bodi primer CK7 Santa Cruz
- anti bodi sekunder

- trekavidin-HRP
- Betazoid Dab substrat buffer
- DAB Chromogen

- Mayer Hematoxilen
- Entellan
- Cover glass

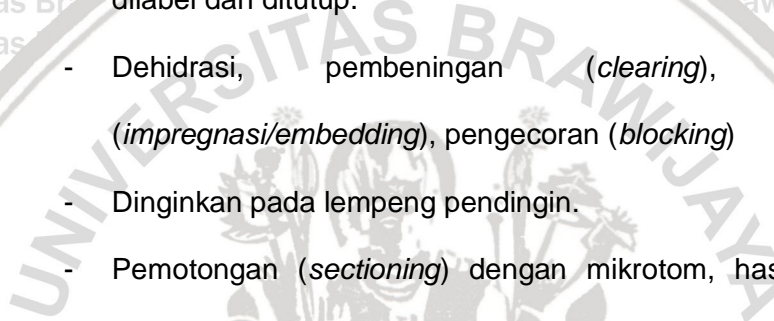
2. Alat Penelitian untuk pemotongan dan pengecatan sel

- pisau microtome
- microtome
- *waterbath*
- inkubator
- Pap pen
- Decloaking Chamber
- Mikroskop
- Mikropipet
- Pinset
- Bunsen
- teko alumunium
- basket jaringan
- Wadah kaca bertutup rapat



3. Cara Kerja Penelitian

- Prosedur diawali dari penerimaan sampel yang difiksasi dalam *buffer* formalin 10% selama 18 jam
- jaringan yang berukuran besar dibelah
- jaringan yang telah difiksasi dipotong sempurna dengan ketebalan 2-3 mm.
- Potongan jaringan tersebut dimasukkan dalam *tissue casset* yang dilabel dan ditutup.
- Dehidrasi, pembedahan (*clearing*), pembedaman (*impregnasi/embedding*), pengecoran (*blocking*)
- Dinginkan pada lempeng pendingin.
- Pemotongan (*sectioning*) dengan mikrotom, hasil pemotongan berupa pita tipis dimasukkan ke *waterbath* berisi air hangat lalu diambil dengan *object glass* yang telah diolesi albumin gliserin.
- Inkubasi satu malam di inkubator. Tahap selanjutnya adalah pewarnaan (*staining*).
- Prosedur pewarnaan imunohistokimia diawali dengan memanaskan sediaan yang dilekatkan pada *object glass* yang ter-*coating* Poly L-Lysine dalam inkubator suhu 40 °C selama 1 jam
- Deparafinasi dengan xilol I, II III masing-masing 3 menit
- Sampel lalu dimasukkan dalam ethanol absolut, alkohol 90%, 80% masing-masing 3 menit.
- Sampel dimasukkan dalam H₂O₂ 0,5% dalam methanol selama 20 menit.



- Sampel dilakukan *antigen retrieval* dengan cara direndam dan dipanaskan dalam *Decloaking Chamber*.
- Sampel didinginkan pada suhu ruang 30 menit dan dibilas dengan akuades.
- Sampel direndam dalam *Phosphat Buffer Saline* selama 3 menit.
- Slide diletakkan dalam *Moisture Chamber* dan pada sekeliling sediaan diberi pembatas dengan pap pen, lalu ditetesi dengan background sniper selama 10 menit.
- Slide ditetesi antibodi primer CK7 dan diinkubasi selama 1 jam atau satu malam, lalu slide dicuci dengan *Phosphat Buffer Saline* selama 3 menit.
- Slide ditetesi dengan antibodi sekunder dan diinkubasi selama 30 menit. Slide dicuci dengan *Phosphat Buffer Saline* selama 3 menit.
- Slide ditetesi *Trekavidin-HRP* label dan diinkubasi selama 40 menit.
- Slide ditetesi DAB (3'3-diaminobenzidine) dan diinkubasi 2 – 10 menit.
- Slide dicuci dengan air mengalir 5 – 7 menit.
- Slide dicounterstain dengan mayer haematoxilin 2 – 3 menit.
- Slide di rendam dalam Lithum Carbonat jenuh 3 menit.
- Slide dicuci dengan air mengalir 5-7 menit.
- Slide didehidrasi dengan alkohol 80%, 96%, alkohol absolut sampai dengan xylol I, II, III masing-masing 3 menit.
- Slide dilakukan *mounting* yaitu dengan entellan lalu dilanjutkan dengan pengamatan langsung melalui mikroskop.

4.7.10. Pembacaan dan Interpretasi Hasil

Pengambilan data menggunakan mikroskop digital dan aplikasi master Olyvia versi 2.4 DT for scan dan pembacaan hasil preparat yang sudah dicat menggunakan master Olyvia versi 2.4 (Rowe, 2011).

Perbesaran yang digunakan adalah 40x dengan pembacaan 20 lapang pandang yang masing-masing berisi lebih kurang 1500 sel (Pizem and Cor, 2003).

4.8. Pengolahan Data

4.8.1. Uji Analisis

Teknis pengolahan data hasil penelitian dianalisis secara komputerisasi dengan menggunakan software *Statistical Product and Service Solution*, IBM SPSS Statistics 20 dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$), dengan langkah-langkah sebagai berikut.

1. Uji asumsi yaitu menggunakan *Shapiro Wilk Test* dan menggunakan *Levene test* untuk melihat apakah data tersebar normal yaitu parametrik atau tidak tersebar normal (non-parametrik),
2. Uji komparasi dilakukan dengan cara *One-Way ANOVA* > 2 kelompok untuk mengetahui adanya ekspresi CK7 dan sel vakuolisasi pada Luas Fibrosis dan secara tidak langsung juga dihubungkan dengan pemberian ekstrak *Moringa oleifera*.
 - a. Sebaran data harus normal
 - b. Varian data harus sama (homogen)
3. Uji *Kruskal Wallis* digunakan untuk data yang persebarannya tidak normal atau tidak homogen dengan menggunakan data dari

independent sample test view untuk dan *pairwise comparisons*

untuk melihat perbandingan yang signifikan antara kelompok.

- Uji *Post Hoc Tukey* dilakukan untuk mengetahui antar kelompok yang memberikan perbedaan yang signifikan pada data parametrik.

Jika data non parametrik maka menggunakan *Mann Whitney U Test*.

- Uji Korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara 2 variabel yang ada. Jika data parametrik digunakan Uji Korelasi *Pearson*, sedangkan data non parametrik menggunakan Uji Korelasi *Spearman*. Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara ekspresi vakuolisasi sel hepatosit, *cytokeratin 7* (CK7), dan Luas Fibrosis.

4.8.2 Penulisan dan Pelaporan Hasil Penelitian

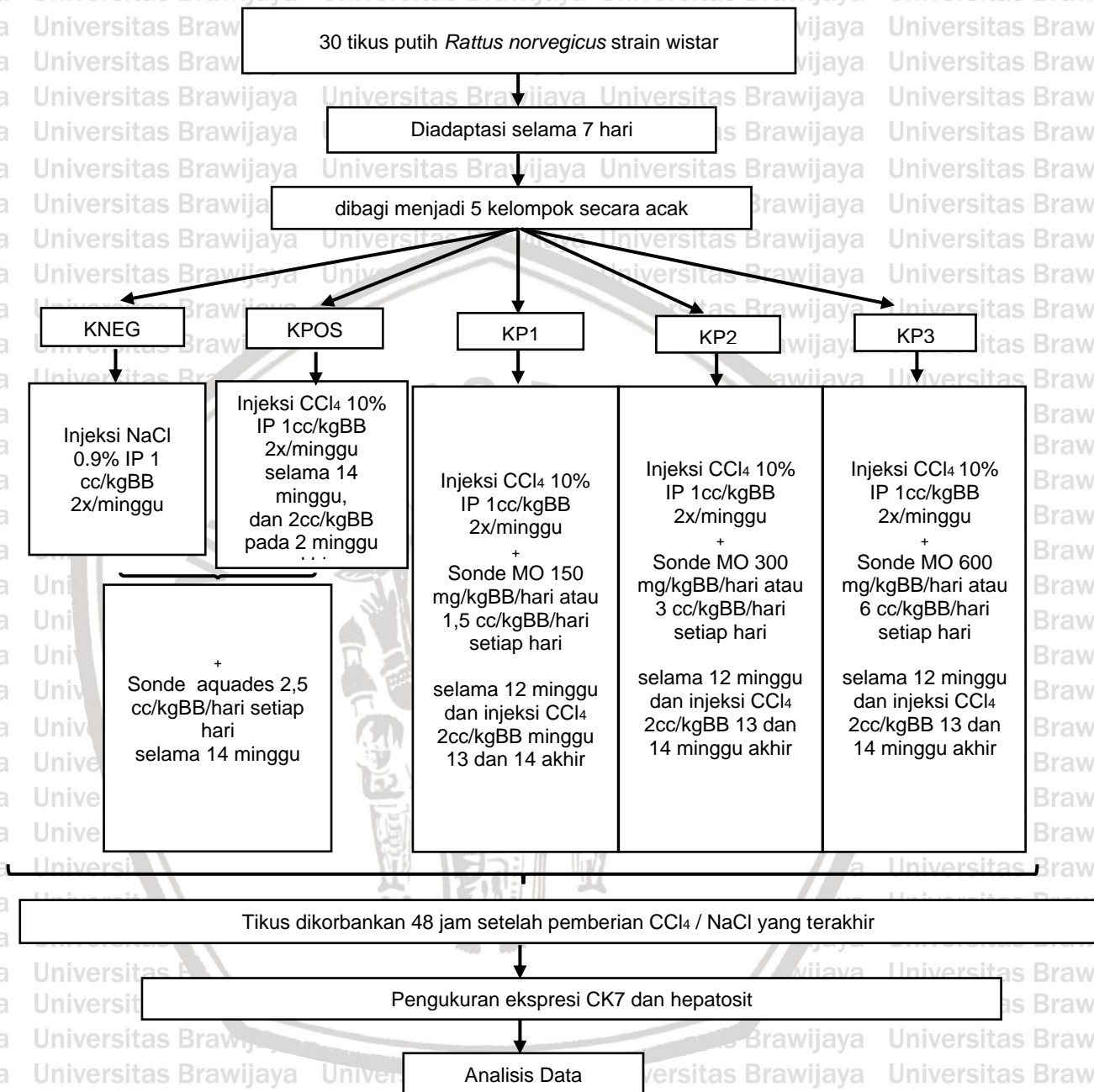
Hasil penelitian berupa tabel yang memuat luas fibrosis, nama kelompok tikus, dan jumlah ekspresi CK7.

| Kelompok Perlakuan | Ekspresi <i>Cytokeratin 7</i> (CK7) | | | | | Rerata | ± SD |
|--------------------|-------------------------------------|---|---|---|---|--------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| KNEG | | | | | | | |
| KPOS | | | | | | | |
| KP1 | | | | | | | |
| KP2 | | | | | | | |
| KP3 | | | | | | | |

| Kelompok Perlakuan | Jumlah vakuolisasi sel hepatosit | | | | | Rerata | ± SD |
|--------------------|----------------------------------|---|---|---|---|--------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| KNEG | | | | | | | |
| KPOS | | | | | | | |
| KP1 | | | | | | | |
| KP2 | | | | | | | |
| KP3 | | | | | | | |



4.8.3 Alur Penelitian



BAB 5

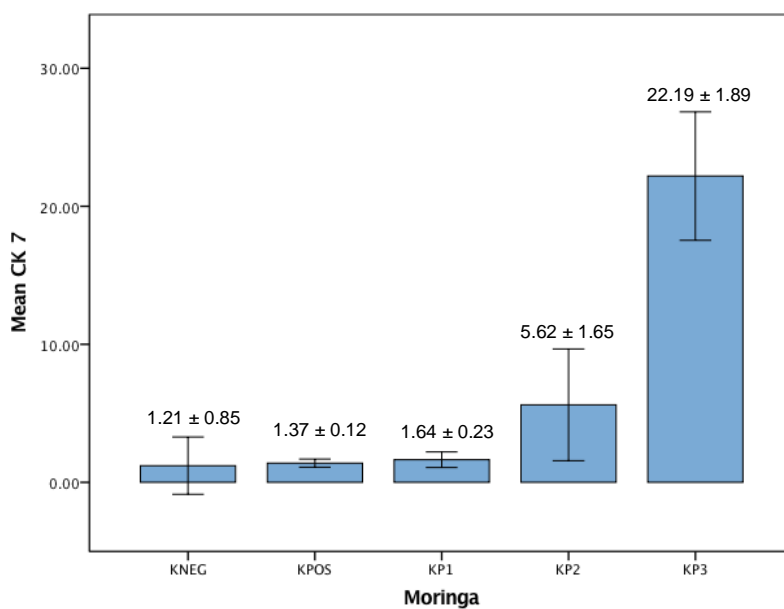
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Berdasarkan uji asumsi yang telah dilakukan pada data hasil penelitian, didapati bahwa data baik luas fibrosis, CK7, dan vakuolisasi sel hepatosit tidak homogen dan tidak terdistribusi dengan normal.

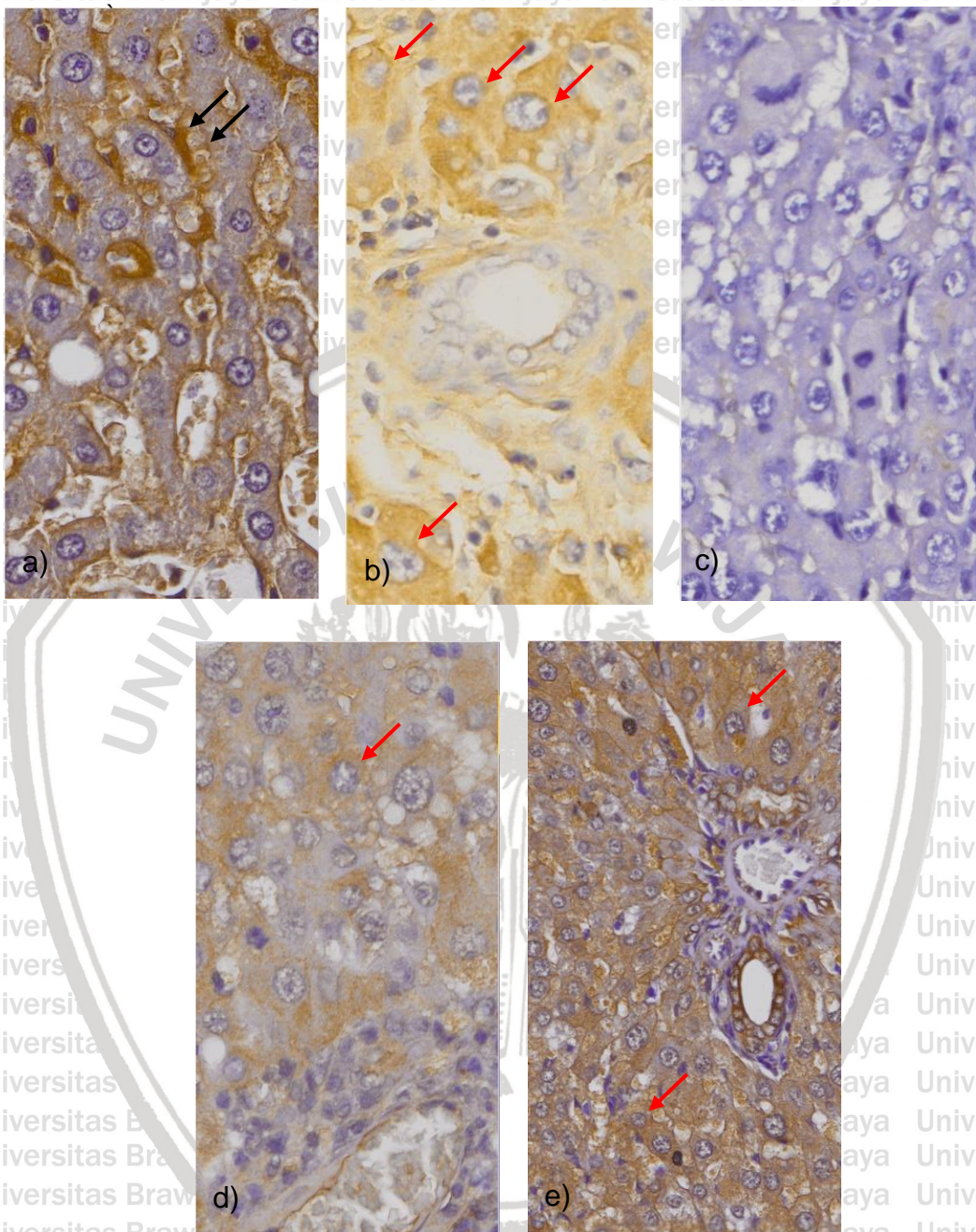
Tabel 5.1 Hasil ekspresi *cytokeratin 7* dari 5 kelompok perlakuan

| Kelompok Perlakuan | Ekspresi <i>Cytokeratin 7</i> (CK7) | | | | | Rerata | ± SD |
|--------------------|-------------------------------------|-------|-------|-------|------|--------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| KNEG | 5.35 | 0.25 | 0 | 0.46 | 1 | 1.21 | 0.85 |
| KPOS | 1.5 | 1.2 | 1.39 | 1.03 | 1.05 | 1.37 | 0.12 |
| KP1 | 1.64 | 2.35 | 1.25 | 1.85 | 0.75 | 1.64 | 0.23 |
| KP2 | 4.2 | 11.75 | 5.241 | 8.85 | 0.65 | 5.62 | 1.65 |
| KP3 | 21.25 | 22.19 | 29.5 | 22.25 | 14.9 | 22.19 | 1.89 |



Gambar 5.1 Grafik rata-rata *cytokeratin 7* setiap kelompok Perlakuan





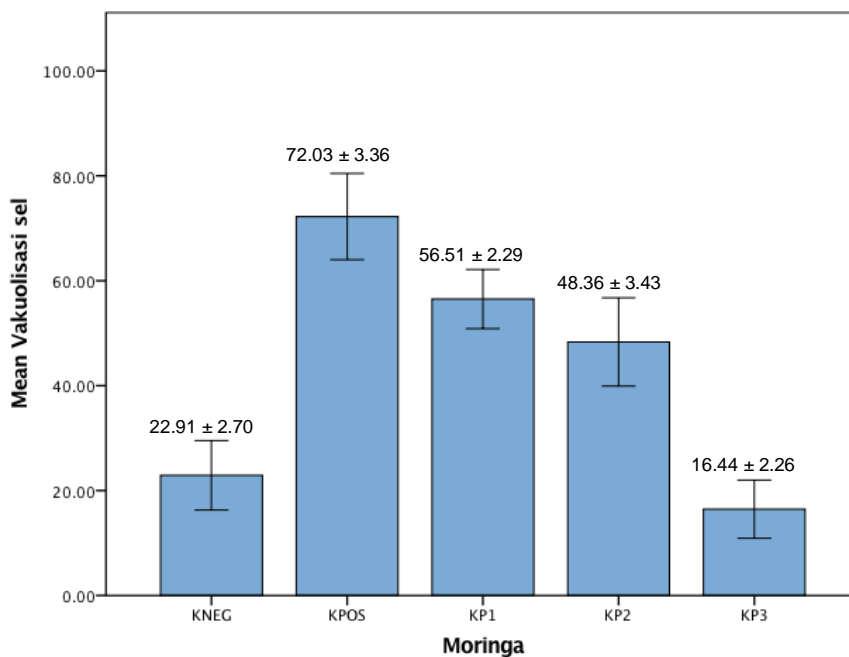
Gambar 5.2 Gambaran Histopatologi CK7 dengan pengecatan IHK pada tikus model fibrosis (x40) master OlyVia.

a) KNEG b) KPOS c) KP1 d) KP2 e) KP3. Terlihat pada KNEG terdapat perivenular fibrosis (panah hitam) dan tidak ditemukan ekspresi CK7 pada sitoplasma (a). Pada KPOS *Bilier duct* (BD) tidak ada ekspresi CK7, sitoplasma (+) CK7 (b). Pada KP1 tidak ditemukan sitoplasma yang (+) CK7(c). KP2 sitoplasma mengekspresikan CK7 (d). Pada KP3 ditemukan sitoplasma (+) CK7 dan (+) pada *Bilier duct* (BD) (e). Tanda panah merah mewakili ekspresi CK7 di sitoplasma.

Ditemukan kadar CK7 pada KP3 yang sangat tinggi dibandingkan kelompok perlakuan lain. Kadar KP3 yang tinggi kemungkinan terjadinya progresivitas penyakit yang masih dalam ambang batas toleransi CK7 dan hepatosit masih belum mengalami nekrosis.

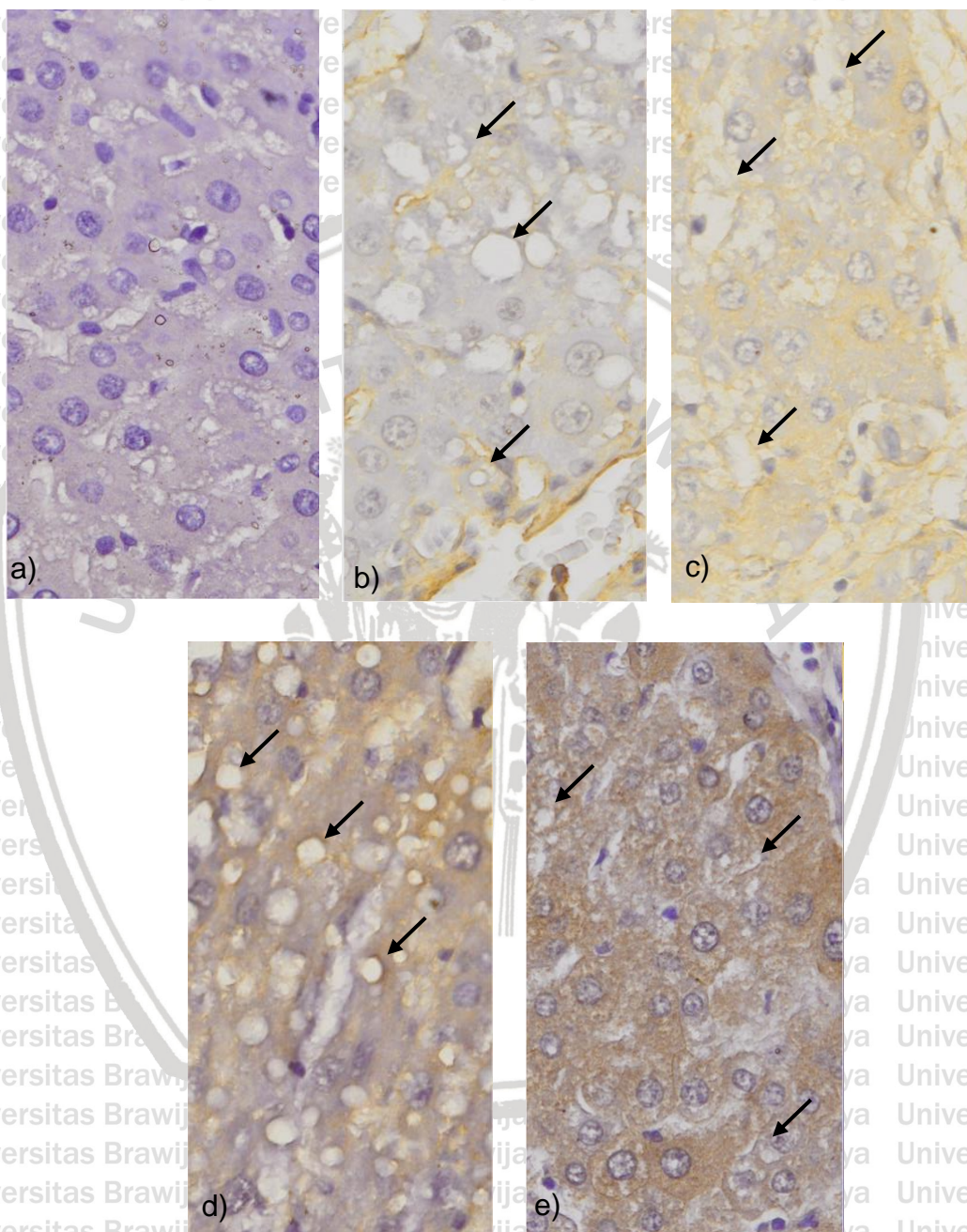
Tabel 5.2 Hasil hepatosit dari 5 Kelompok Perlakuan

| Kelompok Perlakuan | Jumlah vakuolisasi sel | | | | | Rerata | ± SD |
|--------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| KNEG | 31.65 | 25.05 | 16.55 | 27.25 | 14.05 | 22.91 | 2.70 |
| KPOS | 77.00 | 84.8 | 67.95 | 70.90 | 60.50 | 72.23 | 3.36 |
| KP1 | 57.10 | 58.25 | 63.90 | 56.80 | 46.50 | 56.51 | 2.29 |
| KP2 | 53.50 | 57.65 | 46.40 | 49.65 | 49.9 | 48.36 | 3.43 |
| KP3 | 24.25 | 9.10 | 19.35 | 18.25 | 11.25 | 16.44 | 2.26 |



Gambar 5.3 Grafik rata-rata jumlah vakuolisasi sel hepatosit setiap kelompok perlakuan

Ditemukan jumlah vakuolisasi sel hepatosit paling tinggi adalah di kelompok KPOS dikarenakan pada kelompok KPOS tidak mendapat *Moringa oleifera*.

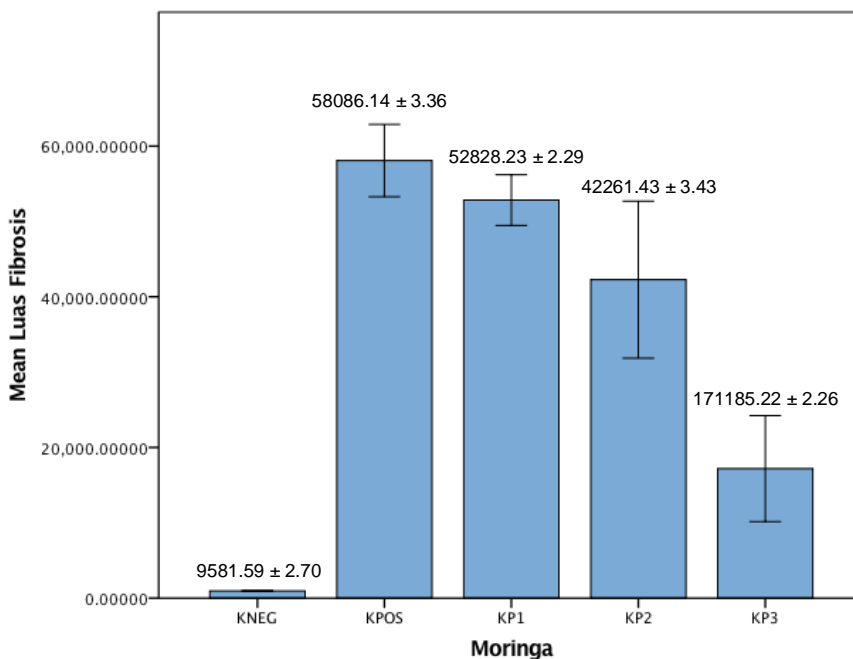


Gambar 5.4 Gambaran Histopatologi vakuolisasi sel hepatosit dengan pengecatan IHK pada tikus model fibrosis (x40 master OlyVia).

a) KNEG b) KPOS c) KP1 d) KP2 e) KP3. Pada KNEG ditemukan tidak disebabkan oleh CCl₄ (a). Pada tanda panah hitam terdapat vakuolisasi pada sitoplasma sel. Untuk perbandingan jumlah dilakukan per 20 lapang pandang.

Tabel 5.3 Hasil Luas Fibrosis dari 5 Kelompok Perlakuan

| Kelompok Perlakuan | Luas Fibrosis | | | | | Rerata | ± SD |
|--------------------|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| KNEG | 981.37 | 978.96 | 944.05 | 949.79 | 927.94 | 9581.61 | 2.70 |
| KPOS | 60928.99 | 62812.01 | 57220.34 | 5145.7 | 62532.61 | 58086.61 | 3.36 |
| KP1 | 57234.81 | 53114.71 | 50344.35 | 56434.59 | 49153.57 | 52828.23 | 2.29 |
| KP2 | 44085.85 | 51996 | 23228.01 | 49840.02 | 45808.36 | 42261.43 | 3.43 |
| KP3 | 8065.91 | 8195.25 | 21614.48 | 21119.19 | 21435.06 | 17185.22 | 2.26 |



Gambar 5.5 Grafik rata-rata Luas Fibrosis setiap kelompok perlakuan

Ditemukan luas fibrosis paling tinggi adalah di kelompok KPOS dikarenakan pada kelompok KPOS tidak mendapat *Moringa oleifera*.

5.2 Analisis Data

Analisis data menggunakan aplikasi SPSS versi 23 MacOs. Hasil analisis tertera pada lampiran. Analisis data menyertakan semua kelompok dari KNEG, KPOS, KP1, KP2, dan KP3, dengan masing-masing terdapat 6 tikus yang diteliti.

5.2.1 Uji Asumsi Data

Uji asumsi data dilakukan dengan uji normalitas untuk melihat distribusi data dan melakukan uji homogenitas untuk mengetahui heterogenitas antara data.

Uji asumsi dilakukan sebelum melakukan uji statistik. Uji parametrik dilakukan jika pada hasil uji asumsi menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen.

Jika data yang tidak homogen dan tidak normal, maka kita menggunakan uji non-parametrik.

5.2.2 Uji Normalitas Data

Uji Normalitas Data menggunakan *Shapiro Wilk Test* untuk CK7, vakuolisasi sel hepatosit, dan luas fibrosis. *Shapiro Wilk Test* diperuntukan untuk jumlah sampel penelitian dibawah 50. Data dikatakan terdistribusi normal jika $p > 0.05$. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa data CK7, vakuolisasi sel hepatosit, dan luas fibrosis tidak terdistribusi normal karena terdapat kelompok perlakuan dengan $p < 0.05$, yaitu luas fibrosis dan CK7. Sedangkan data terdistribusi normal.

Tabel 5.4 Hasil Uji Normalitas CK7, Vakuolisasi sel hepatosit, dan Luas Fibrosis

| | Tests of Normality | | | | | |
|---------------|---------------------------------------|----|------|---------------------|----|------|
| | <i>Kolmogorov-Smirnov^a</i> | | | <i>Shapiro-Wilk</i> | | |
| | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| Luas fibrosis | .209 | 30 | .002 | .852 | 30 | .001 |
| CK 7 | .287 | 30 | .000 | .712 | 30 | .000 |
| Vakuolisasi | .132 | 30 | .194 | .938 | 30 | .079 |

5.2.3 Uji Homogenitas Ragam Data

Uji homogenitas ragam data menggunakan *Levene Test*. Data dikatakan homogen jika $p > 0.05$. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa data luas fibrosis $p < 0.05$, sedangkan CK7 dan $p > 0.05$.

Tabel 5.5 Hasil Uji Homogenitas CK7, Vakuolisasi sel hepatosit, dan Luas Fibrosis

| <i>Test of Homogeneity of Variances</i> | | | | |
|---|------------------|-----|-----|------|
| | <i>Levene</i> | | | |
| | <i>Statistic</i> | df1 | df2 | Sig. |
| Luas fibrosis | 4.942 | 4 | 25 | .004 |
| CK 7 | 2.700 | 4 | 25 | .054 |
| Vakuolisasi | .334 | 4 | 25 | .852 |

5.2.4 Uji *Kruskal Wallis*

Uji *Kruskal Wallis* digunakan untuk melihat signifikansi perbedaan rata-rata kadar CK7, Vakuolisasi sel hepatosit, dan Luas fibrosis dari seluruh kelompok perlakuan pada data yang tidak terdistribusi normal (non parametrik). Pada uji *Kruskal Wallis* juga dibandingkan antar kelompok perlakuan, daya yang paling signifikan. Dikatakan signifikan jika $p < 0.05$. Hasil menunjukkan bahwa perbedaan rata-rata CK7, Vakuolisasi sel hepatosit, dan Luas fibrosis sangat signifikan.

Tabel 5.6 Hasil Uji *Kruskal Wallis* CK7, Vakuolisasi sel hepatosit, dan Luas fibrosis

| | <i>Uji Kruskal Wallis</i> | <i>P-value</i> |
|---------------------------|---------------------------|----------------|
| CK7 | | 0.001 |
| Vakuolisasi sel hepatosit | | 0.000 |
| Luas Fibrosis | | 0.000 |

Tabel 5.7 Hasil Uji Kruskal Wallis MO terhadap CK7

| Sample 1 – sample 2 | Test statistic | Std. error | Std. test statistic | Sig. | Adj.sig. |
|---------------------|----------------|------------|---------------------|-------|----------|
| KNEG–KPOS | | | | | |
| KNEG–KP1 | | | | | |
| KNEG–KP2 | | | | | |
| KNEG–KP3 | -20.667 | 5.082 | -4.067 | 0.000 | 0.000 |
| KPOS-KP1 | | | | | |
| KPOS-KP2 | | | | | |
| KPOS-KP3 | -16.33 | 5.082 | -3.214 | 0.001 | 0.013 |
| KP1-KP2 | | | | | |
| KP1-KP3 | | | | | |
| KP12-KP3 | | | | | |

Tabel 5.8 Hasil Uji Kruskal Wallis MO terhadap Vakuolisasi Sel Hepatosit

| Sample 1 – sample 2 | Test statistic | Std. error | Std. test statistic | Sig. | Adj.sig. |
|---------------------|----------------|------------|---------------------|-------|----------|
| KP3-KNEG | | | | | |
| KP3-KP2 | | | | | |
| KP3-KP1 | 15.667 | 5.083 | 3.082 | 0.002 | 0.021 |
| KP3-KPOS | 22.500 | 5.083 | 4.427 | 0.000 | 0.000 |
| KNEG-KP2 | | | | | |
| KNEG-KP1 | | | | | |
| KNEG-KPOS | -19.167 | 5.083 | -3.771 | 0.000 | 0.002 |
| KP2-KP1 | | | | | |
| KP2-KPOS | | | | | |
| KP1 – KPOS | | | | | |



Tabel 5.9 Hasil Uji *Kruskal Wallis* MO terhadap Luas Fibrosis

| Sample 1 – sample 2 | Test statistic | Std. error | Std.test statistic | Sig. | Adj.sig. |
|---------------------|----------------|------------|--------------------|-------|----------|
| KNEG–KP3 | | | | | |
| KNEG–KP2 | | | | | |
| KNEG–KP1 | -18.333 | 5.083 | -3.067 | 0.000 | 0.003 |
| KNEG – KPOS | -22.883 | 5.083 | -4.492 | 0.000 | 0.000 |
| KP3 – KP2 | | | | | |
| KP3 – KP1 | | | | | |
| KP3-KPOS | 16.833 | 5.083 | 3.312 | 0.001 | 0.009 |
| KP2 – KP1 | | | | | |
| KP2 – KPOS | | | | | |
| KP1 – KPOS | | | | | |

1.2.5 Uji Korelasi *Spearman*

Uji *Spearman* digunakan untuk data yang tidak normal, untuk melihat kekuatan korelasi, arah korelasi serta signifikansi antara variabel yang digunakan dalam penelitian. Dalam hal ini penulis melakukan uji korelasi antara dosis MO terhadap kadar CK7, dosis MO terhadap vakuolsasi, dan CK7 terhadap vakuolisasi pada semua kelompok perlakuan.

Tingkat kekuatan korelasi dilihat dari koefisien korelasi, dengan ketentuan:

1. Koefisien korelasi 0.00 – 0.25 = hubungan sangat lemah
2. Koefisien korelasi 0.26 – 0.50 = hubungan cukup
3. Koefisien korelasi 0.51 – 0.75 = hubungan kuat
4. Koefisien korelasi 0.76 – 0.99 = hubungan sangat kuat
5. Koefisien korelasi 1.00 = hubungan sempurna

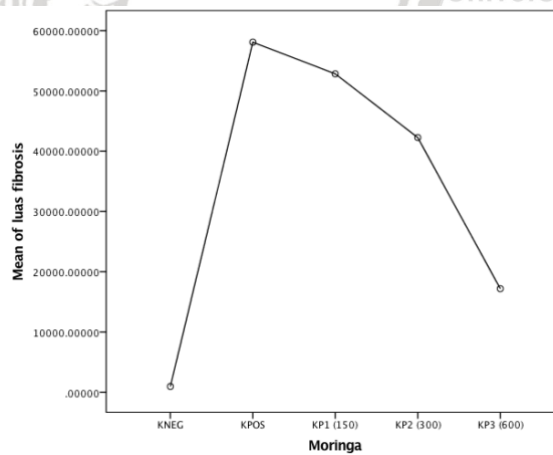
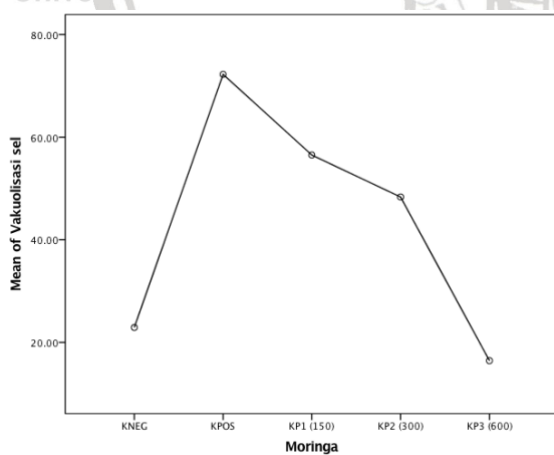
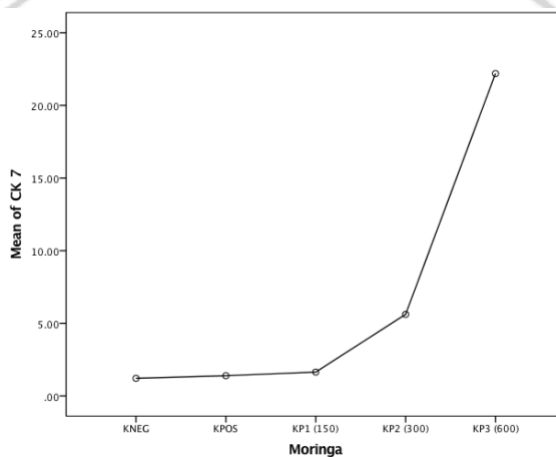
Arah korelasi bergantung pada positif atau negatifnya koefisien korelasi. Jika bernilai positif, maka dinyatakan searah. Jika bernilai negatif, maka dinyatakan



tidak searah. Signifikan jika $p < 0.05$, sedangkan jika > 0.05 dinyatakan tidak signifikan.

Tabel 5.10 Hasil Uji Korelasi Spearman

| Uji Korelasi Spearman | P-value | Koefisien Korelasi |
|-----------------------|---------|--------------------|
| MO-CK7 | 0.000 | 0.798 |
| MO-Vakuolisasi | 0.129 | -0.283 |
| MO-Luas Fibrosis | 0.000 | -0.033 |



Gambar 5.6 Plot antara dosis dengan rata-rata CK, *Moringa oleifera*, dan Luas Fibrosis



Hasil menunjukkan korelasi yang signifikan, baik antara CK7 dengan dosis *Moringa oleifera*, vakuolisasi sel hepatosit dengan dosis *Moringa oleifera*, dan luas fibrosis dengan dosis *Moringa oleifera*.





BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Kerusakan hepatosit dapat disebabkan oleh obat-obatan atau oleh zat toksin contohnya adalah CCl_4 . CCl_4 dimetabolisme oleh CYP2E1 dan bersifat zat radikal yang sangat aktif jika kerusakan ini berlanjut akan mengakibatkan kerusakan hati yang kronis (Manautou dan Aleksunes, 2010). Kerusakan hati yang berkelanjutan dapat berkembang menjadi sirosis hati yang bersifat tidak *reversible*. 90% dari kerusakan hati yang bersifat kronis dapat menyebabkan *hepatocarcinoma cancer* (Delire, 2018).

Rerata hasil pesebaran dari CK7 tinggi pada KP3 mengindikasikan bahwa CK7 bernilai sangat ekspresif pada sel hepatosit. Pada uji *Kruskal Walls* tabel 5.6 ditemukan sangat signifikan dengan *reject the null hypothesis*, $p\text{-value} = 0.00$ ($p < 0.05$) antara MO dan CK7. Nilai yang signifikan karena pada Sig. (2-tailed) 0.00 ($p < 0.05$). Nilai signifikan ditemukan pada perbandingan KNEG – KP3 ($p = 0.00$) dan KPOS – KP3 ($p = 0.013$). Pada uji korelasi *Spearman* ditemukan hubungan yang searah dan sangat kuat (koefisien korelasi = 0.798) dengan nilai signifikansi $p = 0.000$ pada CK7.

Pada gambaran histopatologi CK7, didapatkan adanya warna kecokelatan pada sitoplasma sel hepatosit yang mengindikasikan bahwa sel hepatosit tersebut ekspresif pada CK7. Pada penelitian sebelumnya CK7 muncul saat terdapat proliferasi dari kolangiosit / HPC tergantung dengan patologi penyakit (Sato *et al*, 2019).

Ekspresi dari CK7 dapat dilihat disekitar duktus biliaris di bagian epitel, dan di sekitar trias porta, selain itu jika memang sudah (+) CK7, selanjutnya diperiksa keadaan sel hepatosit disekitarnya apakah ada ekspresi yang bersifat atipikal dan tipikal. Pada penelitian MO terhdahulu dapat dibuktikan bahwa pada *cholangiocarcinoma*, MO menyebabkan apoptosis dan dapat menghambat proliferasi dari sel keganasan (Leelawat, 2014).

Vakuolisasi atau *baloning* terjadi pada saat sel hepatosit berusaha beradaptasi dengan kerusakan pada sel. Rerata hepatosit paling tinggi terletak pada KPOS dibandingkan dengan kelompok lain. Pada tabel *Kruskal Wallis* 5.6 ditemukan nilai yang signifikan antara MO dengan ($p=0.000$). Pada tabel 5.8 *Kruskal Wallis* dapat diketahui nilai yang membuat MO-menjadi signifikan yaitu KP3-KP1 ($p=0.021$), KP2-KPOS ($p=0.000$), dan KNEG-KPOS ($p=0.002$). Pada Uji Korelasi *Spearman* nilai MO-adalah korelasi tidak signifikan, kekuatan korelasi cukup kuat, dan korelasi tidak searah ($p= 0.129$, koefisien korelasi = -0.283). Pada penelitian sebelumnya diketahui dengan dosis kecil dari toksin menyebabkan vakuolisasi dari sel hepatosit, sehingga dengan dosis lebih besar pada toksin / zat hepatotoksik dapat menyebabkan vakuolisasi sitoplasma lebih parah (Nayak, 1996). Secara histopatologi gambaran mikros didapatkan *balloning* yang lebih banyak dibandingkan dengan kelompok lain, hal ini ditandai dengan adanya celah sitoplasma yang melebar dan kosong, juga mendesak inti sel dan sel lain (Nayak, 1996).

Interpretasi dari tiap gambaran histopatologi:

6.1.1 Interpretasi *Cytokeratin 7* (CK 7)

a) Interpretasi gambaran histopatologi KNEG

Pada KNEG didapatkan ekspresi CK7 di sitoplasma sel pada 20 lapang pandang (Rerata= 1.21). Struktur parenkim sel hepatosit normal. Hal ini disebabkan karena pada KNEG adalah kelompok kontrol dan tidak diberi CCl₄ sehingga tidak menimbulkan kerusakan yang berlanjut.

b) Interpretasi gambaran histopatologi KPOS

Pada KPOS didapatkan bahwa pada 20 lapang pandang didapatkan ekspresi dari CK7 yang cukup rendah (Rerata = 1.3688). Terdapat *balonging* pada septa fibrosis. CK7 yang rendah mungkin dikarenakan oleh apoptosis dari sel hepatosit yang tidak mampu untuk berproliferasi lagi dan MO tidak diberikan.

c) Interpretasi gambaran histopatologi KP1

Pada pembacaan KP1 per 20 lapang pandang ditemukan bahwa ekspresi CK7 dari KP1 cukup rendah (Rerata= 1.64) namun jauh lebih banyak dari KNEG dan KPOS. Hal ini dikarenakan adanya vakuolisasi pada sel hepatosit. MO yang diberikan untuk KP1 adalah 150 mg/kgBB/hari, jika dilihat dari gambaran histopatologinya maka didapatkan sedikit ekspresi dari CK7 di sitoplasma sel hepatosit.

d) Interpretasi gambaran histopatologi KP2

Pada pembacaan per 20 lapang pandang didapati bahwa jumlah sitoplasma yang terdapat ekspresi CK7 cukup tinggi dari kelompok sebelumnya (Rerata= 5.62). Septa fibrosis terlihat jelas. MO yang diberikan pada kelompok perlakuan ini adalah 300 mg/kgBB/hari.

e) Interpretasi gambaran histopatologi KP3

Pada pembacaan 20 lapang pandang didapat bahwa jumlah sitoplasma yang terdapat ekspresi CK7 lebih tinggi dari kelompok sebelumnya (Rerata= 22.19). MO diberikan pada kelompok ini adalah 600 mg/kgBB/hari, sehingga diperkirakan jumlah MO mampu menekan progresivitas dari kerusakan sel hepatosit akibat paparan CCl₄

6.1.2 Interpretasi Vakuolisasi sel Hepatosit

a) Interpretasi gambaran histopatologi KNEG

Pada KNEG pada 20 lapang pandang terdapat beberapa *balloning* minimal pada sel hepatosit. Terdapat *balloning* struktur parenkim sel hepatosit normal, tidak ada septa fibrosis yang terbentuk. Struktur histologi lain masih terdiferensiasi dengan baik.

b) Interpretasi gambaran histopatologi KPOS

Pada pembacaan per 20 lapang pandang didapat bahwa ada jumlah sitoplasma yang terdapat ekspresi CK7 dan vakuolisasi sel hampir pada seluruh lapang pandang. Secara histologis trias porta dan vena sentralis sulit untuk diidentifikasi.

c) Interpretasi gambaran histopatologi KP1

Pada pembacaan KP1 per 20 lapang pandang ditemukan bahwa ekspresi CK7 dari KP1 cukup rendah (Rerata= 56.51) namun jauh lebih banyak dari KNEG dan KPOS. Hal ini dikarenakan adanya vakuolisasi pada sel hepatosit. MO yang diberikan untuk KP1 adalah 150 mg/kgBB/hari, jika dilihat dari gambaran histopatologinya maka didapatkan sedikit ekspresi dari CK7 di sitoplasma sel hepatosit.

d) Interpretasi gambaran histopatologi KP2

Pada pembacaan per 20 lapang pandang didapati bahwa ada jumlah sitoplasma yang terdapat ekspresi CK7 dan vakuolisasi sel (Rerata= 16.44). Secara histologi trias porta dan vena sentralis sulit untuk diidentifikasi karena fibrosis yang mulai menjalar.

e) Interpretasi gambaran histopatologi KP3

Pada pembacaan 20 lapang pandang didapati bahwa jumlah sitoplasma yang terdapat ekspresi CK7 lebih tinggi dari kelompok sebelumnya (Rerata= 16.44). MO diberikan pada kelompok ini adalah 600 mg/kgBB/hari, sehingga diperkirakan jumlah MO mampu menekan progresivitas dari kerusakan sel hepatosit akibat paparan CCl₄.

Ekspresi CK7 - MO sangat signifikan ($p=0.00$) Nilai vakuolisasi juga berhubungan signifikan yaitu ($p=0.00$). Pada penelitian kelompok CK7 dan MO memiliki sifat bertolak belakang. CK7 pada teorinya akan makin tinggi jika yang fibrosisnya makin luas. Namun, vakuolisasi akan semakin tinggi pada kelompok yang makin fibrosis yang progresif (Aravinthan *et al.*, 2012). Maka dari itu dapat ditarik kesimpulan bahwa pemberian ekstrak daun MO

6.2 Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini, penghitungan bersifat subjektif dan tergantung pada peneliti karena tidak menggunakan pembacaan oleh 2 orang minimal. Hasil dari penghitungan juga dipengaruhi oleh hasil pewarnaan. Tidak terdapat cadangan sel hati lain dari tikus yang sudah dibelah

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* (MO) dan penambahan dosisnya berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi *cytokeratin 7* (CK7) pada tikus model yang diberikan injeksi kronis CCl₄.
2. Pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* (MO) dan penambahan dosisnya berpengaruh terhadap penurunan jumlah vakuolisasi sel hepatosit pada tikus model yang diberikan injeksi kronis CCl₄.

7.2 Saran

1. Penulis menyarankan untuk dilakukannya penelitian lebih lanjut mengenai *cytokeratin 7* (CK 7) dan mekanisme patofisiologinya terkait dengan *ductular reaction* sehingga perlakuan sampel selama penelitian yang mempengaruhi munculnya *cytokeratin 7* bisa dikendalikan.
2. Penulis menyarankan untuk dilakukannya penelitian lebih lanjut terkait dengan *cytokeratin 7* (CK 7) dengan membandingkannya dengan ekspresinya di organ lain dan penyakit lain untuk mengetahui kredibilitas dalam menjadi marker untuk fibrosis hati.

DAFTAR PUSTAKA

- Abou-Rawash, A. A., Abdel-Megged, M. S., & Azza, Koulkaila. (2008). *Effects of Enzyme Modulation on Aflatoxin Cytotoxicity and Carcinogenicity in Rats: Cyotgenetics and Histopathology*. Egypt. J. Comp. Path. & Clinic. Path., 21(2), 175- 200.
- Aravinthan A, Verma S, Coleman N, Davies S, Allison M, Alexander G. *Vacuolation in hepatocyte nuclei is a marker of senescence*. J Clin Pathol. 2012;65(6):557–60.
- Bataller, Ramón., Brenner, David,. 2005. *Liver Fibrosis*. Department of Medicine, Columbia University.
- Bateman AC, Hübscher SG. *Cytokeratin expression as an aid to diagnosis in medical liver biopsies*. Histopathology. 2010.
- Byass P. *The global burden of liver disease: A challenge for methods and for public health*. BMC Med. 2014;12(1):1–3.
- Chou, Roger MD, and Wasson NM. *Erratum to: Blood tests to diagnose fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis c virus infection (Annals of Internal Medicine)*. Ann Intern Med. 2013;159(4):308.
- Delire B, Henriët P, Lemoine P, Leclercq IA, Stärkel P. *Chronic liver injury promotes hepatocarcinoma cell seeding and growth, associated with infiltration by macrophages*. Cancer Sci. 2018;109(7):2141–52.
- Dong S, Chen QL, Song YN, Sun Y, Wei B, Li XY, et al. *Mechanisms of CCl₄-induced liver fibrosis with combined transcriptomic and proteomic analysis*. J Toxicol Sci. 2016;41(4):561–72.
- Gilgenkrantz H, Collin de l'Hortet A. *Understanding Liver Regeneration: From Mechanisms to Regenerative Medicine*. Am J Pathol [Internet]. 2018;188(6):1316–27.
- Goodman, Z.D. *Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases*. J. Hepatol. 2007, 47, 598–607.
- Khan, T. H., Sultana, S. 2009. *Antioxidant and hepatoprotective potential of Aegle marmelos Correa against CCl₄-induced oxidative stress and early tumor events*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 24(2), 320–327. doi:10.1080/14756360802167754

Halaby MS, El-Din MM, Emara NE. Influence of *Moringa oleifera* on Non-Alcoholic Fatty Liver in Adult Albino Rats. Middle East J Appl Sci [Internet]. 2015;5(4):902–12.

Hamza AA. *Ameliorative effects of Moringa oleifera Lam seed extract on liver fibrosis in rats. Food Chem Toxicol* [Internet]. 2010;48(1):345–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.10.022>

Hassan N, Soliman G, Okasha E, Shalaby A. *Histological, immunohistochemical, and biochemical study of experimentally induced fatty liver in adult male albino rat and the possible protective role of pomegranate. J Microsc Ultrastruct.* 2018;6(1):44.

Leelawat S, Leelawat K. *Moringa oleifera extracts induce cholangiocarcinoma cell apoptosis by induction of reactive oxygen species production. Int J Pharmacogn Phytochem Res.* 2014;6(2):183–9.

Li, X., R. Elwell, M., M. Ryan, A., & Ochoa, R. (2003). Morphogenesis of Postmortem Hepatocyte Vacuolation and Liver Weight Increases in Sprague-Dawley Rats. *Toxicologic Pathology*, 31(6), 682-688.

Manautou JE, Campion SN, Aleksunes LM. Regulation of Hepatobiliary Transporters during Liver Injury. *Compr Toxicol Second Ed.* 2010;9:175–220.

Nayak NC, Sathar SA, Mughal S, Duttagupta S, Mathur M, Chopra P. *The nature and significance of liver cell vacuolation following hepatocellular injury - an analysis based on observations on rats rendered tolerant to hepatotoxic damage. Virchows Arch.* 1996;428(6):353–65.

Planas-Paz L, Orsini V, Boulter L, Calabrese D, Pikiólek M, Nigsch F, et al. The RSPO-LGR4/5-ZNRF3/RNF43 module controls liver zonation and size. *Nat Cell Biol.* 2016;18(5):467–79.

Pizem, J., Cor.A. (2003). Detection of Apoptosis Cells in Tumour Paraffin Section. *Radiol. Oncol.*, 37(4), 225-232.

Pernick N. *Cytokeratin 7 (CK7, K7).* PathologyOutlines.com [Internet]. 2016;7:28–9. Available from: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsck7.html>

Ren C, Paronetto F, Mak KM, Leo MA, Lieber CS. *Cytokeratin 7 staining of hepatocytes predicts progression to more severe fibrosis in alcohol-fed baboons. J Hepatol.* 2003;38(6):770–5.

Rengifo CE, Blanco R, Cedeño M, Frómata M, Rengifo E. *Tissue Expression of Low and High Molecular Weight Cytokeratins in Lung Carcinoma Sections: Its Correlation with Some Clinic-Pathological Features. J Histol.* 2014; 2014:1–9.

Rowe A, Zhang L, Hussain A, Braet F, Ramzan I. *Assessment and histological analysis of the IPRL technique for sequential in situ liver biopsy*. Comp Hepatol. 2011; 10:1–7.

Saxena, Romil M.D., Path, F.R.C. Path., Theise, Neil M.D. 2004. *Canals of Hering: Recent Insights and Current Knowledge*. *Seminars in Liver Disease*.

Saini, R.K.; Sivanesan, I.; Keum, Y.S. *Phytochemicals of Moringa oleifera: A review of their nutritional, therapeutic and industrial significance*. Biotech 2016, 6

Sato K, Marzioni M, Meng F, Francis H, Glaser S, Alpini G. *Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances*. Hepatology. 2019;69(1):420–30.

Sekine S, Lan BYA, Bedolli M, Feng S, Hebrok M. Liver-specific loss of β -catenin blocks glutamine synthesis pathway activity and cytochrome P450 expression in mice. Hepatology. 2006;43(4):817–25.

Shiha G, Zalut K. *Ishak versus METAVIR: Terminology, Convertibility and Correlation with Laboratory Changes in Chronic Hepatitis C*. Liver Biopsy. 2011;(March).

va A V., Demidyuk I V., Komissarov AA, Rafieva LM, Kostrov S V. *Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival*. Oncotarget. 2016;7(34):55863–89.

Sudoyo A w. *Buku Ajat Ilmu Penyakit dalam PAPDI Edisi Kelima*. Edoc.Site_Buku-Ajar-Ilmu-Penyakit-Dalam-Papdi-Edisi-Kelima.Pdf. 2009. p. 3085.

Soini, Y., Paakko, P., & Lehto, V-P. (1997). *Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer*. American Journal of Pathology. 153(4), 1041-1048.

Tanaka M, Miyajima A. *Liver regeneration and fibrosis after inflammation*. Inflamm Regen [Internet]. 2016;36(1):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s41232-016-0025-2>

Vergara-Jimenez M, Almatrafi MM, Fernandez ML. *Bioactive components in Moringa oleifera leaves protect against chronic disease*. Antioxidants. 2017;6(4):1–13.