



UJI EKSTRAK DAUN MORINGA OLEIFERA TERHADAP EKSPRESI TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β DI SEL STELLATE HATI TERAKTIVASI DAN PENGHAMBATAN FIBROGENESIS PADA TIKUS MODEL FIBROSIS HATI

TESIS

**Diajukan Guna Melengkapi Tugas-tugas dan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Dokter Spesialis Penyakit Dalam**



Oleh :

dr. Rifal Rinaldi

NIM: 158070200111007

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I ILMU PENYAKIT DALAM
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
RUMAH SAKIT UMUM Dr. SAIFUL ANWAR MALANG**

2019

LEMBAR PENGESAHAN KARYA AKHIR

UJI EKSTRAK DAUN MORINGA OLEIFERA TERHADAP EKSPRESI TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β 1 DI SEL STELLATE HATI TERAKTIVASI DAN PENGHAMBATAN FIBROGENESIS PADA TIKUS MODEL FIBROSIS HATI

Diajukan Guna Melengkapi Tugas-tugas dan Untuk Memenuhi
Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar Dokter Spesialis Penyakit Dalam

Oleh

dr. Rifal Rinaldi
NIM.158070200111007

Menyetujui,

Pembimbing I



dr. Supriono, Sp.PD-KGEH
NIP 19660517 199803 1 004

Pembimbing II



dr. Syifa Mustika, Sp.PD-KGEH
NIP. 19780430 201212 2 001

Mengetahui,

KPS PPDS Ilmu Penyakit Dalam
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
RSUD dr. Saiful Anwar Malang



dr. Putu Modia Arsana, Sp.PD-KEMD, FINASIM
NIP. 19560503 198403 1 008



PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam karya akhir ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia karya akhir ini digugurkan serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, Januari 2020

Penulis

Nama : Rifal Rinaldi

NIM : 158070200111007

PS : Ilmu Kedokteran

Prog : PPDS-1

Fak : Kedokteran UB



Nurisa, dr. Yuni Dian Lestari yang telah senantiasa mendukung, saling mengisi, dan memotivasi sebagai suatu tim dan keluarga.

11. Tim penelitian saya dr. Yeny Larasati, dr. Nadina Zerlinda Mustamsir, dr. Safarina Kharima, dr. Edy Susanto yang saling mendukung dan memotivasi dalam mengerjakan penelitian ini.

12. Seluruh rekan-rekan PPDS, Dokter Muda, Perawat, Tenaga Farmasi, Ahli Gizi, dan seluruh karyawan FKUB/RSSA yang telah membantu saya menjalankan tugas sebagai PPDS IPD FKUB/RSSA.

13. *The last but not least* kepada semua pasien yang telah mendermakan jiwa dan raganya demi kemajuan ilmu pengetahuan di bidang Ilmu Penyakit Dalam.

Penulis berharap semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan Ilmu Penyakit Dalam serta kepentingan masyarakat, bangsa, dan negara. Penulis menyadari bahwa penelitian ini masih banyak kekurangan, dengan demikian penulis memohon saran dan masukan demi kesempurnaan penelitian ini.

Malang, Januari 2020

dr. Rifal Rinaldi

"The aim of medicine is to prevent disease and prolong life; the ideal of medicine is to eliminate the need of a physician."

-William J. Mayo (1861-1939)-



ABSTRAK

LATAR BELAKANG : TGF- β 1 dianggap sebagai sitokin yang memegang peranan penting dalam fibrogenesis hati. *Moringa oleifera* (MO), secara medis, dikenal karena efek farmakologisnya yang beragam termasuk antitumor, antihiperlipidemik, anti-inflamasi, antioksidan. Mengetahui relevansi patofisiologis dari TGF- β terhadap proses fibrosis dan potensi MO, membuka peluang investigasi efek hepatoprotektif MO melalui TGF- β 1.

TUJUAN PENELITIAN : Mengetahui peran *Moringa oleifera* dalam menghambat fibrogenesis hati melalui penurunan TGF- β 1.

METODE: Penelitian eksperimental pada 30 ekor tikus jantan (*Rattus norvegicus* strain wistar) dibagi 5 kelompok yaitu K-negatif (injeksi Normal saline), K-positif (induksi CCL4), KP1 (CCL4 + MO 150 mg), KP2 (CCL4 + MO 300 mg), KP3 (CCL4 + MO 600 mg). Pewarnaan dengan *immunofluoresence*. Dilakukan analisis terhadap derajat fibrosis dengan uji beda *Kruskal Wallis* dan koefisien |Ri-Rj| 5%, ekspresi TGF- β 1 dengan uji beda *Oneway Anova* dan *Post Hoc LSD* 5%.

HASIL: Pada derajat fibrosis, didapatkan seluruh sampel K-positif dan KP1 adalah F3, pada KP2 terdapat 1 sampel F2, pada KP2 terdapat 2 sampel F1 dan 4 sampel F4 dengan uji *Kruskal Wallis* menunjukkan perbedaan yang signifikan (p -value = 0,000). Pada ekspresi TGF- β 1, didapatkan rata-rata $\pm$ SD K-negatif 1603.54 ± 178.23 AU, K-positif 2350.61 ± 421.12 AU, KP1 1793.04 ± 286.70 AU, KP2 1897.1 ± 255.21 AU, KP3 1654.09 ± 436.61 AU dengan uji *Anova* didapatkan p -value, 0.005, bila membandingkan K-positif dengan seluruh kelompok, maka didapatkan seluruh p -value < 0.05 , dan bila membandingkan K-negatif dengan KP1, KP2, KP3 didapatkan seluruh p -value > 0.05 . Secara statistik, terbukti bahwa pada seluruh kelompok yang diberikan MO terdapat penurunan yang signifikan.

KESIMPULAN: Terdapat korelasi antara penurunan ekspresi TGF- β 1 terhadap derajat fibrosis hati akibat pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* pada tikus model fibrosis hati.

KATA KUNCI : *Moringa oleifera*, TGF- β , fibrosis hati, fibrogenesis, *immunofluoresence*.



ABSTRACT

BACKGROUND: TGF- β 1 is considered a cytokine which plays an important role in liver fibrogenesis. *Moringa oleifera* (MO), medically, is known for its diverse pharmacological effects including antitumor, antihyperglycemic, anti-inflammatory, antioxidant. Knowing the pathophysiological relevance of TGF- β to the process of fibrosis and the potential for MO, opens up opportunities for investigation of the hepatoprotective effect of MO through TGF- β 1.

OBJECTIVE: Knowing the role of *Moringa oleifera* in inhibiting liver fibrogenesis through a decrease in TGF- β 1.

METHODS: Experimental research on 30 male rats (*Rattus norvegicus* strain wistar) divided into 5 groups namely K-negative (Normal saline injection), K-positive (CCL4 induction), KP1 (CCL4 + MO 150 mg), KP2 (CCL4 + MO 300 mg), KP3 (CCL4 + MO 600 mg). Staining with immunofluorescence. Data analysis degree of fibrosis was performed with Kruskal Wallis test and the coefficient $|R_i - R_j|$ 5%, TGF- β 1 expression with Oneway Anova and Post Hoc LSD 5% difference test.

RESULTS: In the degree of fibrosis, we discovered all samples K-positive and KP1 were F3, KP2 with 1 sample F2, KP2 there are 2 samples F1 and 4 samples F4 with the Kruskal Wallis test showed significant differences (p -value = 0,000). In the TGF- β 1 expression, average $\pm$ SD were K-negative 1603.54 $\pm$ 178.23 AU, K-positive 2350.61 $\pm$ 421.12 AU, KP1 1793.04 $\pm$ 286.70 AU, KP2 1897.1 $\pm$ 255.21 AU, KP3 1654.09 $\pm$ 436.61 AU with Anova calculation the p -value was 0.005, when comparing K-positive with all groups, all p -values were <0.05 , and when comparing K-negative with KP1, KP2, KP3 all p -values were > 0.05 . Statistically, there was a significant decrease in TGF- β in the administration of *Moringa oleifera* at all dosage levels.

CONCLUSION: There is a correlation between decreased TGF- β 1 expression and the degree of liver fibrosis due to *Moringa oleifera* leaf extract in rats liver fibrosis models.

KEYWORDS: *Moringa oleifera*, TGF- β , liver fibrosis, fibrogenesis, immunofluorescence.



DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN KARYA AKHIR	i
PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GRAFIK	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
ABSTRAK	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.3.1. Tujuan Umum	3
1.3.2. Tujuan Khusus	3
1.4. Manfaat Penelitian	4
1.4.1. Manfaat Klinis	4
1.4.2. Manfaat Akademis	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Definisi Fibrosis Hati	5
2.2 Patofisiologi Fibrosis Hati	6



2.2.1. Apoptosis Hepatosit.....	7
2.2.2. Aktivasi sel stellate hati (HSC).....	8
2.2.3 Peranan <i>Transforming growth factor</i> β -1 (TGF- β 1).....	10
2.2.4 Peranan Stress oksidatif.....	16
2.2.5 Peranan Sitokin.....	17
2.3. Efek Fibrogenik Karbon Tetraklorida (CCL ₄).....	18
2.4. Moringa oleifera.....	20
2.4.1. Efek Antioksidan.....	21
2.4.2 Efek Anti-inflamasi dan Imunomodulasi.....	22
2.4.3 Efek Moringa terhadap TGF- β	23
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	
PENELITIAN	25
3.1. Kerangka Teori.....	25
3.2. Penjelasan Kerangka Teori.....	26
3.3 Kerangka Konsep.....	28
3.4. Penjelasan Kerangka Konsep.....	29
3.5. Hipotesis.....	30
BAB IV METODE PENELITIAN	31
4.1 Rancangan Penelitian.....	31
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	32
4.3 Populasi dan Sampel Penelitian.....	32
4.3.1. Populasi Penelitian.....	32
4.3.2. Sampel Penelitian.....	33
4.3.3. Kriteria Sampel.....	33
4.3.3.1. Kriteria Inklusi.....	34



4.3.3.2. Kriteria Eksklusi.....	34
4.4. Variabel Penelitian.....	34
4.4.1. Variabel Bebas.....	34
4.4.2. Variabel perantara.....	34
4.4.3. Variabel Tergantung.....	34
4.5. Alat dan Bahan Penelitian.....	34
4.5.1. Alat.....	34
4.5.2. Bahan.....	35
4.6. Definisi Operasional.....	36
4.7. Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data.....	38
4.7.1. Prosedur Perlakuan Terhadap Tikus.....	38
4.7.2. Pembuatan dan Pemberian CCl ₄	39
4.7.3. Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Moringa Oleifera.....	39
4.7.4. Pembedahan dan Pengambilan Sampel.....	40
4.7.5. Pembuatan <i>Immunofluorescence assay</i> TGF- β 1 dan Pengamatan TGF- β 1 di aHSC.....	40
4.7.6. Bagan Alur Penelitian.....	43
4.8. Uji Analisa Data.....	44
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA.....	44
5.1 Hasil pengamatan fibrosis hati.....	45
5.2 Hasil pengamatan ekspresi TGF- β	47
5.3 Analisa data.....	50
5.3.1 Pengujian asumsi yang melandasi ANOVA.....	50
5.3.2 Pengujian Pengaruh <i>Moringa oleifera</i> Terhadap Ekspresi TGF- β dengan Uji ANOVA.....	52



5.3.3 Pengujian Pengaruh *Moringa oleifera* Terhadap

Fibrosis dengan Uji Kruskal-Wallis

55

BAB VI PEMBAHASAN

58

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

63

7.1 Kesimpulan

63

7.2 Saran

63

DAFTAR PUSTAKA

64

LAMPIRAN

69

Lampiran 1. Uji Asumsi Normalitas

69

Lampiran 2. Uji Asumsi Homogenitas Ragam

70

Lampiran 3. ANOVA dan LSD 5% Pengaruh *Moringa oleifera*

Terhadap Ekspresi TGF- β

71

Lampiran 4. Uji Kruskal-Wallis dan $|R_i - R_j|$ 5% Pengaruh *Moringa oleifera*

Terhadap Derajat Fibrosis

75

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Patogenesis Fibrosis Hati.....	6
Gambar 2.2 Apoptosis hepatosit menginduksi fibrosis hati.....	7
Gambar 2.3 Karakteristik HSC teraktivasi.....	9
Gambar 2.4 TGF- β mediated signalling pathways pada sel hati.....	11
Gambar 2.5. Peran TGF- β pada homeostasis hati.....	14
Gambar 2.6. TGF- β dan penyakit hati.....	14
Gambar 2.7. Stres oksidatif dalam fibrogenesis hati.....	17
Gambar 2.8. Signaling TGF- β terhadap produksi kolagen-I.....	24
Gambar 5.1 Derajat fibrosis Hati F0 Pengecatan MT	
Pembesaran 80x dengan Skala 100 μ m.....	45
Gambar 5.2 Derajat fibrosis Hati F1 Pengecatan MT	
Pembesaran 80x dengan Skala 100 μ m.....	46
Gambar 5.3 Derajat fibrosis Hati F2 Pengecatan MT	
Pembesaran 80x dengan Skala 100 μ m.....	46
Gambar 5.4 Derajat fibrosis Hati F3 Pengecatan MT	
Pembesaran 80x dengan Skala 100 μ m.....	46
Gambar 5.5. Pengamatan immunofluoresence pada pembesaran 200x.....	48
Gambar 5.6 Sampel pada masing-masing kelompok pengamatan	
immunofluoresence pada pembesaran 400x.....	49



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Perlakuan pada hewan coba.....	31
Tabel 5.1 Derajat fibrosis pada tiap kelompok pengamatan.....	45
Tabel 5.2 Karakteristik ekspresi TGF- β . Mean, Standar deviasi, Median.....	50
Tabel 5.3 Uji Asumsi Normalitas	51
Tabel 5.4 Uji Asumsi Homogenitas Ragam.....	51
Tabel 5.5 Pengujian Pengaruh Moringa oleifera Terhadap Ekspresi TGF- β dengan Uji ANOVA dan LSD 5%.....	52
Tabel 5.6 Hasil Pengujian Multiple Comparison LSD 5% Ekspresi TGF- β	53
Tabel 5.7 Pengujian Pengaruh Moringa oleifera Terhadap Derajat Fibrosis dengan Uji Kruskal-Wallis dan $ R_i - R_j $ 5%	55



DAFTAR GRAFIK

Grafik 5.1 Data derajat Fibrosis Hati	47
Grafik 5.2 Histogram Rata-Rata Ekspresi TGF- β	54
Grafik 5.3 Histogram Proporsi Derajat Fibrosis	57



DAFTAR SINGKATAN

CCl3	Trichloromethyl
CCl4	Carbon Tetrachloride
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
co-Smads	common mediator-Smads
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CXCR-3	CXC Receptor-3
CyP450	Cytochrome P450
ECM	Extra Cellular Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent assay
EMT	Ephitelial-mesenchymal transition
FGFs	Fibroblast Growth Factors
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HSCs	Hepatic Stellate Cells
IFN- α	Interferon- α
IFN- γ	Interferon- γ
IGF-I	Insulin Growth Factor-I
IL-17	Interleukin-17
IL-6	Interleukin-6
I-Smad	Inhibitory-Smads
JNK	Janus Kinase
KC	Keratinocyte chemoattractant
LAP	Latent Associated Peptide
LD	Lethal Dose
LTBP	Latent TGF- β Binding Protein
MDA	Malondialdehyde
MMP	Matrix Metallo Proteinase
NF- κ B	Nuclear Factor-KappaB
OMe	O-methoxy
OMe	o-Methoxy
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
	PPAR- γ Peroxisome Proliferato- Activated Receptor γ
ROS	Reactive Oxygen Species
R-Smad	Receptor-mediated Smads
SARA	Smad Anchor for Receptor Activation
TGF- β	Transforming Growth Factor- β



TIMPs Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TNF- α Tumor Necrosis Factor- α
TRAIL TNF- α -Related Apoptosis Induced Ligand
T β RI TGF- β Receptor I
T β RII TGF- β Receptor II
T β RIII TGF- β Receptor III
VDR Vitamin-D Receptor
 α -SMA α -Smooth Muscle Actin



BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Fibrosis hati yang berakhir pada kondisi sirosis merupakan penyebab kematian lebih 1 juta penduduk diseluruh dunia tiap tahunnya (Mokdad AA, et al. 2014). Fibrosis hati adalah akumulasi berlebihan protein matriks ekstraseluler termasuk kolagen yang terjadi pada sebagian besar jenis penyakit hati kronis. Fibrosis hati lanjut menyebabkan sirosis, gagal hati, dan hipertensi portal dan seringkali membutuhkan transplantasi hati. Fibrosis hati secara historis dianggap sebagai proses pasif dan ireversibel karena rusaknya parenkim hati dan pengantiannya dengan jaringan yang kaya kolagen. Namun, diawal Laporan klinis awal pada 1970-an menunjukkan bahwa fibrosis hati lanjut berpotensi *reversible*. Dan penelitian terus berkembang ketika sel *stellate* hati (HSC; *hepatic stellate cell*), yang sebelumnya dikenal sebagai liposit, sel Ito, atau sel perisinusoidal, diidentifikasi sebagai sel penghasil kolagen utama dalam hati. Sel HSC ini diaktifkan oleh sitokin fibrogenik diantaranya adalah TGF- β 1 (Bataller, R., dan Brenner, D. A, 2005).

Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) dianggap sebagai sitokin yang memegang peranan penting dalam fibrogenesis hati. TGF- β 1 disekresi oleh sel sinusoidal endotelial, sel Kupffer, trombosit, maupun hepatosit yang rusak, dan juga dihasilkan oleh hepatic stellate cell (HSC). Kadar TGF- β 1 yang tinggi, sebagai konsekuensi dari kerusakan hati kronis, mengakibatkan aktivasi sel-sel stellata menjadi myofibroblast, meningkatkan ekspresi gen matrix, mengurangi degradasi matrix yang diperankan oleh matrix metalloproteinase (MMP) dan meningkatkan inhibitor spesifik (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs),



menginduksi apoptosis hepatosit dan menghambat proliferasi sel hati dan kematian sel hepatosit yang massif yang akan berkontribusi terjadinya fibrosis hati dan kemudian menjadi sirosis (Fabergat I, 2016). Mengetahui relevansi patofisiologis dari TGF- β terhadap proses fibrosis hati telah membuka peluang pendekatan terapi target terhadap TGF- β sebagai salah satu strategi pengobatan fibrosis hati.

Moringa oleifera atau di Indonesia dikenal dengan pohon kelor, merupakan tanaman yang tumbuh di banyak negara tropis dan sub-tropis. Tanaman ini telah terbukti menjadi sumber fitonutrien yang sangat baik dan karenanya menjadi nutrisi dan obat untuk manusia dan hewan. Tanaman ini mempunyai potensi *cost-effective* sebagai sumber nutrisi dan obat, mudah didapat dan kaya sumber multi-vitamin (vitamin A, B dan C), protein, kalsium, kalium dan memiliki kombinasi unik zeatin, kuersetin, sitosterol, dan kaempferol (Koul B., dan Chase N, 2015). Secara medis, berbagai bagian *Moringa oleifera* secara umum dikenal karena efek farmakologisnya yang beragam termasuk antitumornya (Guevara et al., 1999; Bharali et al., 2003), efek antihiperlikemik (Anwer et al., 2007) dan efek anti-inflamasi (Mahajan dan Mehta, 2008). Selain itu, ekstrak *Moringa oleifera* telah terbukti memiliki aksi antioksidan kuat in vivo (Kumar dan Pari, 2003; Arabshahi et al., 2007) dan investigasi efek hepatoprotektif dari ekstrak etanol biji *Moringa oleifera* telah dilakukan terhadap fibrosis hati yang diinduksi CCl₄ pada tikus jantan (Hamza A., 2010).

Berdasarkan pemahaman peranan TGF- β terhadap proses fibrogenesis serta potensi *Moringa oleifera* tersebut, kami tertarik untuk meneliti pengaruh pemberian *Moringa oleifera* pada ekspresi TGF- β terhadap fibrosis hati.



1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas maka pada penelitian ini kami mengajukan rumusan masalah:

1. Apakah ekspresi TGF- β 1 di aHSC pada tikus model fibrosis hati lebih tinggi bila dibandingkan dengan tikus normal?
2. Apakah ekspresi TGF- β 1 di aHSC pada tikus model fibrosis hati yang diberikan *Moringa Oleifera* lebih rendah bila dibandingkan dengan tikus model fibrosis hati yang tidak diberikan *Moringa Oleifera*?
3. Apakah terdapat korelasi antara penurunan ekspresi TGF- β 1 terhadap derajat fibrosis hati akibat pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* pada tikus model fibrosis hati?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui peran *Moringa oleifera* terhadap ekspresi TGF- β 1 dalam menghambat fibrogenesis hati.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengukur dan membandingkan ekspresi TGF- β 1 si aHSC pada kelompok perlakuan tanpa diberi ekstrak daun *Moringa oleifera* dengan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun *Moringa oleifera* terhadap fibrosis hati pada tikus model fibrosis.
2. Menilai derajat fibrosis hati pada kelompok perlakuan tanpa diberi ekstrak daun *Moringa oleifera* dengan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun *Moringa oleifera* terhadap fibrosis hati pada tikus model fibrosis.
3. Menghitung hubungan penurunan ekspresi TGF- β 1 terhadap derajat fibrosis hati pada tikus model fibrosis.



1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Klinis

Sebagai terapi alternatif dalam tatalaksana pasien dengan fibrosis hati.

1.4.2 Manfaat Akademis

- Mengetahui peran *Moringa oleifera* terhadap ekspresi TGF- β 1 dalam menghambat fibrogenesis hati
- Sebagai kajian untuk penelitian lebih lanjut.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Definisi Fibrosis Hati

Fibrosis hati adalah akumulasi berlebihan protein matriks ekstraseluler (ECM) termasuk kolagen yang terjadi pada sebagian besar penyakit hati kronis.

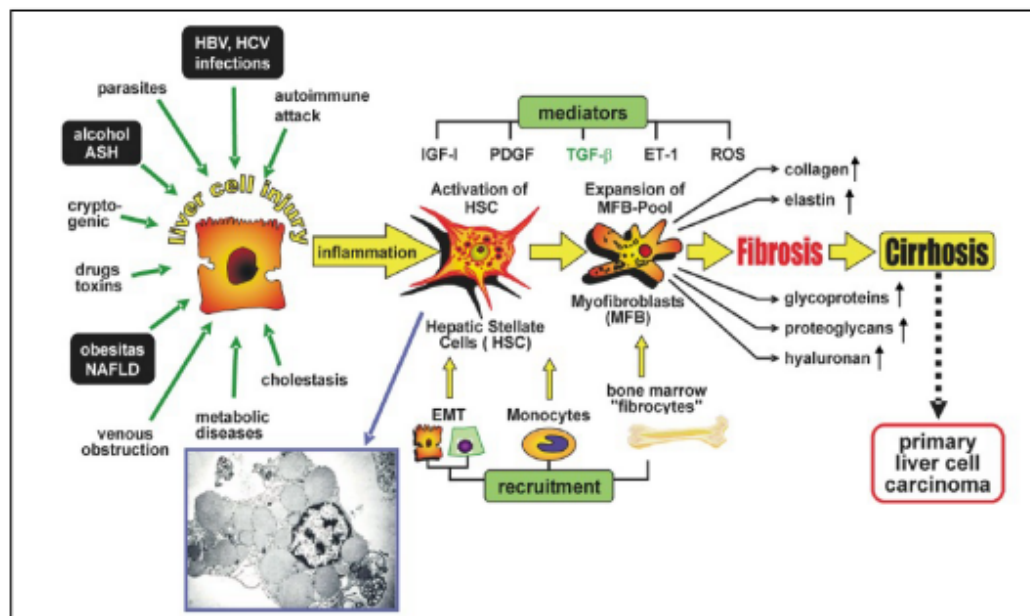
Sedangkan sirosis hati merupakan tahap akhir dari suatu proses difus fibrosis hati progresif yang ditandai oleh distorsi arsitektur hati dan pembentukan nodul regeneratif (Pinzani, M., et al., 2011)

Beberapa studi yang dilakukan dalam 25 tahun terakhir ini menjelaskan berbagai macam mekanisme selular dan molekular yang bertanggung jawab terhadap fibrogenesis hati. Dalam terminologi biologi, fibrogenesis merupakan sebuah proses yang dinamis yang ditandai dengan akumulasi ekstraselular matriks protein yang berkelanjutan yang berhubungan dengan degradasi dan remodeling yang berkelanjutan dalam konteks kerusakan jaringan kronik. Fibrosis merupakan hasil yang statis ketika degradasi tidak sempurna. Mekanisme dasar yang menyebabkan fibrosis hati adalah aktivasi kronik reaksi penyembuhan jejas.

Proses penyembuhan jejas secara normal ditandai oleh terjadinya kaskade biologis yang melibatkan sel dan faktor terlarut yang bertujuan untuk mengatasi jejas terhadap jaringan. Pada terminologi umum, kejadian ini dan efektor merupakan sebuah kelanjutan dari fase sebelumnya. Proses ini memiliki efisiensi yang tinggi pada kerusakan jaringan akut tunggal, dapat berkembang menjadi jaringan parut pada kerusakan jaringan kronik. Pada terminologi lain, deposisi matriks fibrillar daripada regenerasi jaringan yang terorganisasi adalah pilihan terbaik untuk mempertahankan kontinuitas jaringan. Modifikasi komposisi matriks ekstraselular (terutama kolagen tipe I dan III) tidak hanya memiliki implikasi

mekanik dan fisik, namun juga biokimia, sehingga berkontribusi terhadap modulasi beberapa fungsi selular (pertumbuhan, migrasi, ekspresi gen) melalui interaksi langsung antara komponen matriks ekstraselular dan molekul sel adhesi, serta melalui fungsi reservoir mediator proinflamasi dan profibrogenik (Pinzani, 2015).

2.2 Patofisiologi fibrosis hati



Gambar 2.1: Patogenesis Fibrosis Hati. Fibrogenesis dimulai dengan terjadinya nekrosis dan apoptosis hepatosit dan inflamasi HSC, terjadi transdiferensiasi menjadi miofibroblas yang akan meningkatkan ekspresi dan sekresi ECM. Mediator fibrogenik adalah TGF-β, PDGF, IGF-I, endotelin-I (ET-I) dan pelepasan ROS (Gressner AM, et al., 1997)

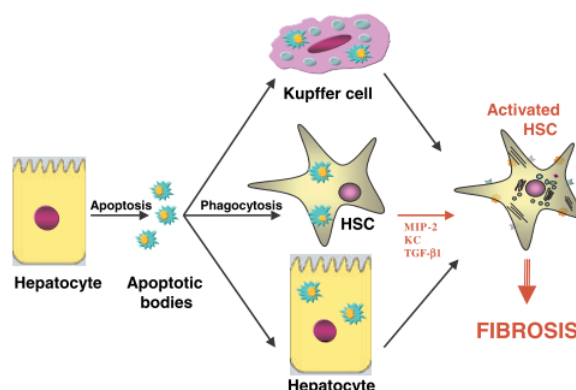
Terjadinya fibrosis hati disebabkan adanya aktivasi dari sel *stellate* hati (Hepatic Stellate Cell [HSC]). Aktivasi ini dipicu oleh faktor pelepasan (ROS dan sitokin) yang dihasilkan hepatosit yang mengalami apoptosis dan sel kuffer. Selain itu, mereka juga melepaskan faktor terlarut lainnya (*tumor necrosis factor-α* [TNF-α], *fibroblast growth factor* [FGF], TGF-β, PDGF, IGF-I, endotelin-I (ET-I) yang akan memperkuat proses aktivasi HSC. Pada kondisi sel *stellate* yang tenang (*quiescent*) secara normal menghasilkan matrix ekstraselular (ECM) dalam jumlah sedikit tetapi dalam kondisi teraktivasi akan menghasilkan matrix ekstraselular



(ECM) yang telah termodifikasi di *Disse's space* dalam jumlah yang banyak. Pembentukan ECM disebabkan adanya pembentuk jaringan yang mirip miofibroblas (*myofibroblast-like cell*) bersifat kontraktile, proinflamasi dan fibrogenik yang dihasilkan sel stellate. Akumulasi ECM menghasilkan peningkatan sintesis dan berkurangnya degradasi ECM, yang berakhir pada fibrosis hati (Bateller, R., Brenner DA, 2005).

2.2.1 Apoptosis Hepatosit

Dengan berbagai sebab yang menyebabkan cedera hati, kerusakan hepatosit akan memicu peradangan dan fibrogenesis di hati. Hepatosit lebih rentan daripada sel-sel lain terhadap reagen toksik, termasuk alkohol, asam empedu dan infeksi virus serta hepatosit merupakan sel yang dapat mengaktifkan kematian sel-sel sebagai respons terhadap cedera yang bersifat *irreversible*. Hepatosit yang apoptosis akan mengalami fragmentasi genom DNA dan pembentukan *apoptotic bodies*, yang dapat difagositosis oleh makrofag dan sel Kupfer (Canbay A, et al., 2005).



Gambar 2.2. Apoptosis hepatosit menginduksi fibrosis hati. Sebagai respon terhadap cedera, apoptosis hepatosit akan mengalami fragmentasi DNA dan pembentukan *apoptosis bodies*, yang difagositosis oleh sel Kupffer, sel stelata hati (HSC) atau sel hepatosit yang sehat. Sel-sel Kupffer dan HSC akan melepaskan sitokin-sitokin protein (TGF-β1, MIP-2 dan KC) yang memicu aktivasi HSC dan produksi kolagen tipe I (Kisseleva, T., & Brenner, D. A, 2007)



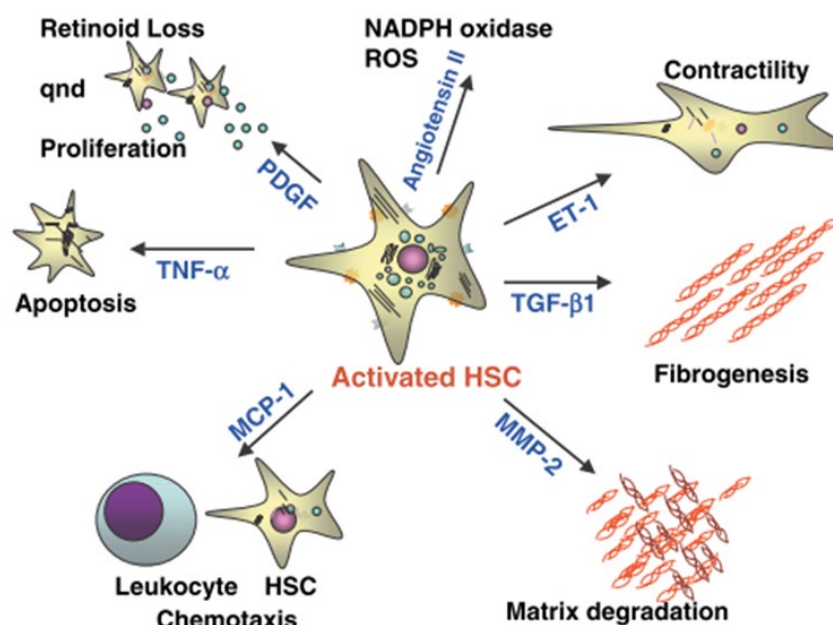
Kemungkinan mekanisme terjadinya apoptosis hepatosit diantaranya : *death receptor-mediated pathway* atau jalur yang tergantung organel intrinsik.

Jalur yang terakhir ini disebabkan oleh permeabilisasi lisosom dan pelepasan cathepsin B ke dalam sitoplasma, yang menyebabkan kerusakan mitokondria dan kematian hepatosit berikutnya. Sebaliknya, kerusakan hepatosit dengan jalur *death receptor-mediated pathway* adalah mekanisme umum dari apoptosis hepatosit dan sering diatur di hati. Fas / CD95 dan TNFR-1 memiliki aktivitas pro-inflamasi dan dapat secara langsung merangsang ekspresi sitokin dan kemokin serta perekrutan neutrofil. Selanjutnya hepatosit yang cedera akan melepaskan ROS dan mengeluarkan faktor profibrogenik (CXC chemokines, KC dan MIP-2), yang pada akhirnya akan mengaktifkan HSC dan sel-sel yang memproduksi kolagen serta menginduksi perekrutan sel-sel inflamasi ke lokasi cedera. HSC yang telah teraktivasi akan mengeluarkan TGF- β 1, MIP-2 dan KC, serta CXCL1, yang akan memperburuk efek hepatotoksik dan meningkatkan kerusakan hepatosit dan produksi kolagen (Stefanovic L, et al., 2005).

2.2.2 Aktivasi sel stellate hati (HSC)

Dalam keadaan sel hati normal, HSC yang tenang (*quiescent*) berada di ruang Disse (*space of Disse*), berfungsi sebagai penyimpanan utama vitamin A. Mereka mengekspresikan PPAR γ , SREBP-1c, dan leptin dan berbagi beberapa karakteristik adiposit. Sebagai respon terhadap cedera hati, HSC akan teraktivasi, mengalami perubahan fungsi dan morfologis dan menjadi sumber utama produksi ECM. HSC yang teraktivasi dalam prosesnya memproduksi kolagen yang dipicu oleh sitokin-biokimia profibrogenik yang dilepaskan dari sel-sel hepatosit, makrofag, dan Kupffer yang rusak, di mana TGF- β 1 adalah yang paling poten, dan sel-sel inflamasi. *Platelet-derived growth factor (PDGF)*, terutama yang diproduksi oleh sel Kupffer, juga memainkan peran penting dalam aktivasi HSC.

HSC yang teraktivasi akan kehilangan *lipid droplets* dan menjadi fenotip myofibroblastik, meningkatkan kemampuan kontraktil dan berdiferensiasi menjadi sel-sel penghasil kolagen tipe I, serta mengekspresikan marker miogenik (aktin-otot polos, c-mub dan *myocyte enhancer factor-2*).



Gambar 2.3 Karakteristik HSC teraktivasi. Respon terhadap rangsangan profibrogenik, sel stellate hati (HSC) yang teraktivasi kehilangan lipid droplets dan berubah menjadi fenotip miofibroblastik, meningkatkan kemampuan kontraktil dan berdiferensiasi menjadi sel-sel penghasil tipe I kolagen. HSC yang teraktivasi menginduksi perekrutan limfosit dan mengganggu degradasi matriks. HSC yang teraktivasi akan mengalami selama resolusi fibrosis hati (Kisseleva, T., & Brenner, D. A, 2007).

Namun, fungsi HSC yang diaktifkan tidak terbatas pada produksi kolagen saja. Studi terbaru menunjukkan bahwa HSC berperan penting dalam reaksi imun pada hati yang cedera. HSC yang teraktivasi akan mengeluarkan sitokin inflamasi (seperti TGF- β , MCP-1, RANTES, IL-10, IL-8) dan pengaturan terhadap *adhesion molecules* (integrin, VCAM-1, ICAM-1), yang memicu terhadap perekrutan dan aktivasi limfosit. *Cultured HSC* mengekspresikan antigen permukaan HLA-II, CD40 dan CD80 dan menginduksi respon alogenetik dalam sel T, hal ini



menunjukkan bahwa HSC juga terlibat dalam presentasi antigen. HSC juga dapat mengekspresikan CD1b dan CD1c, antigen yang terlibat dalam presentasi lipid dan glikolipid ke imun sistem. (Batallar R dan Brenner DA., 2005).

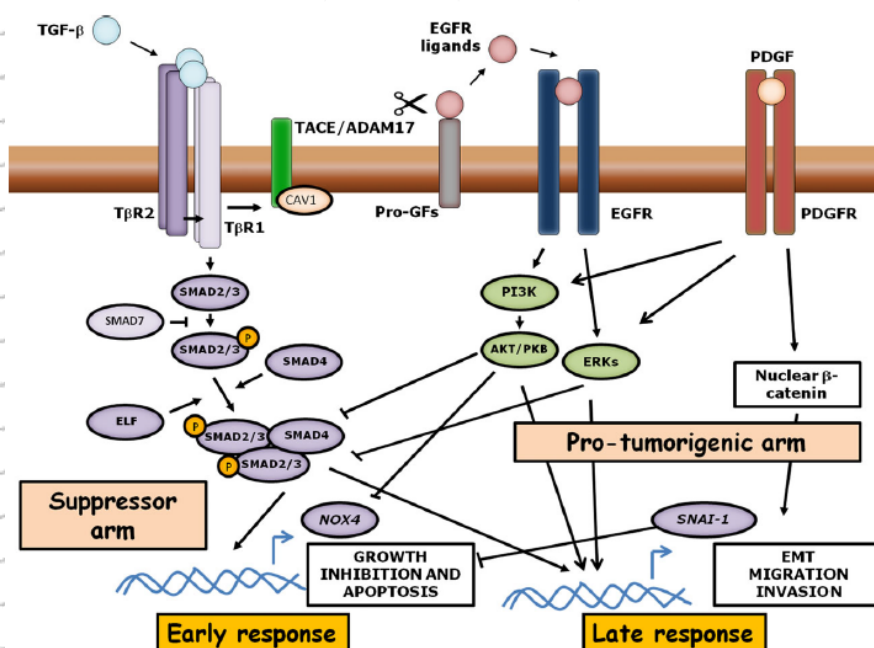
2.2.3 Peranan *Transforming growth factor* β -1 (TGF- β 1)

Transforming growth factor- β (TGF- β) disintesis sebagai proform nonaktif, berasama dengan protein LAP (Latency Associated Peptide) dan LTBP (Latent TGF- β Binding Protein) akan membentuk suatu bentuk kompleks dengan mengalami pembelahan proteolitik oleh endopeptidase furin untuk menghasilkan dimer TGF- β yang matang. Tiga isoform TGF- β (β 1, β 2 dan β 3) telah diidentifikasi, tetapi hanya TGF- β 1 yang dikaitkan dengan fibrogenesis hati (Batallar R dan Brenner DA., 2005).

TGF- β 1 memainkan peranan penting dalam fibrosis, memediasi *cross-talk* antara parenkim, sel-sel inflamasi dan sel-sel yang mengekspresikan kolagen. TGF- β 1, yang dilepaskan oleh sel Kupfer teraktivasi, PDGF dan sel endotel sinusoidal, memicu apoptosis hepatosit, menginduksi aktivasi dan rekrutmen sel inflamasi ke dalam hati yang cedera serta diferensiasi sel-sel yang ada di hati (fibroblas, HSC, sel epitel) menjadi myofibroblas yang memproduksi kolagen. Pada gilirannya, HSC yang teraktivasi itu sendiri dapat mengeluarkan TGF- β 1, meningkatkan kerusakan hepatosit dan infiltrasi limfosit. Hepatosit tidak menghasilkan TGF- β 1 tetapi terlibat dalam aktivasi intraseluler TGF- β 1 laten ke dalam bentuk yang aktif secara biologis.

TGF- β memberi sinyal efek multifungsi pada sel-sel hati dengan mengikat *single transmembrane type I dan type II receptors* (yaitu TbRI dan TbRII) yang memiliki aktivitas serin treonin kinase. Setelah pembentukan kompleks heteromerik yang diinduksi ligan, kinase tipe II mentransfosforilasi reseptor tipe I pada residu serin dan treonin spesifik dalam domain guksin-serin juxtamembrane.

Hal ini mengakibatkan teraktivasi kinase tipe I, di mana sinyal ekstraseluler ditransmisikan melintasi membran, dan pensinyalan intraseluler dimulai oleh fosforilasi protein spesifik, yaitu *receptor-regulated* (R)-SMADs, yaitu SMAD2 dan SMAD3, memiliki keunggulan peran. SMAD2 dan SMAD3 yang teraktivasi, dapat bermitra dengan mediator umum SMAD4, dan kompleks heteromerik ini dapat ditranslokasi ke nukleus dan berfungsi sebagai faktor transkripsi yang mengatur respons transkripsi gen spesifik (jalur kanonik TGF- β) (Fabregat, 2016).



Gambar 2.4. *TGF- β mediated signalling pathways* pada sel hati (Fabregat, 2016)

SMAD4 adalah efektor penting dari pensinyalan intraseluler. Seperti TGF- β , SMAD4 telah dikaitkan dengan penekanan tumor, tetapi juga promosi tumor pada HCC. SMAD bertindak bersama dengan coactivator dan corepressors untuk mengatur ekspresi gen. Baru-baru ini, *orphan receptor* NR4A1 ditemukan bertindak sebagai inhibitor endogen jalur TGF- β , dengan merekrut kompleks penekan ke gen target TGF- β , dengan demikian melawan terjadinya fibrosis hati yang diinduksi TGF- β (dan jaringan lain). Mekanisme baru dimana TGF- β



memberikan efek selulernya dengan mengubah respons genom terus ditemukan.

TGF- β baru-baru ini terbukti menginduksi perubahan genom luas dalam metilasi

DNA, sehingga memungkinkan perubahan stabil dalam subpopulasi sel kanker

hati. Aktivasi RNA-ATB non-coding panjang oleh TGF- β di HCC memiliki peran

efektor yang kuat dalam mediasi invasi dan metastasis. Selain itu, represi miR-122

dalam sel stellate hepatik (HSC) oleh TGF- β penting untuk respon profibrotiknya

pada sel-sel ini (Fabregat, 2016)

Untuk berfungsi sebagai faktor transkripsi, SMAD perlu berinteraksi dengan

DNA-binding transcription factors. SMAD2 tidak dapat mengikat langsung ke DNA,

dan afinitas SMAD3 untuk DNA lemah. Tindakan TGF- β yang sangat kontekstual

pada tipe sel yang berbeda sebagian dijelaskan oleh banyak faktor transkripsi

yang berinteraksi SMAD yang telah diidentifikasi, yang seringkali diatur oleh sinyal

ekstraseluler. Ini memberikan dasar mekanistik dimana, aktivitas SMAD dapat

dikontrol dengan hati-hati (Fabregat, 2016)

Selain jalur SMAD, reseptor TGF- β juga dapat memulai apa yang disebut

respons pensinyalan non-SMAD di hati, melalui interaksi dengan jalur alternatif

lain termasuk kinase MAP, phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT, Ras dan

Rho-like small GTPase, antara lain (jalur noncanonical TGF- β). Jalur ini dan

komunikasi silang mereka dengan jalur SMAD juga sedang diselidiki lebih banyak

dalam sel hati. TGF- β adalah bagian dari keluarga besar dari 33 protein yang

terkait secara struktural dan fungsional, yang juga termasuk aktivin dan *bone*

morphogenetic proteins (BMPs). Activin A dan B, yang sangat diekspresikan pada

peradangan akut dan kronis, muncul sebagai mediator penting dari fibrosis hati

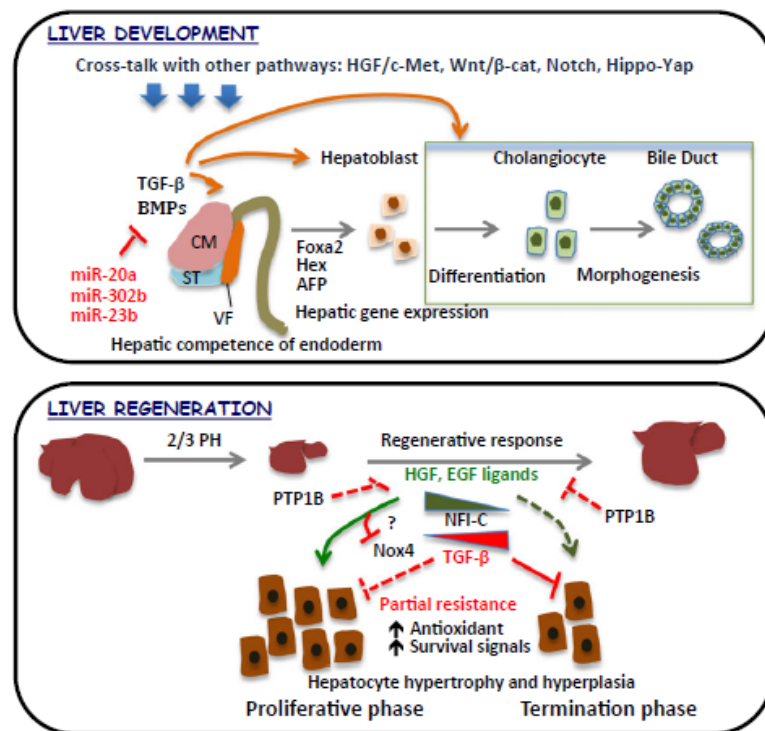
(dan jaringan lain). BMP9, yang memiliki ekspresi hati tinggi dan selektif, sedang

diselidiki secara aktif. Baru-baru ini terbukti memiliki efek pro-onkogenik pada sel



tumor hati; BMP9 merangsang kelangsungan hidup sel kanker hati melalui aktivasi p38MAP kinase (Fabregat, 2016).

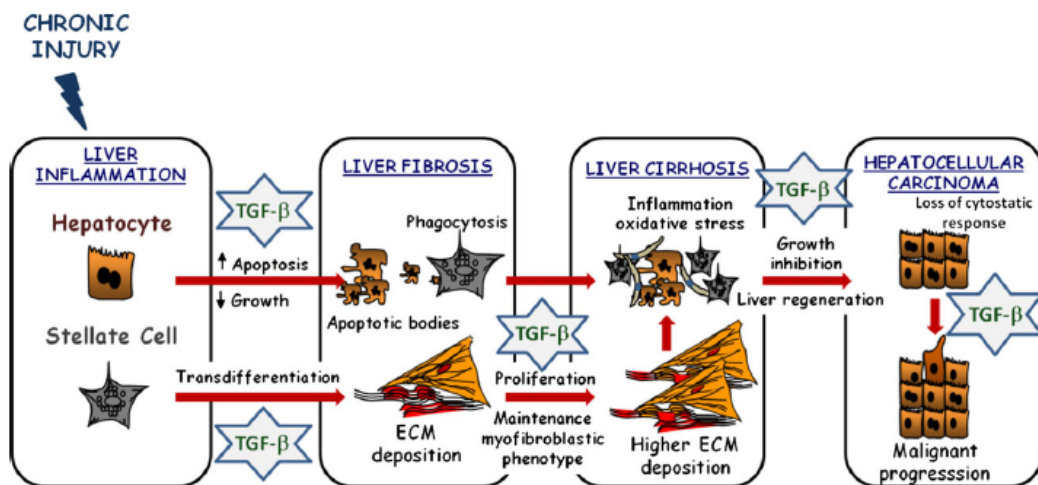
TGF- β diakui sebagai sitokin profibrogenik karena perannya dalam aktivasi HSC dan produksi matriks ekstraseluler. Efek fibrogenik kunci TGF- β terutama dimediasi melalui aktivasi HSC, produsen utama matriks ekstraseluler selama fibrosis hati. Menariknya, berbagai fungsi telah dikaitkan dengan SMAD2 dan SMAD3 di HSC; SMAD2 ditemukan untuk melawan ekspresi kolagen yang diinduksi TGF- β / SMAD3. Selain itu, ada kohort mediator fibrotik *downstream* TGF- β , yang paling penting adalah NOX4 dan faktor pertumbuhan jaringan ikat. Migrasi dan proliferasi adalah fitur penting dari HSC yang teraktivasi, dan setidaknya sebagian diinduksi oleh TGF- β melalui berbagai mekanisme. Sebagai contoh, migrasi HSC yang diinduksi TGF- β dimediasi oleh pensinyalan guanosit trifosfat (Rho GTPase). Aktivasi ekspresi reseptor TGF- β yang diturunkan trombosit dan induksi stres oksidatif oleh TGF- β memediasi tindakan proliferasi TGF- β pada HSC. miRNA juga telah diamati dalam regulasi HSC yang dimediasi TGF- β . Sebagai contoh, miR-29 memediasi regulasi fibrosis hati dan membentuk bagian dari nexus pensinyalan yang melibatkan downregulasi yang bergantung pada TGF- β dan NF- κ B, anggota keluarga miR-29 di HSC, dengan upregulasi selanjutnya dari gen matriks ekstraseluler (Fabregat, 2016)



Gambar 2.5. Peran TGF-β pada homeostasis hati (Fabregat, 2016)

TGF-β juga menurunkan miR-30c dan miR-193 dalam HSC, karenanya memodifikasi efeknya pada remodeling matriks ekstraseluler, proses penting selama fibrosis hati. Yang penting, menjadi jelas bahwa TGF-β juga berpartisipasi dalam pengembangan fibrosis melalui pensinyalan dalam jenis sel hati lainnya, seperti hepatosit dan sel progenitor hati. Sebagai contoh, telah digunakan sel dengan overekspresi spesifik SMAD7 (regulator negatif yang diketahui pensinyalan TGF-β dengan mengganggu fosforilasi SMAD2 / SMAD3) pada tikus transgenik untuk menunjukkan bahwa menumpulkan sinyal TGF-β pada hepatosit menurunkan gangguan hepatosit, kerusakan hati dan fibrogenesis. Menariknya, pensinyalan TGF-β pada hepatosit di bawah tekanan metabolisme memediasi kematian hepatosit dan akumulasi lipid, proses yang membutuhkan pensinyalan SMAD dan produksi spesies oksigen reaktif, yang mengarah pada pengembangan steatohepatitis nonalkohol (Fabregat, 2016).

Regulator yang berbeda dari jalur penting ini baru-baru ini diidentifikasi, misalnya, *vasodilator-stimulated phosphoprotein*, *platelet-derived growth factor receptor- α* dan tunas tanpa hambatan oleh benzimidazoles-1 kinase, yang dapat memodulasi TGF- β *signalling* secara langsung melalui pembentukan kompleks dengan reseptor TGF- β , atau *lipopolysaccharide*, yang memodulasi pensinyalan TGF- β secara tidak langsung dengan membuat kepekaan HSC ke TGF- β melalui downregulasi BAMBI, sebuah reseptor umpan TGF- β transmembran. Selain itu, regulator tersebut dapat diatur lebih lanjut melalui mekanisme yang berbeda. Misalnya, SMAD7 dapat diatur melalui mekanisme berbasis epigenetik atau miRNA, menghasilkan peningkatan yang stabil dalam kompleksitas jalur ini (Fabregat, 2016)



Gambar 2.6. TGF- β dan penyakit hati (Fabregat, 2016)

Perkembangan fibrosis hati dikaitkan dengan penghambatan degradasi matriks karena adanya penghambatan MMP yang diproduksi oleh makrofag (sebagian besar MMP-8 dan MMP-13) dan peningkatan regulasi *tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1* (TIMP1), yang merupakan penghambat alami MMP.

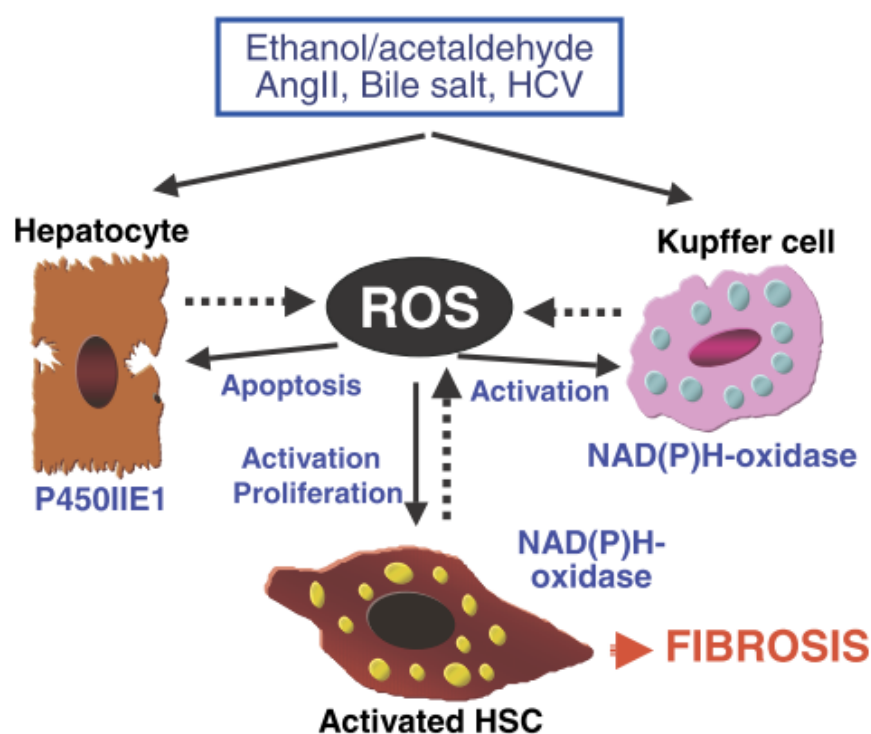
TGF- β 1 sangat terlibat dalam regulasi remodeling ECM. Studi yang telah



dilakukan terhadap tikus transgenik, di mana kadar plasma TGF- β 1 dapat diatur secara kimia, dengan mengamati langsung hubungan TGF- β 1 dengan penghambatan MMP serta peningkatan regulasi ekspresi TIMP1 telah menunjukkan bahwa perkembangan fibrosis hati dapat dihentikan dengan "mematikan" TGF- β 1 produksi (Ueberham E, et al., 2003).

2.2.4 Peranan Stress oksidatif

Stres oksidatif memainkan peran penting dalam fibrogenesis hati. Perkembangan stres oksidatif dikaitkan dengan peningkatan ROS. ROS yang dihasilkan diantaranya superoksida, hidrogen peroksida, radikal hidroksil dan berbagai produk reaksi yang dianggap berbahaya pada kehidupan aerob (Siegmund SV dan Brenner DA, 2005). Hepatosit yang rusak, dan sebagian sel Kupffer teraktivasi dan neutrofil, berperan sebagai sumber utama ROS pada tahap awal fibrosis hati. ROS yang berasal dari sitokrom hepatosit P450 2E1 akan menstimulasi HSC secara parakrin melalui aktivasi pensinyalan redox-sensitive intraseluler yang mengakibatkan peningkatan produksi kolagen. HSC yang teraktivasi, pada gilirannya, juga dapat menghasilkan ROS dari NADPH oksidase (sumber utama ROS dalam sel HSC dan Kupffer). Sebagai catatan yang penting, telah banyak bukti yang menunjukkan antioksidan memiliki efek perlindungan pada fibrosis hati yang dimediasi ROS. Selain itu, beberapa scavenging-enzyme ROS, seperti sistem superoksida dismutase (SOD1, SOD2 dan SOD3) juga terlibat dalam pencegahan fibrosis hati (Batallar R dan Brenner DA., 2005; Svegliati-Baroni G., et al., 2001).



Gambar 2.7. Stres oksidatif dalam fibrogenesis hati. Cedera hati, yang disebabkan oleh etanol, Ang II, garam empedu atau virus hepatitis C (HCV), menghasilkan peningkatan spesies oksigen reaktif (ROS). Dalam hepatosit, ROS berasal dari sitokrom P450IIE1, dalam sel Kupffer dan sel stelata hepatik, ROS diproduksi akibat berkurangnya nikotinamid adenin dinukleotida fosfat (NADPH) oksidase. ROS menginduksi apoptosis hepatosit, aktivasi sel Kupffer dan sel-sel stelata hepatik, dan menyebabkan fibrosis hati (Kisseleva, T., & Brenner, D. A, 2007).

2.2.5 Peranan sitokin

Respon imun yang tergantung sitokin diatur oleh sel T helper tipe 1 (Th1) dan T helper 2 (Th2). Sel Th1 mensekresikan sitokin interleukin (IL) -2, TNF- α , interferon (IFN) dan memediasi "imunitas seluler", sedangkan sel Th2, yang bertanggung jawab untuk "imunitas humoral", menghasilkan IL-4, IL-6, IL-10 dan TGF- β 1. Disregulasi homeostasis Th1 / Th2 telah dikaitkan dengan sejumlah kondisi patologis. Penelitian yang menggunakan berbagai tikus yang kekurangan sitokin jelas mengaitkan fibrosis hati dengan respons Th2. Mencit dengan defisiensi TGF- β 1 (TGF- β 1^{-/-}), suatu sitokin yang memicu sinyal-sinyal profibrogenik yang kuat, jauh lebih rentan terhadap fibrosis hati daripada tikus tipe liar. TGF- β 1 memediasi fungsi biologisnya melalui Smad3, molekul pensinyalan



hilir yang terlibat dalam patogenesis fibrosis hati. Fibrogenesis hati dapat juga dipicu oleh jalur independen TGF- β 1 / Smad3. Oleh karena itu, ablasi IL-4, sitokin pro-brogenik kuat lainnya, dan IL-13, sebuah sitokin yang memiliki banyak aktivitas fungsional dengan IL-4, menghasilkan pelemahan fibrosis hati pada IL-4 - / - (defisiensi IL-4) dan IL-13 - / - (defisiensi IL-13) pada tikus yang terinfeksi schistosomiasis. Berbeda dengan sifat dasar Th2, IL-6 memiliki sifat sitokin antifibrogenik. IL-6 berpartisipasi dalam remodeling jaringan karena induksi transkripsi matriks metalloproteinase (MMP)-13. IL-6 - / - (defisiensi IL-6) pada tikus menunjukkan aktivitas kolagenolitik rendah dan akan terjadi proses fibrosis yang lebih berat. Fibrosis hati akan meningkat pada tikus dengan IL-10 - / - (defisiensi IL-10), karena IL-10 memediasi efek immunosupresif yang kuat dan bekerja sama dengan sitokin Th1. IFN-g, sebuah sitokin Th1 dengan aktivitas anti fibrogenik yang nyata, menekan sekresi IL-13 dan TGF- β 1 untuk menurunkan produksi kolagen. Seperti yang diharapkan, penghapusan genetik IFN-g mempercepat terjadinya fibrosis hati pada tikus IFN-g - / -. Efek anti fibrogenik dari IFN-g berkaitan dengan NOS2, suatu nitrat oksida sintase yang memiliki fungsi protektif dan antiinflamasi. Oleh karena itu, fibrosis hati meningkat pada NOS2 - / - (Kisseleva, T., & Brenner, D. A, 2007).

2.3 Efek Fibrogenik Karbon Tetraklorida (CCL₄)

Karbon tetraklorida dapat digunakan sebagai obat penginduksi hepatotoksik. Parasetamol (asetaminofen) dan ethanol merupakan penyebab paling sering kerusakan hati yang dimetabolisme oleh *cytochrome P450 dependent monooxygenase* menjadi metabolit yang reaktif. CCL₄ merupakan zat organik yang digunakan secara luas sebagai bahan pembersih. CCL₄ bersifat



hepatotoksik bergantung pada dosis yang menginduksi kerusakan hati akut dan kronis hingga menyebabkan fibrosis (Murphy, 2002).

Karbon tetraklorida akan dimetabolisme dan menginduksi kerusakan hati. Aktivasi metabolisme diperankan terutama oleh enzim Cyp450 2E1 di reticulum endoplasmic hapatosit. Melalui mekanisme ini, radikal CCL_3 dan $\text{CCL}_{10}\text{O}_2$ akan dibentuk yang nantinya berikatan kovalen dengan protein, lipid dan asam nukleat kemudian menginduksi kerusakan hati dan menginisiasi peroksidasi lipid (Murphy, 2002; Roderfeld, 2006).

Peroksidasi lipid di membrane sel melalui ROS, seperti *superoxide radical* (O_2^-) dan hydroxyl radical ($\text{OH}^\cdot$) dan menimbulkan kerusakan komponen sel dan kematian sel. Saat ini CCL_4 tidak hanya sebagai penyebab primer kerusakan hati tetapi juga apoptosis hepatosit (Roderfeld, 2006).

Pada penelitian sebelumnya CCL_4 menimbulkan kerusakan hati pada tikus model fibrosis termasuk nekrosis hepatosit, steatosis dan inflamasi. Dosis rendah dan pemberian jangka panjang CCL_4 dapat menginduksi fibrogenesis hati. Proses terjadinya fibrogenesis membutuhkan waktu setidaknya 8 minggu. CCL_4 diberikan dengan dosis 1 ml/kgBB setiap hari selama 9 minggu. Lama dan dosis pemberian CCL_4 merujuk pada penelitian sebelumnya yaitu *Establishment of a Standardized Liver Fibrosis Model with Different Pathological Stage in Rat*.

Dari hasil penelitian tersebut didapatkan adanya fibrosis S1 setelah dilakukan injeksi CCL_4 selama 2-4 minggu. Fibrosis S-2 terbentuk setelah injeksi CCL_4 selama 5-8 minggu dan fibrosis S-3 didapatkan setelah injeksi CCL_4 selama 9-12 minggu, dan fibrosis S-4 terjadi setelah injeksi 13-14 minggu (Gutteridge, 1990).

Hati secara cepat memperbaiki kerusakan akibat CCL_4 . Oleh karena itu tikus dikorbankan dalam 48 jam setelah injeksi terakhir, dimana waktu itu dapat memberikan hasil yang lebih baik untuk mengevaluasi CCL_4 sebagai penyebab



kerusakan hati. Pemberian CCL_4 pada dosis yang lebih tinggi dapat menimbulkan kematian, dimana dosis 5 ml injeksi dapat menimbulkan dosis lethal (Fu, 2008 ; Dhuley, 1997).

2.4 *Moringa oleifera*

Moringa merupakan tumbuhan yang berasal dari Asia dan Afrika, serta paling banyak dibudidayakan di India bagian barat laut, yang merupakan famili Moringaceae. *Moringa* terdiri dari 13 spesies dari daerah tropis dan subtropis, dengan ukuran yang bervariasi dari tumbuhan yang kecil hingga pohon yang besar. Spesies yang paling banyak dibudidayakan adalah *Moringa oleifera* (MO). MO ditanam untuk polongnya yang bergizi, daun dan bunga yang dapat dimakan, dan dapat digunakan sebagai makanan, obat-obatan, minyak kosmetik, atau makanan ternak. Tingginya berkisar dari 5 hingga 10 m (Padayachee, B., Bajinath, H., 2012).

Beberapa penelitian telah menunjukkan efek menguntungkan pada manusia. MO telah dikenal mengandung banyak senyawa bioaktif. Bagian tanaman yang paling sering digunakan adalah daun, yang kaya akan vitamin, karotenoid, polifenol, asam fenolik, flavonoid, alkaloid, glukosinolat, isothiocyanate, tanin dan saponin. Tingginya jumlah senyawa bioaktif mungkin menjelaskan sifat farmakologis daun MO. Banyak penelitian, *in vitro* dan *in vivo*, mengkonfirmasi sifat farmakologis ini. Daun MO sebagian besar digunakan untuk keperluan pengobatan serta nutrisi manusia, karena mereka kaya akan antioksidan dan nutrisi lainnya, yang umumnya kurang pada orang yang tinggal di negara-negara yang belum berkembang. Daun MO telah digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit mulai dari malaria dan demam tifoid hingga hipertensi dan diabetes (Sivasankari, B., *et al.*, 2014).



Akar, kulit kayu, getah, daun, buah (polong), bunga, biji, dan minyak biji MO dilaporkan memiliki berbagai aktivitas biologis, termasuk perlindungan terhadap gastritis, antidiabetik, hipotensi dan efek anti-inflamasi. MO juga telah terbukti meningkatkan fungsi hati dan ginjal dan regulasi hormon tiroid. Daun MO juga melindungi terhadap stres oksidatif, peradangan, fibrosis hati, kerusakan hati, hiperkolesterolemia, aktivitas bakteri, kanker, dan jejas hati (Vergara-Jimenez, *et al.*, 2017)

2.4.1 Efek Antioksidan

Daun MO adalah sumber karoten yang baik dengan potensi pro-vitamin A (Alvarez, R., *et al.*, 2014). Daun MO juga mengandung 200 mg/100 g vitamin C, konsentrasi lebih besar dari apa yang ditemukan pada jeruk. Daun MO juga melindungi tubuh dari berbagai efek buruk radikal bebas, polutan dan racun, dan bertindak sebagai antioksidan. Daun segar MO adalah sumber vitamin E yang baik, dengan konsentrasi yang mirip dengan yang ditemukan dalam kacang. Ini penting karena vitamin E tidak hanya bertindak sebagai antioksidan, tetapi telah terbukti menghambat proliferasi sel (Borel, P., *et al.*, 2013).

Daun MO adalah sumber flavonoid yang baik. Flavonoid utama yang ditemukan pada daun MO adalah myrecetin, quercetin dan kaempferol, masing-masing dalam konsentrasi 5,8 mg/g, 0,207 mg/g, dan 7,57 mg/g. Quercetin ditemukan dalam daun MO kering, pada konsentrasi 100 mg/100 g, sebagai quercetin-3-O-dglucoside (iso-quercetin atau isotrifolin). Quercetin adalah antioksidan kuat, dengan beberapa sifat terapi. Ini memiliki sifat hipolipidemik, hipotensi, dan anti-diabetes pada tikus Zucker obesitas dengan sindrom metabolik. Quercetin dapat mengurangi hiperlipidemia dan aterosklerosis pada kelinci dengan kolesterol tinggi atau diberi makan lemak tinggi. Quercetin dapat



melindungi sel-sel pankreas yang memproduksi insulin dari Streptozotocin (STZ) yang diinduksi stres oksidatif dan apoptosis pada tikus (Coskun, O., et al., 2005).

Karena konsentrasi tinggi antioksidan ada dalam daun MO, mereka dapat digunakan pada pasien dengan kondisi inflamasi, termasuk kanker, hipertensi, dan penyakit kardiovaskular. Karoten yang ditemukan dalam daun MO telah terbukti bertindak sebagai antioksidan. Antioksidan memiliki efek maksimum terhadap kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas hanya ketika dicerna dalam kombinasi. Kombinasi antioksidan yang ditemukan dalam daun MO terbukti lebih efektif daripada antioksidan tunggal, mungkin karena mekanisme sinergis dan peningkatan mekanisme kaskade antioksidan (Tejas, G.H., et al., 2012). Senyawa ini telah terbukti sebagai antioksidan yang efektif, agen antimikroba dan anti-karsinogenik. Properti ini memainkan peran kunci dalam menetralkan radikal bebas, *quenching singlet* atau oksigen triplet, atau penguraian peroksida.

Siddhuraju dan Becker (2003), dalam penelitiannya menemukan bahwa ekstrak daun yang berbeda menghambat 89,7-92,0% peroksidasi asam linoleat dan memiliki aktivitas *scavenger* pada radikal superoksida dengan cara yang tergantung pada dosis dalam sistem asam karoten-linoleat. Iqbal dan Bhanger (2006), menunjukkan bahwa suhu lingkungan dan sifat-sifat tanah memiliki efek signifikan terhadap aktivitas antioksidan daun MO.

2.4.2 Efek Anti-inflamasi dan Imunomodulasi

Ekstrak daun MO menghambat produksi sitokin makrofag manusia (*tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) dan IL-8), yang diinduksi oleh asap rokok dan oleh *lipopolysaccharide* (LPS) (Kooltheat, N., et al., 2014).

Selanjutnya, Waterman et al. (2014) melaporkan bahwa konsentrat MO dan isotiosianat menurunkan ekspresi gen dan produksi penanda inflamasi pada

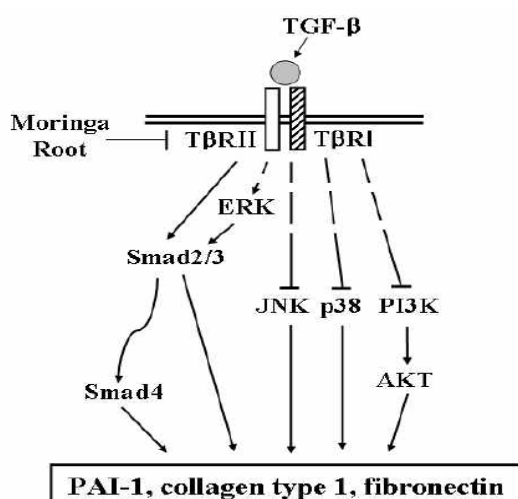


makrofag RAW. Ekstrak daun MO menstimulasi respon imun seluler dan humoral pada tikus immunodefisiensi yang telah diinduksi siklofosamid, melalui peningkatan sel darah putih, neutrofil, dan serum imunoglobulin. Selain itu, quercetin mungkin telah terlibat dalam pengurangan proses inflamasi dengan menghambat aksi *neutral factor kappa-beta* (NF- κ B) dan kejadian hilir yang tergantung NF- κ B berikutnya dan inflamasi. Selanjutnya, pada MO yang difermentasi didapatkan dapat meningkatkan sifat anti-inflamasi MO. Pada penelitian dengan tikus yang diberi makan selama 10 minggu dengan air suling, MO fermentasi dan non-fermentasi, dilaporkan terdapat penurunan kadar mRNA sitokin inflamasi dan pengurangan stres retikulum endoplasma pada hewan yang diberi makan produk fermentasi (Joung, H., et al., 2017).

2.4.3 Efek Moringa terhadap TGF- β

Pada penelitian-penelitian sebelumnya, didapatkan bahwa kadar atau ekspresi TGF- β 1 menurun pada model percobaan yang diberikan *Moringa Oleifera* (MO). Moustafa EM, dan kawan-kawan (2015), dalam percobaannya terhadap fibrosis hati yang diinduksi thioacetamide (TAA) pada tikus albino, mendapatkan kadar serum TGF- β 1 dan TNF- α turun, serta efek penurunannya akan lebih banyak bila ditambahkan dengan radiasi sinar gamma dosis rendah. Pada penelitian lain, Feutsal dan kawan-kawan (2017), terhadap sel Huh7 yang terinfeksi HBV dengan genotip C dan H yang diberikan MO, mendapatkan penurunan ekspresi terhadap CTGF (Connective tissue growth factor) dan TGF- β 1 di sel Huh7. Mereka menduga komponen dalam MO yang berperan penting adalah quercetin karena efek potensialnya dalam meregulasi terhadap keseimbangan stimuli pro- dan antifibrogenik, mengurangi teraktivasi HSC, dan memperbaiki kondisi fibrosis pada hati tikus. Di tenggarai penurunan fibrogenesis diakibatkan aktivitas MO

dalam menghambat fosforilasi TGF- β 1. Dugaan ini berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan Su-Hyun Park dan Young-Chae Chang (2012), pada fibrosis ginjal tikus model, bahwa ekstrak akar MO secara selektif menghambat fosforilasi T β RII yang diinduksi TGF- β dan jalur pensinyalan hilir (diantaranya Smad4), dan fosfo-ERK.



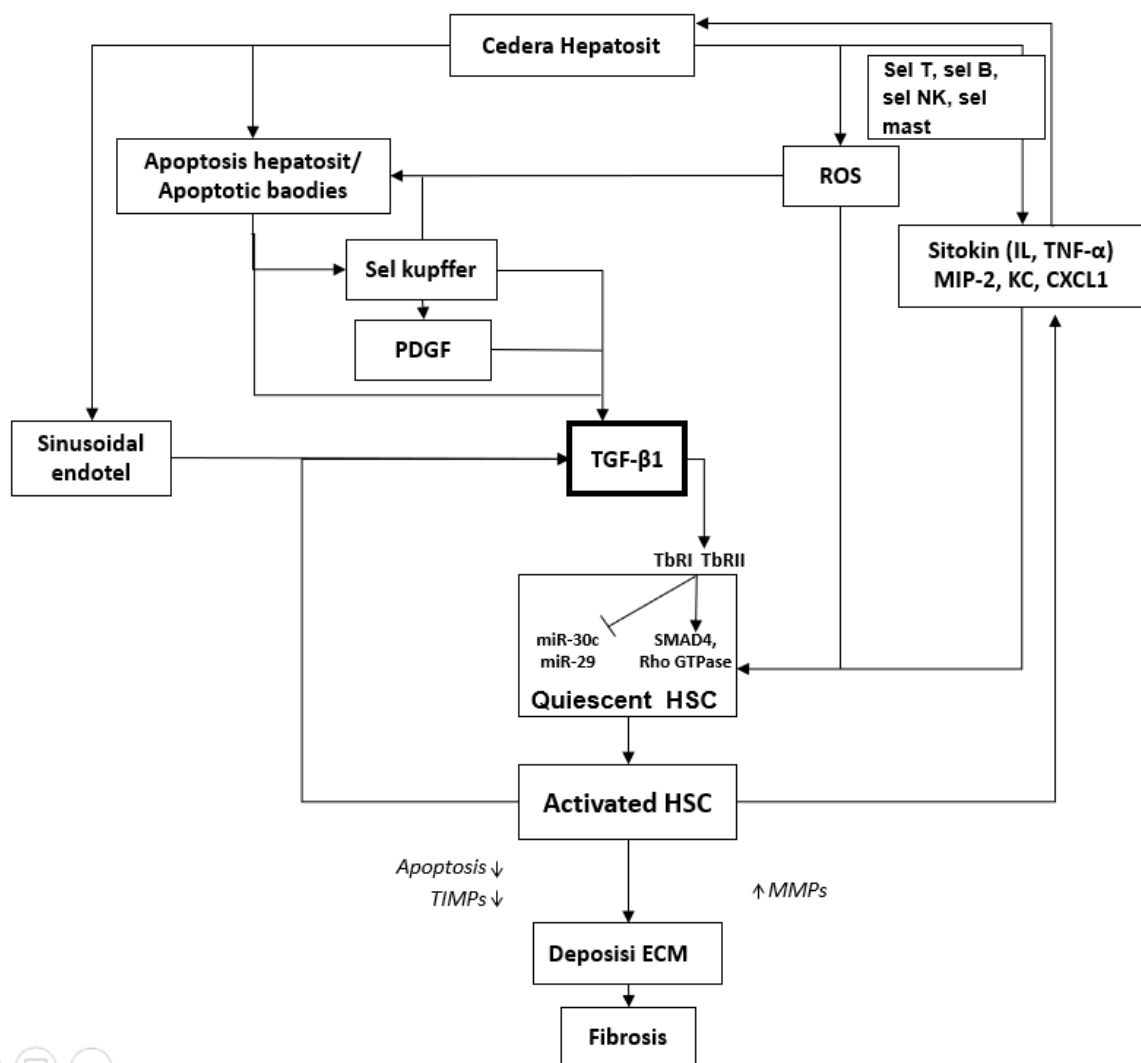
Gambar 2.8. Signaling TGF- β terhadap produksi kolagen-I (Park S, et al., 2012)



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Teori





3.2 Penjelasan Kerangka Teori

Suatu kondisi yang mengakibatkan terjadinya cedera hati, akan memicu sel hepatosit untuk merangsang hepatosit apoptosis, pelepasan sitokin inflamasi dan ROS yang akan mengaktifasi Hsc sehingga terjadinya fibrosis hati.

Apoptosis hepatosit, akan mengaktifkan sel-sel Kupffer untuk melepaskan beberapa sitokin inflamasi diantaranya FDGF, dan TGF- β 1 yang akan memicu untuk aktivasi HSC. *Reactive oxygen species* (ROS) dan mediator fibrogenik (CXC chemokines, KC dan MIP-2) serta sitokin inflamasi yang juga akan mengaktifkan HSC. HSC yang telah teraktivasi itu sendiri akan melepaskan TGF- β 1, MIP-2 dan KC, serta CXCL1, yang akan memperburuk efek hepatotoksik. HSC yang teraktivasi itu sendiri dapat melepaskan TGF- β 1, yang akan dapat meningkatkan kerusakan hepatosit.

TGF- β memberi sinyal efek multifungsi pada sel-sel hati dengan mengikat *single transmembrane type I dan type II receptors* (yaitu TbRI dan TbRII) yang memiliki aktivitas serin treonin kinase. Setelah pembentukan kompleks heteromerik yang diinduksi ligan, kinase tipe II mentransfosforilasi reseptor tipe I pada residu serin dan treonin spesifik dalam domain guksin-serin juxtamembrane.

Hal ini mengakibatkan teraktivasinya kinase tipe I, di mana sinyal ekstraseluler ditransmisikan melintasi membran, dan pensinyalan intraseluler dimulai oleh fosforilasi protein spesifik, yaitu SMAD4 yang akan mengekspresikan kolagen.

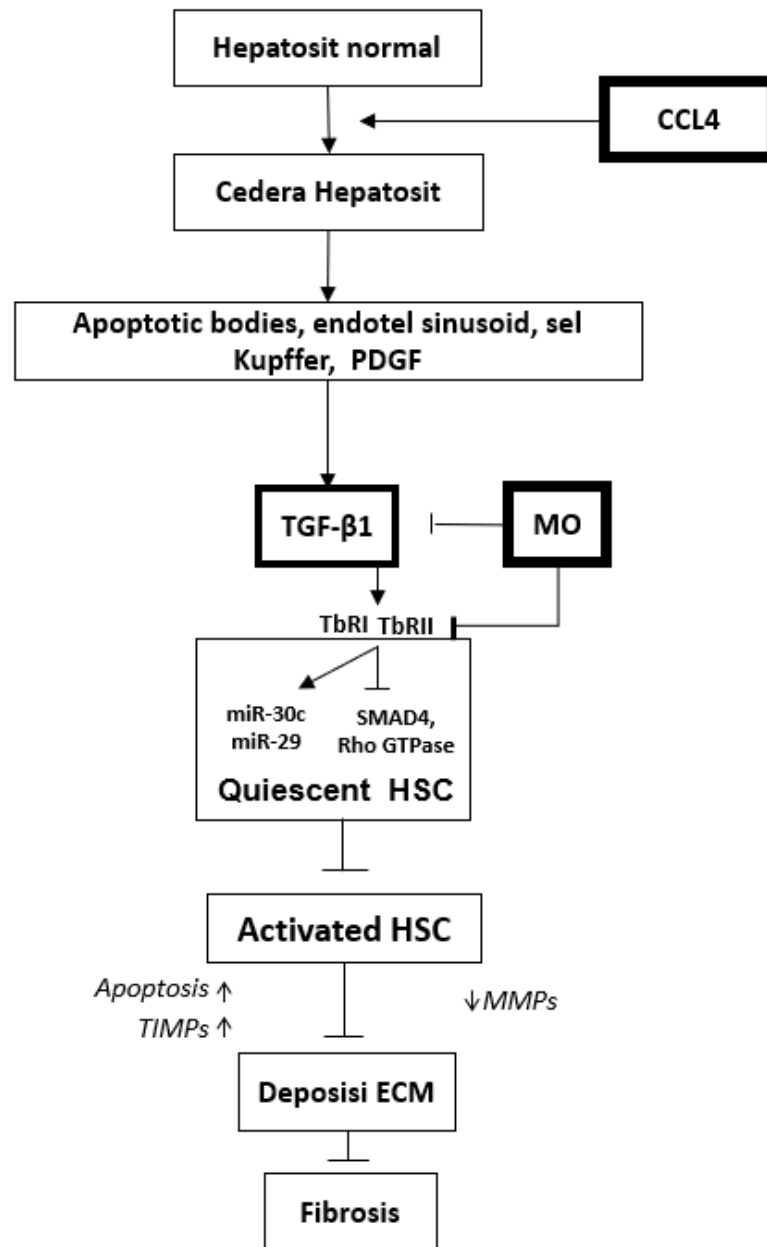
Sedangkan melalui jalur Rho GTPase, TGF- β 1 menginduksi terjadinya migrasi.

HSC yang teraktivasi akan bertransformasi menjadi miofibroblas.. TIMP-1 merupakan anti-apoptosis terhadap HSCs, dimana ekspresinya yang terus menerus pada HSC yang teraktivasi akan menyebabkan peningkatan populasi dari HSCs dengan cara menghambat *clearance* mereka dengan diantaranya menghambat MMPs untuk mendegradasi ECM. TIMP-2 diduga mempunyai efek



pro-fibrotik karena mengaktivasi miofibroblas. TGF- β 1 memiliki efek langsung dalam penghambatan MMP dan peningkatan ekspresi TIMP1. HSC yang teraktivasi akan menghasilkan matrix ekstraselular (ECM) yang telah termodifikasi di Disse's space dalam jumlah yang banyak. Pembentukan ECM disebabkan adanya pembentuk jaringan yang mirip miofibroblas. Akumulasi ECM akan menghasilkan peningkatan sintesis dan berkurangnya degradasi ECM yang akan berakhir pada fibrosis hati.

3.3 Kerangka Konsep



Keterangan :

MO : Moringa Oleifera

→ Merangsang

⊥ Menghambat, menurunkan



3.4. Penjelasan Kerangka Konsep

CCL4 banyak digunakan untuk menginduksi kerusakan hati. Hal ini dikarenakan CCL4 akan dimetabolisme oleh sitokrom p450 2E1 membentuk CCL3 dan CCL3O2, yang keduanya merupakan radikal bebas. Keduanya akan berikatan dengan DNA, lipid, protein, dan karbohidrat yang menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid, nekrosis sel, deposisi kolagen di hati, serta akan memicu pelepasan mediator inflamasi,

Dengan pemberian moringa, diharapkan terjadi penghambatan TGF- β 1, dan proses fosforilasi (penghambatan di TbRII), sehingga akan mengurangi aktivasi HSC. Berkurangnya aktivasi terhadap aHSC akan mengakibatkan penurunan pelepasan TGF- β 1 oleh aHSC. Sejalan dengan hal tersebut, TGF- β 1 yang terhambat/menurun mengakibatkan penurunan terhadap ekspresi TIMP1, sehingga akan terjadi apoptosis terhadap sel aktif HSC, dan peningkatan terhadap MMPs yang akan meningkatkan degradasi ECM sehingga fibrosis akan berkurang atau terhambat.



3.5. Hipotesis

Dari kerangka konsep di atas maka hipotesis dalam penelitian ini adalah :

1. Ekspresi TGF- β 1 di aHSC pada tikus model fibrosis hati lebih tinggi bila dibandingkan dengan tikus normal
2. Ekspresi TGF- β 1 di aHSC pada tikus model fibrosis hati yang diberikan *Moringa Oleifera* lebih rendah bila dibandingkan dengan tikus model fibrosis hati yang tidak diberikan *Moringa Oleifera*
3. Terdapat korelasi antara penurunan ekspresi TGF- β 1 terhadap derajat fibrosis hati akibat pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* pada tikus model fibrosis hati

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental in vivo pada hewan coba tikus jantan putih (*Rattus norvegicus strain wistar*) dengan analisis pada akhir perlakuan (*post test group design*) yang dilakukan di laboratorium dengan rancangan acak lengkap. Hewan coba dibagi dalam 5 kelompok dan diberi perlakuan, sebagai berikut :

Tabel 4.1. Perlakuan pada hewan coba

Kelompok	Nama Kelompok	Perlakuan	
		Injeksi CCl ₄	Moringa oleifera selama 14 minggu
1	K-negatif	Tanpa injeksi CCl ₄	Tanpa diberi moringa oleifera
2	K-positif	Injeksi CCl ₄ , 14 minggu	Tanpa diberi moringa oleifera
3	KP1	Injeksi CCl ₄ , 14 minggu	Diberi <i>Moringa oleifera</i> 150 mg/kgBB/ hari
4	KP2	Injeksi CCl ₄ , 14 minggu	Diberi <i>Moringa oleifera</i> 300 mg/kgBB/ hari
5	KP3	Injeksi CCl ₄ , 14 minggu	Diberi <i>Moringa oleifera</i> 600 mg/kgBB/hari

Sebelum dilakukan perlakuan, tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dibagi secara acak menjadi 5 kelompok, semua tikus diadaptasi (*acclimatized*) selama 7 hari. Tikus dalam kelompok kontrol negatif (K-negatif)



tidak diberikan injeksi CCl₄ tapi diberi injeksi NaCl 0,9 % dan tikus dalam kelompok kontrol positif (K-positif) dan kelompok perlakuan (KP1 sampai KP3) diberikan injeksi CCl₄ intraperitoneal (ip) dengan dosis 1 cc/kgBB, 2 kali per minggu selama 14 minggu. Proses fibrogenesis mencapai puncak pada 48 jam pasca injeksi CCl₄ dan fibrolisis terjadi 72 jam setelah proses fibrogenesis maksimal. Oleh karena itu, *moringa oleifera* diberikan pada 48 jam pasca injeksi CCl₄. Dosis *moringa* diberikan selama 14 minggu dengan dosis bertingkat sesuai kelompok perlakuan. Semua tikus dikorbankan (*sacrificed*) 48 jam pasca perlakuan sesuai kelompok masing-masing. Untuk kelompok perlakuan KP1, KP2, dan KP3, diberikan *Moringa oleifera* dengan dosis bertingkat yaitu 150 mg/kgBB/hari; 300 mg/kgBB/hari; dan 600 mg/kgBB/hari.

Pengambilan sampel jaringan hati digunakan untuk pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis serta untuk memeriksa kadar TGF- β . Derajat fibrosis diperiksa dengan kriteria *Metavir scoring system*.

4.2 Tempat dan waktu penelitian

Pemeliharaan dan perlakuan terhadap tikus berupa pemberian *Moringa oleifera* dan induksi CCL₄ dilakukan di Laboratorium Fisiologi Kedokteran Universitas Brawijaya. Untuk pemeriksaan TGF- β di aHSC dilakukan di Laboratorium Sentra Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang. Waktu yang dibutuhkan untuk penelitian $\pm$ 6 bulan yaitu Oktober 2018 – Maret 2019

4.3 Populasi dan Sampel penelitian

4.3.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian menggunakan tikus jantan jenis *Rattus Norvegicus strain Wistar* yang berumur sekitar 3 bulan.



4.3.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah tikus jantan wistar yang berumur ± 3 bulan atau sekitar 12 minggu dengan berat badan 150 – 250 mg.

Jumlah besar sampel yang digunakan untuk penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, menggunakan rumus Federer (1963) dalam Supranto J (2000), yaitu :

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

t : banyaknya kelompok perlakuan,

r : jumlah pengulangan (replikasi)

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

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

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

$$4r = 4 + 15$$

$$4r \geq 15 + 4$$

$$r \geq 19/4$$

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

sehingga, jumlah pengulangan yang diperlukan di setiap kelompok perlakuan minimal 5. Untuk mengantisipasi adanya tikus yang meninggal (20 %), tiap kelompok ditambahkan faktor koreksi sebesar 20 %, sehingga jumlah pengulangan tiap kelompok perlakuan adalah $5 + (5 \times 20\%) = 5 + 1 = 6$ atau minimal 6. Pada penelitian ini kami tetapkan jumlah sampel pada setiap kelompok sebanyak 6 tikus. Jadi secara keseluruhan diperlukan $5 \times 6 = 30$ tikus.



4.3.3 Kriteria Sampel

4.3.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Tikus *Rattus norvegicus strain wistar* berjenis kelamin jantan
- b. Usia $\pm$ 3 bulan (12 minggu)
- c. Berat badan 150-250 gram
- d. Kondisi tikus sehat, aktif, dan tidak ada kelainan anatomi
- e. Belum mengalami perlakuan apapun atau belum mendapatkan asupan bahan kimia apapun

4.3.3.1 Kriteria ekslusi

- a. Tikus tidak mau makan sehingga mengganggu kesehatan
- b. Tikus sakit atau mati selama masa perlakuan

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

- Paparan *Moringa oleifera*

4.4.2 Variabel perantara

- Kadar TGF- β jaringan hati di aHSC.

4.4.3 Variabel Tergantung

- Derajat fibrosis hati

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat

- Alat Pemeliharaan Tikus

Kandang dari kotak berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm dengan alas sekam yang bersih dan kering serta diganti dua hari sekali, tutup kandang dari anyaman kawat, botol air dan tempat pakan tikus.



- Alat Pembuat Makanan Tikus

Baskom plastik, timbangan, handscoon, nampan.

- Sonde untuk pemberian perlakuan beserta tube ukuran 1,5 mL dan 15 mL.

- Alat Pemeriksaan Patologi Anatomi

Rotari mikrotom merek LEICA, mikroskop cahaya merek Nikon Eclipse C 600, dengan kamera Nikon digital Net Camera DN 100 dengan pembesaran 40X, 100X, dan 200X, disertai lensa okuler 10X dan lensa obyektif 100X, kaca obyek dan kaca penutup.

- Alat Pembuat dan Pemberian Larutan CCl₄

Pipet, beaker glass, spatula dan spuit.

4.5.2 Bahan

- Hewan coba : tikus *rattus norvegicus strain winstar* sesuai kriteria inklusi.

- Bahan perawatan tikus: air, sekam, pakan tikus.

- Bahan pembuatan pakan standar : Pakan standar tikus berupa konsentrat BR-1 yang dicampur dengan tepung terigu dengan perbandingan 3:1 dan air 10 cc.

- Bahan pembuatan larutan CCl₄ yaitu CCl₄ 10% dan minyak jagung dengan perbandingan 1 : 9

- Bahan pakan paparan *Moringa oleifera* dari PT. Materia Medica Jawa Timur

- Bahan reagensia : antibodi primer TGFβ1 Antibody (TB21) sc-52893 (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, USA), antibodi sekunder anti-rabbit IgG (1:1,000)

- Bahan bedah tikus: Alkohol, kapas, gunting, ether.

- Bahan penentuan derajat fibrosis hati : formalin 10% , acetone, xylol, parafin cair, parafin blok, mayer albumin, Pewarnaan HE, alkohol 95%, air, hematoxilin, lithium karbonat.



4.6 Definisi Operasional

- Tikus model fibrosis : hewan coba tikus (*Rattus Norvegicus*) strain wistar jantan yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yang dipapar dengan injeksi karbon tetraklorida (CCl₄) sebanyak 1,0 ml/kgBB 2x seminggu selama 60 hari.
- Diet normal berupa pakan standar BR-1 yang dicampur dengan tepung terigu dengan perbandingan 3:1 dan air 10 cc.
- Paparan CCl₄ 10% adalah injeksi CCl₄ secara intraperitoneal dengan dosis 1,0 cc/KgBB, 2 kali seminggu (Li, et al., 2012) diberikan selama 12 minggu, dilanjutkan dengan 2 cc/KgBB pada minggu ke-13 dan ke-14.
- *Moringa oleifera* (MO) yang digunakan berupa serbuk diperoleh dari PT. Moringa organik Indonesia, Blora, Jawa Tengah.
- Ekstrak *Moringa oleifera* diperoleh dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 96% (Sultana et al., 2009).
- Bahan yang digunakan sebagai pelarut *Moringa oleifera* adalah etanol 80 %, 1 gram ekstrak MO dilarutkan dalam 10 cc *distilled water* (Hamza, 2010) sehingga setiap 1cc larutan mengandung MO sebanyak 100 mg.
- Paparan *Moringa oleifera* adalah pemberian *Moringa oleifera* secara peroral dengan dosis 150 mg/kgBB/hari pada kelompok KP1, dosis 300 mg/kgBB/hari pada kelompok KP2, dan 600 mg/kgBB/hari pada kelompok KP3. Pada seluruh kelompok tersebut diberikan selama 14 minggu.
- aHSC (activated HSC) adalah sel stellate hati (*Hepatic stellate cell*) yang teraktivasi karena aktivitas inflamasi.
- Ekspresi TGF- β di aHSC, diukur dengan menggunakan metode *Immunofluorescence assay* yang menggunakan dua antibody yaitu antibodi



primer TGF β 1 Antibody (TB21) sc-52893 (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, USA) diikuti dengan antibodi sekunder anti-rabbit IgG (1:1,000).

Pembacaan ekspresi TGF- β di aHSC dengan menghitung warna *merge* (gabungan) pewaranaan α -SMA (marker FITC (Fluorescein isothiocyanate)) dan TGF- β (Rhodamine) yang diamati dengan mikroskop Confocal Lasser Scanning Microscope Olympus type FV1000 (Farrington, C. et al. 2010) dan dihitung dengan menggunakan Olympus Fluoview Ver.4.2a software. α -SMA merupakan marker yang dapat diandalkan untuk melihat aktivitas aHSC (Carpino, G., et al. 2005). Ekspresi TGF- β diukur dengan menghitung rata-rata pendaran pada jaringan hati regio periporta pada 5 lapangan pandang dengan pembesaran 400x dengan satuan arbitrary unit (Ramachandran et al., 2019).

- Derajat fibrosis hati dilihat dari preparat dengan pengecatan *Masson's trichrome* (MT) yang dianalisa oleh 2 ahli patologi anatomi. Penilaian derajat fibrosis menggunakan skala metavir (Goodman, 2007) dengan kategori :

- F-0 : tidak ada fibrosis
- F-1 : ekspansi fibrosis pada area porta tanpa septa (fibrosis ringan).
- F-2 : septa fibrosis meluas sehingga terjadi bridging fibrosis antara struktur pembuluh darah yang berdekatan, baik antara portal ke portal dan portal ke sentral (fibrosis moderate).
- F-3 : terjadi bridging atau septa tanpa sirosis (fibrosis berat).
- F-4 : terjadi sirosis, jaringan tersusun dari beberapa nodul yang dikelilingi oleh fibrosis.



4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur Perlakuan Terhadap Tikus

1. Tikus putih *Rattus norvegicus* strain wistar didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Awal percobaan semua tikus ditimbang berat badannya kemudian dilakukan randomisasi agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan.
3. Memberi label pada kandang tikus sesuai dengan perlakuan yaitu label kontrol negatif (KN), kontrol positif (KP), KP-1, KP-2, KP-3. Masing-masing kandang berisi 5 ekor tikus. Kandang ditutup dengan menggunakan anyaman kawat berongga sehingga tikus bisa bernafas dengan ventilasi udara yang cukup. Kandang diletakkan pada suhu ruangan 25-28°C dan kelembapan udara 50-70%.
4. Memberi alas pada kandang berupa sekam dengan ketebalan secukupnya dan melakukan pergantian sekam setiap 3 hari sekali. Memasukkan tikus ke dalam kandang yang dibuat dari bak plastik dengan penutup kawat ram yang dibingkai dengan kayu dan mengadaptasikan tikus putih jantan selama 7 hari dengan diberi diet normal supaya tikus dapat menyesuaikan diri dengan perubahan lingkungan dan beradaptasi dengan waktu pemberian makanan. Pada masa adaptasi berat tikus ditimbang yaitu pada saat awal adaptasi dan sesudah adaptasi, agar dapat dipantau bahwa berat badan tikus tidak mengalami penurunan dan berada dalam kondisi yang baik.
5. Memberikan minum dengan aquades setiap hari yang ditempatkan pada botol minum ukuran 100 mL dan terdapat pipa dengan bola



katup tempat keluarnya air minum. Tempat ini diletakkan di atas kawat penutup kendang

6. Memberikan diet pada tikus berupa pakan standar BR-1 yang dicampur dengan tepung terigu dengan perbandingan 3:1 dan air 10 cc.
7. Menginduksi CCl₄ dengan disuntikkan intraperitoneal dosis 1 cc/kgBB 2x/minggu selama 12 minggu, dilanjutkan 2cc/KgBB 2x/minggu pada minggu ke-13 dan ke-14 pada kelompok perlakuan dan menyuntikkan NaCl 0.9% dosis 1 ml/kgBB 2 kali seminggu sebagai placebo untuk kelompok kontrol negatif.
8. Memberikan *Moringa olifera* dengan dosis 150 mg/kgBB/hari pada kelompok KP1, dosis 300 mg/kgBB/hari pada kelompok KP2, dan 600 mg/kgBB/hari pada kelompok KP3 peroral setelah 48 jam paska injeksi CCl₄.

4.7.2 Pembuatan dan Pemberian CCL₄

- Mengambil CCl₄ dengan pipet ukur sebanyak 5 mL/hari.
- Melarutkan CCl₄ dengan minyak jagung sebanyak 1 : 9 didalam beaker glass, yaitu 5 mL CCl₄ dan 5 mL minyak jagung dengan konsentrasi 10%, kemudian mengaduknya hingga tercampur rata (Li et al., 2012)
- injeksi CCl₄ diberikan secara intraperitoneal (ip) dengan dosis 1 cc/kgBB, 2 kali per minggu sampai dengan minggu ke-12, dan dilanjutkan dengan 2 cc/KgBB 2 kali perminggu pada minggu ke-13 dan ke-14

4.7.3 Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Moringa Oleifera

- Moringa oleifera yang digunakan adalah Moringa oleifera (80 mesh) sebanyak 50 gram diekstraksi dengan etanol 80 % sebanyak 500 mL selama 6 jam pada temperatur ruang di dalam orbital shaker.



- Total serbuk Moringa yang diekstrak sebanyak 500 gram dengan total pelarut 5 L. Ekstrak dipisahkan dari residu dengan penyaringan menggunakan kertas saring Whatman No 1. Residu diekstraksi 2 kali dengan pelarut yang baru dan ekstrak digabung. Ekstrak yang digabung dipekatkan dan dibebaskan dari pelarut dibawah tekanan rendah pada suhu 45 oC menggunakan rotary evaporator. Ekstrak kasar pekat yang telah dikeringkan ditimbang dan disimpan di dalam kulkas pada suhu -4 oC.

- Tiap 100 gram serbuk daun kering yang diekstrak dengan etanol 80 % menghasilkan ekstrak sekitar 17 gram . Ekstrak yang dihasilkan dalam penelitian ini diperkirakan 85 gram

4.7.4 Pembedahan dan Pengambilan Sampel

1. Setiap perlakuan dibedah sesuai waktu perkiraan terjadinya fibrosis hati tingkat tertentu sesuai dengan penelitian sebelumnya.
2. Tikus dianastesi terlebih dahulu dengan injeksi ketamin 0,3 cc dengan ketamin 50 mg/1 cc.
3. Tikus dibaringkan pada permukaan meja yang keras yang dialasi dengan sterofoam.dan tangan tikus difiksasi dengan jarum pentul pada atas sterofoam.
4. Toraks dan abdomen tikus dibuka dengan memotong dinding abdomen (kulit dan peritoneum) pada aksis median. Pembukaan abdomen diperluas kea rah lateral, sehingga organ-organ dalam dan rongga abdomen terlihat.
5. Dilakukan pengambilan jaringan hati kemudian difiksasi dengan formalin 10%.



4.7.5 Pembuatan *Immunofluoresence* assay dan pengamatan TGF- β 1 di aHSC.

Pengukuran ekspresi TGF- β 1 di HSC tikus model fibrosis hati dilakukan menggunakan kit dengan metode imunofluoresence. Sediaan dipotong dengan microtome setebal 4-5 micron. Setiap preparat diberi nomor dan kode antibodi. Suhu waterbath 37-56 °C. Sediaan diletakkan pada objek glass yang telah dicoating. Slide disimpan dalam incubator 38 °C sehari semalam agar lebih kuat melekat. Sebelum proses pewarnaan dikeringkan dan dipanaskan di atas hotplate selama 1 jam. Slide dideparafinasi dengan xylol I, II dan III masing-masing selama 3 menit. Slide dimasukkan dalam etanol, alkohol 90 %, 80 % masing-masing 2-3 menit. Slide dicuci dengan air mengalir 2-3 menit. Slide dimasukkan dalam H₂O₂, methanol 0,5 % (100 mL + 1,6 mL H₂O₂) selama 20 menit. Slide dicuci dengan air mengalir 2-3 menit.

Antigen Retrieval: slide direndam dalam larutan DIVA, dipanaskan dalam Decloacking Chamber. Slide didinginkan dalam suhu ruang 20-30 menit. Slide direndam dengan PBS 2-5 menit. Slide diletakkan dalam moisture chamber dan diberi pembatas pada sekeliling sediaan dengan PAP pen, ditetesi background Sniper 10-15 menit. Slide ditetesi antibodi primer TGF β 1 Antibody (TB21) sc-52893 (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, USA) dan diinkubasi 60 menit. Slide dicuci dengan PBS 3-5 menit. Slide ditetesi antibodi sekunder biotinylated universal secondary antibody (Novocastra) dan diinkubasi 10 menit. Slide dicuci dengan PBS 3-5 menit. Slide ditetesi dengan TREKAVIDIN-HRP LABEL dan diinkubasi 10 menit. Slide dicuci dengan PBS 3-5 menit. Slide ditetesi dengan DAB, diinkubasi 24 menit (1 mL BETAZOID DAB SUBSTRAT BUFFER), ditambah 1-2 tetes DAB chromogen. Slide dicuci dengan air mengalir 5-7 menit. Slide dicounterstain dengan Hematoxylin 2-3 menit, direndam dalam lithium carbonat jenuh. Slide dicuci dengan air mengalir 5-7 menit. Slide didehidrasi dengan alkohol



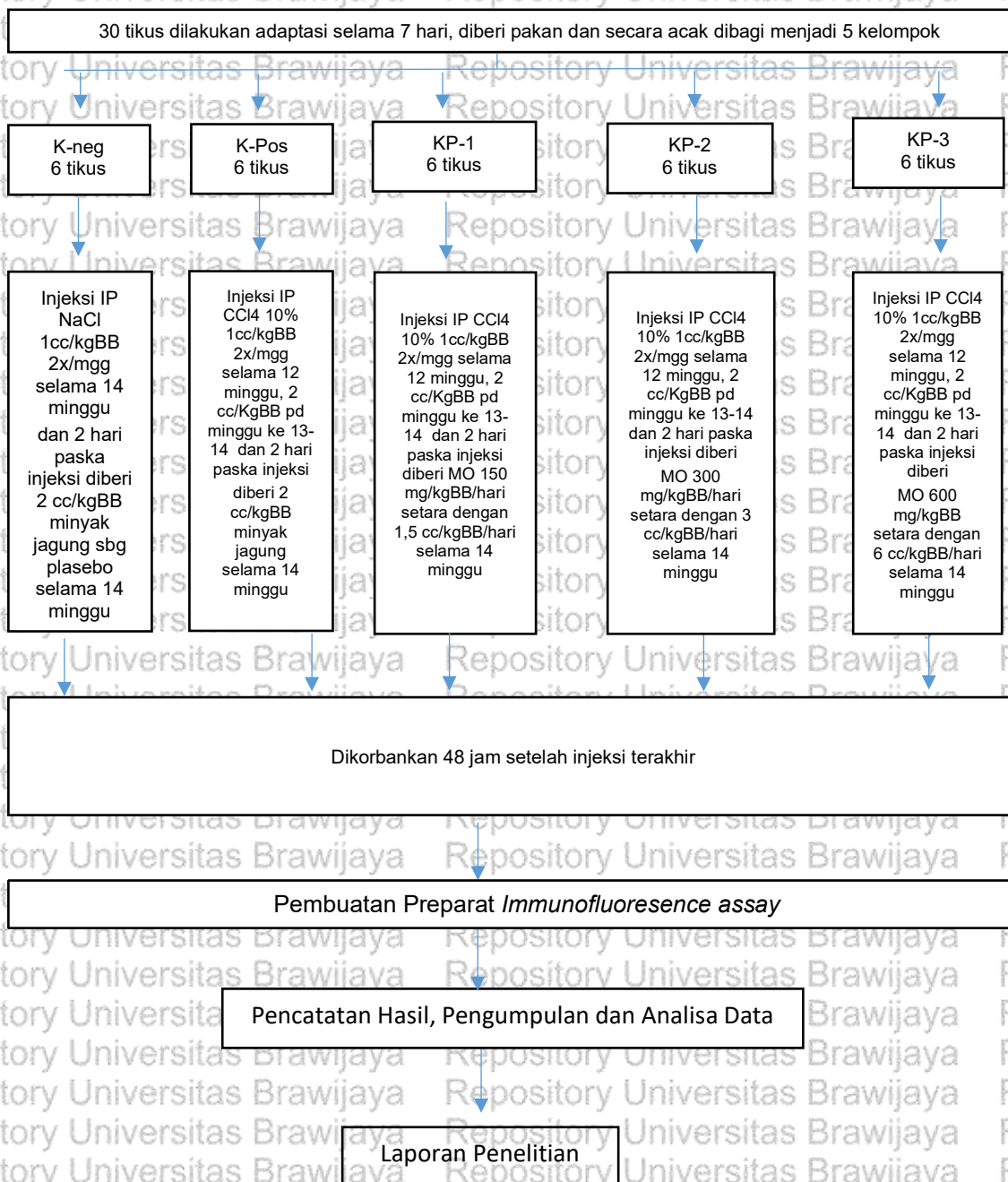
80 %, 96 %, alkohol absolut sampai dengan xylol I, II, dan III masing-masing 3 menit.

Ekspresi TGF- β 1 di a-HSC dianalisa secara Immunofluorescence dengan pengecatan menggunakan antibodi primer TGF β 1 Antibody (TB21) sc-52893 (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, USA) pada suhu 4 °C satu malam, diikuti dengan antibodi sekunder anti-rabbit IgG (1:1,000) dan diamati dengan mikroskop konfokal. Section diamati di bawah mikroskop cahaya oleh penyelidik yang awalnya dibutakan pada kelompok perlakuan, dan 5 bidang yang dipilih secara acak dari masing-masing slide adalah semi-kuantitatif.

Untuk mengetahui letak intensitas ekspresi TGF- β di aHSC, digunakan pewaranaan pada α -SMA (marker FITC (Fluorescein isothiocyanate)) dan TGF- β (Rhodamine). Pengamatan dan penghitungan intensitas ekspresi TGF- β di aHSC dilakukan pada foto merge (warna kuning) pada pembesaran 400x dan dihitung dengan menggunakan Olympus Flouview Ver.4.2a software.



4.7.6. Bagan Alur Penelitian





4.8 Uji Analisa Data

Data diolah secara analitis dan deskriptif dengan menggunakan alat bantu software komputer SPSS 22.0. Analisis data ekspresi TGF- β 1 dimulai dengan uji asumsi yaitu uji normalitas dengan menggunakan uji *Saphiro Wilk* dan uji homogenitas varian dengan menggunakan uji *Levene*. Jika uji asumsi data terpenuhi, yaitu sebaran data normal dan varian data homogen ($p > 0.05$), maka digunakan uji analisis statistika parametrik, dilakukan uji beda *Oneway Anova* dan *Post Hoc LSD 5%*. Jika uji asumsi data tidak terpenuhi, digunakan uji alternatif non parametrik, uji beda *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan pengujian koefisien $|R_i - R_j|$ 5%. Data fibrosis hati diolah secara analisis non parametrik dengan uji beda *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan pengujian koefisien $|R_i - R_j|$ 5%. Penelitian ini dianalisis dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0.05$).

Uji $R_i - R_j$ digunakan sebagai metode perbandingan berganda atau uji lanjut setelah uji *Kruskal Wallis* karena metode ini merupakan metode yg didesain untuk perbandingan lebih dari 2 kelompok. Berbeda halnya dg uji *Mann-Whitney*, metode ini didesain hanya utk membandingkan 2 kelompok.



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

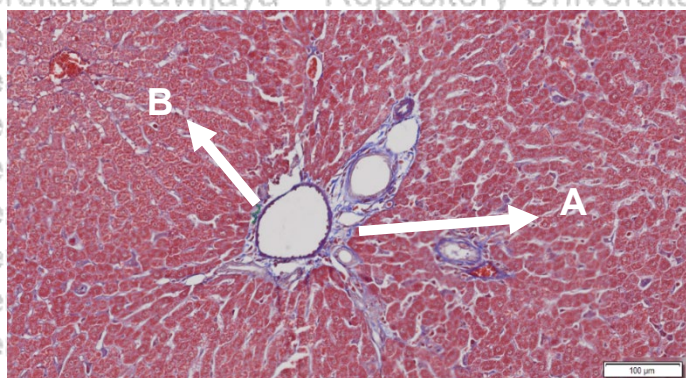
5.1 Hasil pengamatan fibrosis hati.

Berdasarkan hasil pengamatan dan penilaian derajat fibrosis hati dengan menggunakan kriteria Metavir, didapatkan dengan derajat F0 untuk seluruh kelompok K-negatif, derajat F3 untuk seluruh kelompok K-positif dan KP1. Untuk kelompok KP2 dan KP3 mulai mengalami penurunan derajat fibrosis, pada KP2 terdapat 1 sampel dengan derajat F2 dan 5 sampel dengan derajat F3, sedangkan pada KP3 terdapat 2 sampel dengan derajat F1 dan 4 sampel dengan derajat F2.

Tabel 5.1. Derajat fibrosis pada tiap kelompok pengamatan

No	Kelompok	Derajat Fibrosis				Jumlah
		F0	F1	F2	F3	
1	K-negatif	6	-	-	-	6
2	K-positif	-	-	-	6	6
3	KP-1	-	-	-	6	6
4	KP-2	-	-	1	5	6
5	KP-3	-	2	4	-	6
TOTAL						30

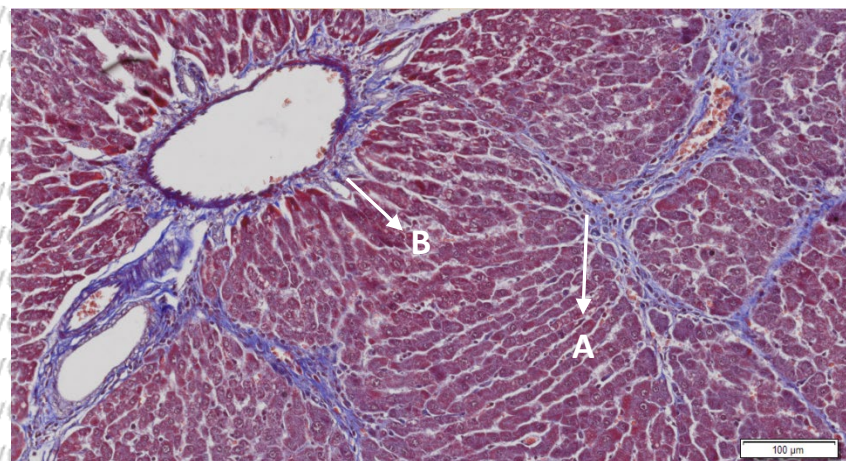
Berikut ditampilkan gambar derajat fibrosis hati dengan pengecatan Masson's Trichrome (MT)



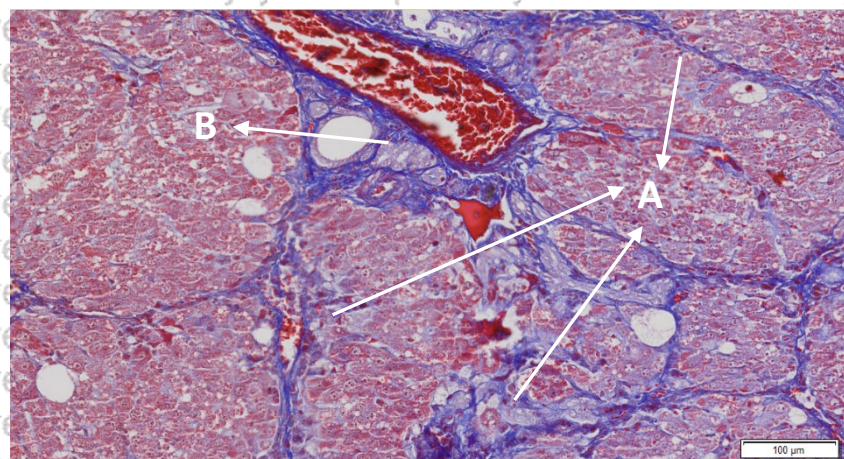
Gambar 5.1. Derajat fibrosis Hati F0 Pengecatan MT
Pembesaran 80x dengan Skala 100μm (A) Kolagen dan jaringan ikat normal (B) Area Vena porta bersih



Gambar 5.2. Derajat fibrosis Hati F1 Pengecatan MT
Pembesaran 80x dengan Skala 100µm



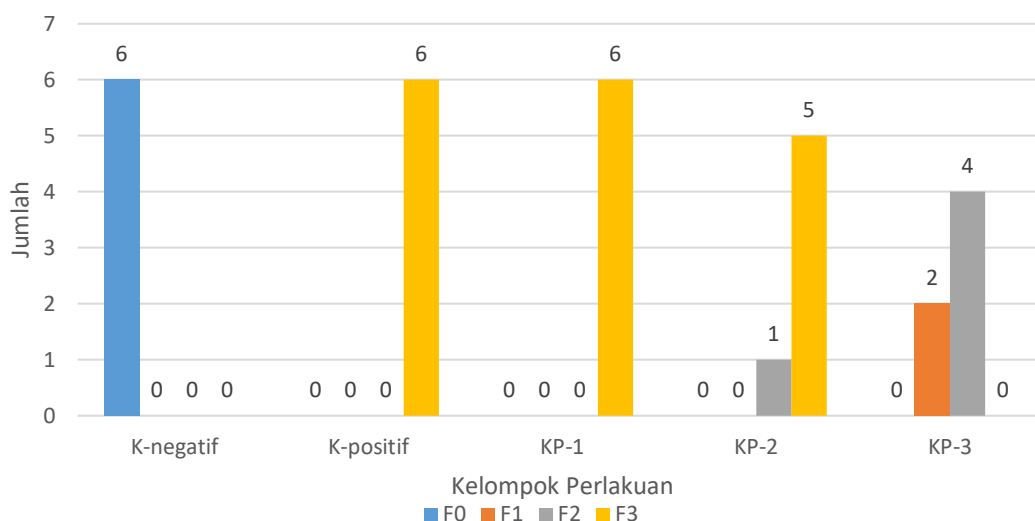
Gambar 5.3 Derajat fibrosis Hati F2 Pengecatan MT
Pembesaran 80x dengan Skala 100µm (A) Fibrosis beberapa
septa (B) Fibrosis di ara vena porta



Gambar 5.4 Derajat fibrosis Hati F3 Pengecatan MT
Pembesaran 80x dengan Skala 100µm (A) Fibrosis multilobular
(B) Fibrosis di area vena porta

Dari grafik histogram terlihat bahwa pada kelompok K-negatif distribusi data derajat fibrosis hati menunjukkan derajat yang normal (F0). Pada kelompok K-positif, data menunjukkan bahwa derajat yang dominan adalah F3. Demikian pula pada kelompok KP-1. Artinya belum ada penurunan derajat keparahan fibrosis hati pada penggunaan 150 mg/kgBB/hari. Pada dosis 300 mg/kgBB/hari distribusi data menunjukkan ada tikus yang sudah mengalami penurunan derajat pada F2. Sedangkan pada dosis yang lebih tinggi lagi yaitu 600 mg/kgBB/hari sudah ada beberapa tikus yang sudah mengalami penurunan hingga pada F1.

GRAFIK DERAJAT FIBROSIS



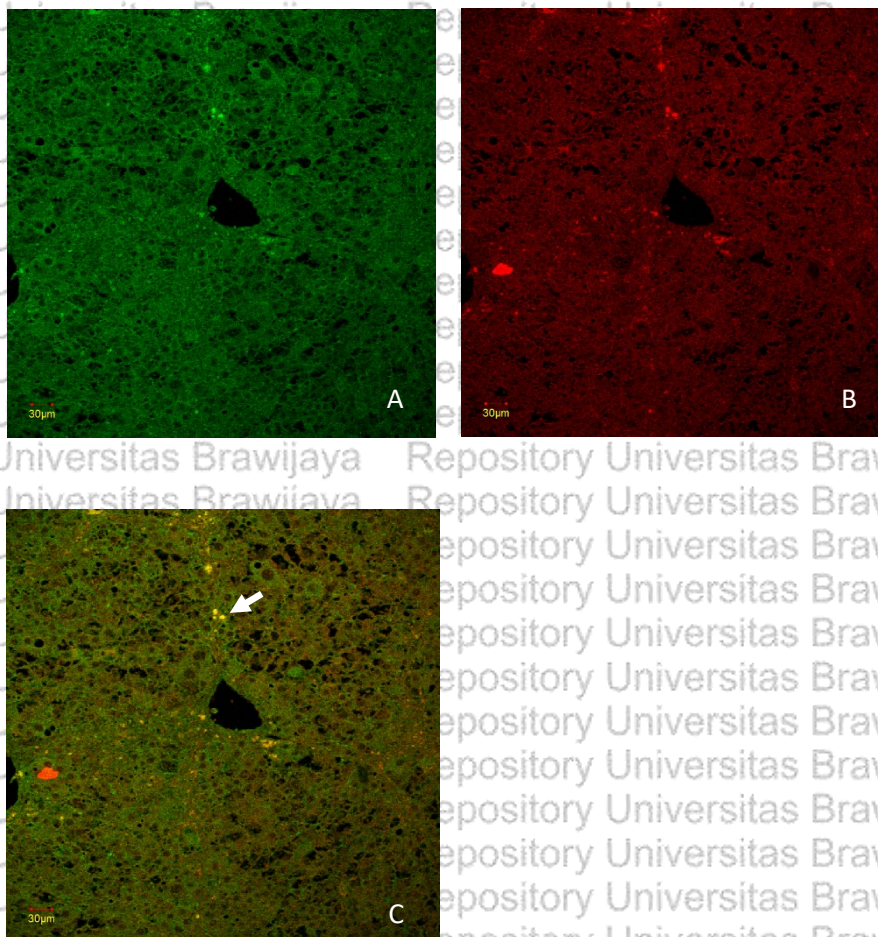
Grafik 5.1. Data derajat Fibrosis Hati

5.2 Hasil pengamatan ekspresi TGF- β

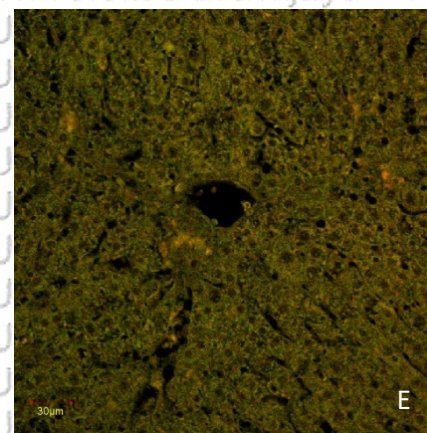
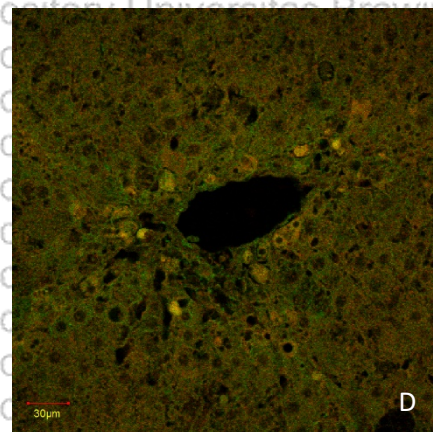
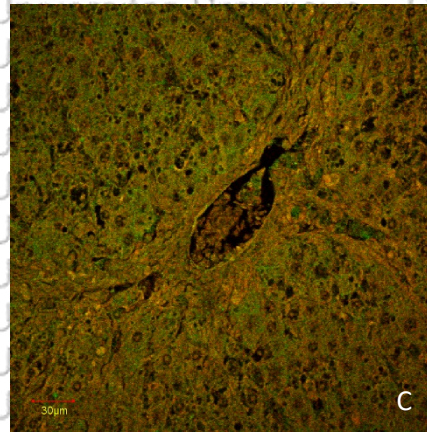
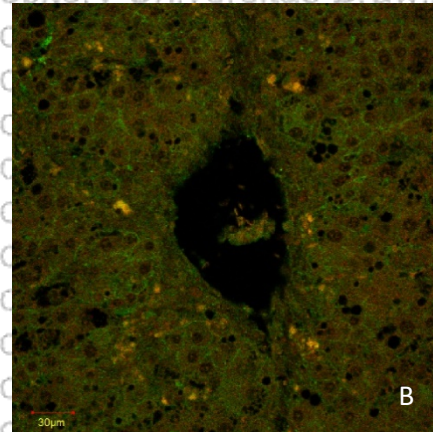
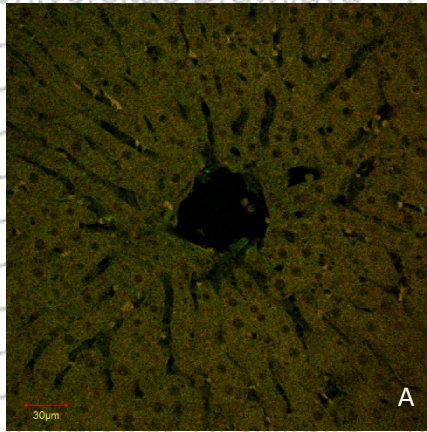
Pengamatan ekspresi TGF- β dengan metode *imunoflouresence*, dengan diamati oleh mikroskop konfokal, dipilih 5 bidang pengamatan secara acak serta dihitung dengan menggunakan Olympus Flouview Ver.4.2a software.



Untuk mengetahui letak intensitas ekspresi TGF- β di aHSC, digunakan pewaranaan pada α -SMA (marker FITC (Fluorescein isothiocyanate)) dan TGF- β (Rhodamine). Pengamatan dan penghitungan intensitas ekspresi TGF- β di aHSC dilakukan pada foto *merge* (warna kuning) pada pembesaran 400x.



Gambar 5.5. Pengamatan immunofluorescence pada pembesaran 200x (A) ekspresi α -SMA dengan warna hijau (FITC) (B) ekspresi TGF- β dengan warna merah (Rhodamine) (C) *Merge* dua gambar, tanda panah adalah ekspresi TGF- β di aHSC yang diamati dan dihitung.



Gambar 5.6: Sampel pada masing-masing kelompok pengamatan immunofluorescence pada pembesaran 400x (A) K-negatif (B) K-Positif (C) KP1 (D) KP2 (E) KP3



Berdasarkan pengamatan terdapat penurunan nyata terhadap ekspresi TGF- β , pada seluruh kelompok perlakuan. Berdasarkan tabel 5.2 pada kelompok perlakuan KP1-KP3 yang diberikan *Moringa oleifera* tiap kelompok dengan dosis 150mg/KgBB, 300 mg/KgBB, 600 mg/KgBB, tampak hasil yang tidak jauh berbeda satu sama lain.

Tabel 5.2. Karakteristik ekspresi TGF- β . Mean, Standar deviasi, Median

Perlakuan	Mean $\pm$ SD (AU)	Median (AU)
K-Negatif	1603.54 $\pm$ 178.23	1691.25
K-Positif	2350.61 $\pm$ 421.12	2465.72
KP1	1793.04 $\pm$ 286.70	1785.42
KP2	1897.1 $\pm$ 255.21	1799.18
KP3	1654.09 $\pm$ 436.61	1716.39

*AU=Arbitrary unit

5.3 Analisa data

5.3.1 Pengujian asumsi yang melandasi ANOVA

Pengujian ekspresi TGF- β pada sel HSC tikus yang diinduksi CCL4 dengan menggunakan 2 kelompok kontrol (K-Negatif dan K-Positif) dan 3 level dosis *Moringa oleifera* (150 mg/kgBB/hari, 300 mg/kgBB/hari, dan 600 mg/kgBB/hari) dilakukan dengan menggunakan ANOVA. Sebelum dilakukan pengujian dengan menggunakan ANOVA, terlebih dahulu dilakukan pengujian asumsi yang melandasi ANOVA. Terdapat dua asumsi yang melandasi ANOVA, yakni asumsi normalitas dan homogenitas ragam. Pengujian asumsi normalitas dilakukan dengan menggunakan uji Saphiro-Wilk. Asumsi normalitas dikatakan terpenuhi jika p-value hasil penghitungan lebih besar dari $\alpha = 0,05$. Dengan menggunakan



bantuan software SPSS didapatkan hasil pengujian asumsi normalitas sebagai berikut :

Tabel 5.3. Uji Asumsi Normalitas

Variabel	Koefisien	p-value	Keterangan
Ekspresi TGF- β	0.964	0.389	Normal

Berdasarkan pada tabel 4 di atas, pada variabel ekspresi TGF- β , didapatkan p-value lebih dari $\alpha = 0,05$ ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa asumsi normalitas pada variabel tersebut telah terpenuhi.

Pengujian asumsi homogenitas ragam dilakukan dengan menggunakan uji Levene. Asumsi homogenitas ragam dikatakan terpenuhi jika p-value hasil penghitungan lebih besar daripada $\alpha = 0,05$. Berikut hasil pengujian asumsi homogenitas ragam :

Tabel 5.4. Uji Asumi Homogenitas Ragam

Variabel	Koefisien	p-value	Keterangan
Ekspresi TGF- β	1.638	0.196	Homogen

Berdasarkan pada hasil pengujian asumsi homogenitas ragam pada tabel di atas, ditunjukkan bahwa pada variabel ekspresi TGF- β didapatkan p-value lebih dari 0.05 ($p > 0.05$). Oleh karena itu, asumsi homogenitas ragam pada variabel tersebut telah terpenuhi dan pengujian pengaruh *Moringa oleifera* terhadap ekspresi TGF- β dilakukan secara parametrik dengan menggunakan uji ANOVA. Sedangkan pada variabel derajat fibrosis, proses pengujian secara statistik dilakukan dengan pendekatan statistika nonparametrik dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis.



5.3.2 Pengujian Pengaruh *Moringa oleifera* Terhadap Ekspresi TGF- β dengan Uji ANOVA

Sebagaimana telah dijelaskan dalam hasil pengujian asumsi normalitas dan asumsi homogenitas ragam, variabel ekspresi TGF- β telah terpenuhi.

Selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui pengaruh pemberian *Moringa oleifera* terhadap ekspresi TGF- β secara parametrik dengan menggunakan uji ANOVA. Berikut hasil pengujian pengaruh pemberian *Moringa oleifera* dengan beberapa level dosis terhadap ekspresi TGF- β dengan menggunakan uji ANOVA.

Tabel 5.5 Pengujian Pengaruh *Moringa oleifera* Terhadap Ekspresi TGF- β dengan Uji ANOVA dan LSD 5%

Perlakuan	Mean $\pm$ SD	Notasi	p-value
K-Negatif	1603.54 $\pm$ 178.23	a	0.005
K-Positif	2350.61 $\pm$ 421.12	b	
KP1	1793.04 $\pm$ 286.70	a	
KP2	1897.1 $\pm$ 255.21	a	
KP3	1654.09 $\pm$ 436.61	a	

Keterangan: Pada rata-rata $\pm$ sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).

Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji ANOVA, didapatkan p-value sebesar 0.005, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$).

Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian *Moringa oleifera* terhadap ekspresi TGF- β . Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi TGF- β akibat pemberian



Moringa oleifera dengan dosis yang berbeda. Berikut hasil perbandingan multiple comparison dari uji LSD 5% :

Tabel 5.6 Hasil Pengujian *Multiple Comparison* LSD 5% Ekspresi TGF- β

Perbandingan		Beda Rata-Rata	p-value
K-	K+	-747.069	0.001
	KP1	-189.497	0.331
	KP2	-293.559	0.137
	KP3	-50.547	0.793
K+	KP1	557.572	0.007
	KP2	453.510	0.026
	KP3	696.521	0.001
KP1	KP2	-104.062	0.591
	KP3	138.949	0.474
KP2	KP3	243.011	0.215

Berdasarkan pada hasil uji LSD 5 % pada Tabel 5.6 di atas, perbandingan antara kelompok K-Negatif dengan K-Positif, ditunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok K-Negatif dengan K-Positif. Hal ini ditunjukkan dari p-value sebesar 0.001 ($p < 0.05$) dan pada Tabel 5.5 ditunjukkan nilai rata-rata $\pm$ sd kelompok K-Positif lebih tinggi dan memuat huruf yang berbeda dengan K-. Perbedaan yang signifikan membuktikan bahwa induksi CCL4 terbukti berdampak pada peningkatan ekspresi TGF- β secara signifikan.

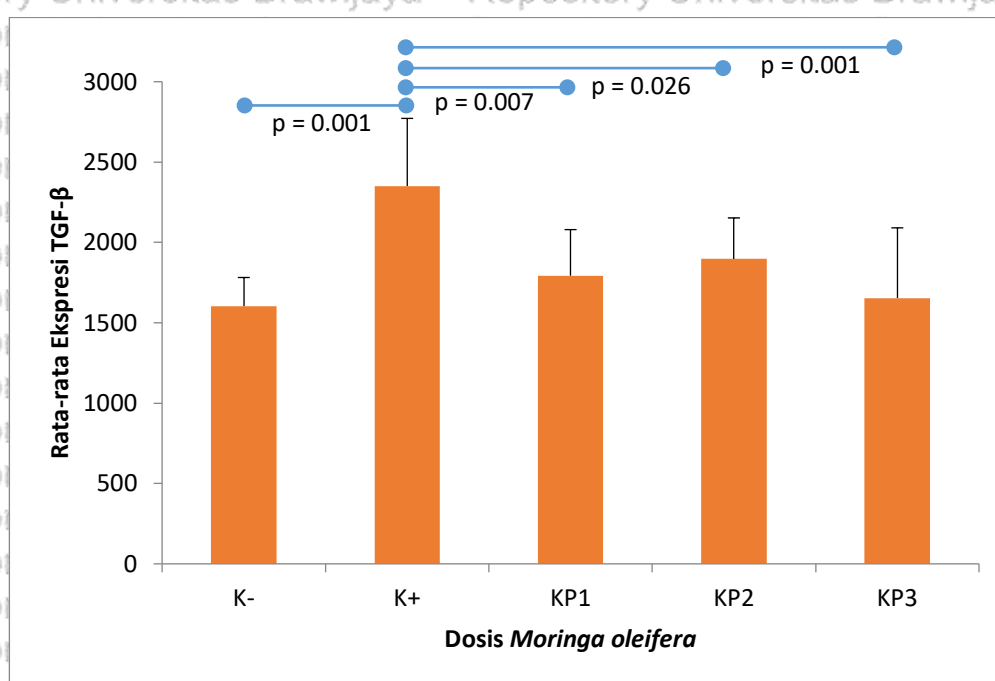
Pada perbandingan antara kelompok kontrol positif (K+) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa penurunan ekspresi TGF- β secara signifikan terjadi pada semua kelompok perlakuan. Hal ini ditunjukkan pada Tabel 5.6, nilai p-value semua kelompok perlakuan kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) serta pada Tabel 5.5, nilai



rata-rata $\pm$ sd semua kelompok perlakuan lebih rendah dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif.

Pada perbandingan antara kelompok K-negatif dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa pemberian *Moringa oleifera* semua dosis (KP1, KP2, dan KP3) tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini ditunjukkan pada Tabel 5.6, nilai p-value semua kelompok perlakuan lebih dari 0.05 ($p > 0.05$) serta pada Tabel 5.5 nilai rata-rata $\pm$ sd semua kelompok perlakuan memuat huruf yang sama dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini mengandung pengertian bahwa pemberian *Moringa oleifera* semua dosis mampu menurunkan ekspresi TGF- β hingga mendekati tikus kondisi normal.

Rata-rata ekspresi TGF- β kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :



Grafik 5.2. Histogram Rata-Rata Ekspresi TGF- β



Pada grafik 5.2. ditunjukkan histogram rata-rata ekspresi TGF- β semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok K-Positif, terlihat bahwa rata-rata ekspresi TGF- β menurun pada semua kelompok perlakuan pemberian *Moringa oleifera*. Secara statistik, terbukti bahwa penurunan signifikan ekspresi TGF- β terjadi pada pemberian *Moringa oleifera* semua level dosis.

5.3.3 Pengujian Pengaruh *Moringa oleifera* Terhadap Fibrosis dengan Uji Kruskal-Wallis

Berikut hasil pengujian pengaruh pemberian *Moringa oleifera* dengan beberapa level dosis terhadap derajat fibrosis dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis.

Tabel 5.7 Pengujian Pengaruh *Moringa oleifera* Terhadap Derajat Fibrosis dengan Uji Kruskal-Wallis dan |Ri-Rj| 5%

Kelompok	Fibrosis				Notasi
	F0	F1	F2	F3	
K-Negatif	6 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	a
K-Positif	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (20%)	d
KP1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (20%)	d
KP2	0 (0%)	0 (0%)	1 (3.3%)	5 (16.7%)	c
KP3	0 (0%)	2 (6.7%)	4 (13.3%)	0 (0%)	b
p-value	0.000				

Keterangan: Pada notasi, jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$).



Berdasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis, didapatkan p-value sebesar 0.000, lebih kecil daripada $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$).

Sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian *Moringa oleifera* terhadap derajat fibrosis. Atau dengan kata lain, terdapat perbedaan yang signifikan Derajat Fibrosis akibat pemberian *Moringa oleifera* dengan dosis yang berbeda.

Berdasarkan pada hasil uji $|R_i - R_j|$ 5 % pada Tabel 5.7 di atas, perbandingan antara kelompok K-Negatif dengan K-Positif, ditunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok K-Negatif dengan K-Positif.

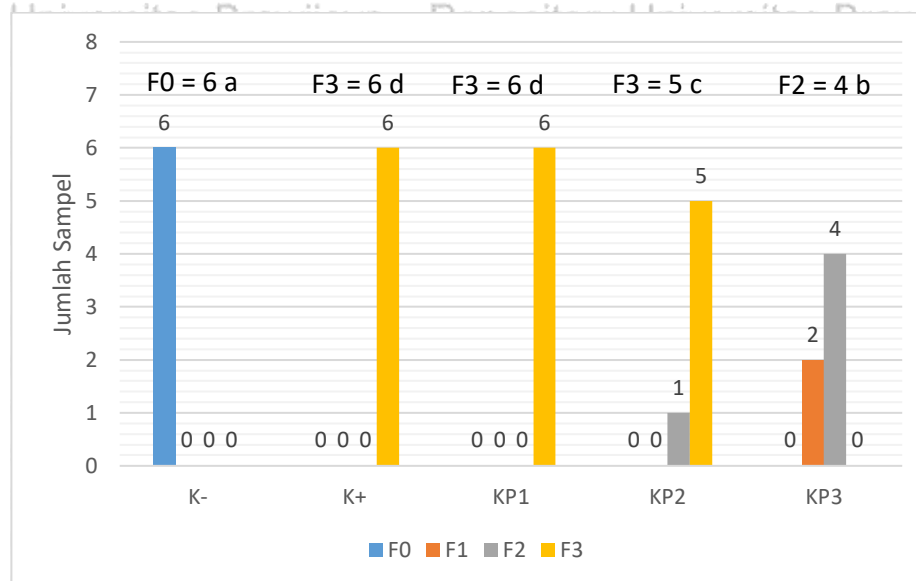
Hal ini ditunjukkan dari notasi yang memuat huruf yang berbeda pada kedua kelompok tersebut. Perbedaan yang signifikan membuktikan bahwa induksi CCL4 terbukti berdampak pada peningkatan derajat fibrosis secara signifikan.

Pada perbandingan antara kelompok kontrol positif (K-Positif) dengan kelompok perlakuan, ditunjukkan bahwa penurunan Derajat Fibrosis terjadi pada kelompok pemberian *Moringa oleifera* dengan dosis 300 mg/kgBB/hari (KP2) dan dosis 600 mg/kgBB/hari (KP3). Hal ini ditunjukkan dari menurunnya jumlah sampel F3 dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol positif. Sedangkan pada kelompok pemberian *Moringa oleifera* dengan dosis 150 mg/kgBB/hari, ditunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan derajat fibrosis dengan kelompok kontrol positif (K-Positif).

Pada perbandingan antara kelompok kontrol negatif (K-Negatif) dengan perlakuan, ditunjukkan bahwa pemberian *Moringa oleifera* semua dosis berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini ditunjukkan dari jumlah sampel yang tidak ada F0 di semua kelompok perlakuan dan memuat huruf yang berbeda dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini mengandung pengertian bahwa pemberian *Moringa oleifera* semua dosis belum mampu menurunkan derajat fibrosis hingga mendekati tikus kondisi normal.



Proporsi derajat fibrosis kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram berikut :



Grafik 5.3. Histogram Proporsi Derajat Fibrosis

Pada grafik 5.3 ditunjukkan histogram proporsi derajat fibrosis semua kelompok kontrol dan perlakuan. Dimulai dari kelompok K-Positif, terlihat bahwa derajat fibrosis menurun secara signifikan pada pemberian *Moringa oleifera* dengan 300 mg/kgBB/hari (KP2) dan dosis 600 mg/kgBB/hari (KP3). Berdasarkan hasil pengujian, terbukti bahwa penurunan derajat fibrosis secara signifikan terjadi pada pemberian *Moringa oleifera* dengan dosis 300 mg/kgBB/hari (KP2) dan dosis 600 mg/kgBB/hari (KP3).



BAB VI PEMBAHASAN

Sel *stellate* hati (Hepatic Stellate Cell [HSC]) memiliki peranan penting dalam proses terjadinya fibrosis hati. Ketika HSC teraktivasi (activated HSC (aHSC)) akan mengalami perubahan fungsi dan morfologis dan menjadi sumber utama produksi ECM sebagai sumber utama kolagen yang akan berakhir menjadi fibrosis. Reactive oxygen species (ROS) dan mediator fibrogenik (CXC chemokines, KC dan MIP-2) serta sitokin inflamasi berperan dalam mengaktifkan HSC. TGF- β 1 merupakan sitokin yang berperan penting dalam mengaktivasi HSC serta dengan memediasi *cross-talk* antara parenkim, sel-sel inflamasi dan sel-sel yang mengekspresikan kolagen (Fabregat I., et al. 2016).

Dalam penelitian ini menunjukan kenaikan yang signifikan TGF- β 1 pada kelompok dengan fibrosis hati tanpa perlakuan yang di induksi oleh CCL4 bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal yang sama juga ditemukan pada pada penelitian yang menggunakan CCL4 oleh Jeong, D. H., et al. (2005), dan Wu, Xiao-Ling, et al. (2008). Hal ini dimungkinkan CCL4 dimetabolisme oleh sitokrom P450 2E1 untuk membentuk suatu radikal trichloromethyl reaktif (CCL3-) dan radikal trichloromethyl peroxy (CCl3O2). Radikal bebas tersebut akan mengaktivasi sel Kupffer yang akan mengeluarkan sitokin-sitokin proinflamasi maupun profibrotik yang akan memfasilitasi terjadinya fibrosis hati (Lee G-P, et al. 2005). Dengan demikian, penelitian ini telah sejalan dengan penelitian dan teori sebelumnya yang menyatakan bahwa kadar TGF- β 1 yang tinggi, sebagai konsekuensi dari kerusakan hati kronis akan mengakibatkan aktivasi sel-sel stellata menjadi myofibroblast dan kematian sel hepatosit yang masif, yang



berkontribusi pada terjadinya fibrosis hati dan kemudian menjadi sirosis (Fabregat I., et al. 2016).

Dalam mengaktivasi HSC, TGF- β 1 mengawali dengan berikatan pada reseptor T β R-II pada permukaan sel HSC yang akan memicu heteromerisasi dan transfosforilasi reseptor T β R-I. Sinyal dari TGF- β 1 akan dihantarkan melalui fosforilasi reseptor T β R-I yang berasosiasi dengan Smad2 dan Smad3, yang selanjutnya akan terjadi proses oligomerisasi dengan Smad4 membentuk kompleks heteromer yang akan bertranslokasi ke nukleus dan berfungsi sebagai faktor transkripsi yang akan menginduksi aktivasi HSC yang selanjutnya terdiferensiasi menjadi myofibroblast. Disisi lain, TGF- β 1 juga mengaktivasi alur p38 MAPK yang selanjutnya akan memicu fosforilasi Smad3, dan terbentuknya kompleks heteromer (bersama Smad4). TGF- β 1 juga dalam mengaktivasi HSC, melibatkan jalur *receptor for activated C-kinase 1* (RACK1) yang berkontribusi terhadap diferensiasi, proliferasi, dan migrasi. Selama proses fibrogenesis, HSC yang teraktivasi, dengan sinyal dari TGF- β 1 melalui jalur Smad3 dan jalur ERKs, JNK, p38, STAT3 akan mengekspresikan CTGF (connective tissue growth factor) yang berperan dalam produksi ECM (extra cellular matrix), menurunkan degradasinya dengan meningkatkan *matrix metalloproteinases* (MMP) dan menurunkan *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMP) (Fabregat I., and Caballero-Diaz, D. 2018).

Moringa oleifera dapat menghambat proses fibrogenesis hati dengan berinteraksi secara langsung terhadap T β RII pada proses fosforilasi TGF- β 1. Hal ini berdasarkan penelitian Su-Hyun Park dan Young-Chae Chang (2012), yang mendapatkan bahwa ekstrak akar *Moringa oleifera* secara selektif menghambat fosforilasi T β RII yang diinduksi TGF- β 1 pada jalur pensinyalan hilir (diantaranya Smad4), dan fosfo-ERK, tetapi tidak JNK, p38, atau PI3K / AKT sehingga menekan tingkat ekspresi protein/mRNA, kolagen tipe I, fibronektin, dan PAI-1. Temuan Su-Hyun Park dan Young-Chae Chang yang menunjukkan ekstrak akar *Moringa*



oleifera dapat menghambat fosforilasi T β RII, hampir mirip dengan studi peneliti-peneliti sebelumnya yang mengintervensi aktivitas TGF- β dalam strategi pengobatan fibrosis hati. Seperti yang dilakukan Qi Z, et al (1999) yang menggunakan adenovirus yang disuntikkan ke vena porta untuk mengeliminasi sinyal yang dikirimkan reseptor TGF- β tipe II. Dalam penelitiannya, Qi dan kawan-kawan mendapatkan pada tikus yang diberikan adenovirus secara dramatis terjadi reduksi terhadap perkembangan fibrosis hati. Secara imunohistokimia menunjukkan bahwa ekspresi kolagen tipe I, fibronektin dan *alpha-smooth muscle actin* (sebagai penanda sel-sel stellat teraktivasi) menurun secara nyata pada tikus yang diberikan dengan adenovirus. Yang menarik, ekspresi TGF- β 1 endogen itu sendiri menurun pada tikus ini.

Dalam hal mempertimbangkan strategi memblokir aktivitas TGF- β sebagai terapi fibrosis pada manusia, sangat menggembirakan bahwa tidak ada strategi penghambatan TGF- β yang dilaporkan membahayakan kesehatan hewan coba, setidaknya ketika digunakan selama beberapa minggu. Namun, TGF- β 1 memiliki peran imunomodulator dan antiinflamasi, yang berkontribusi pada kesehatan normal. Pada tikus homozigot yang mengalami mutasi gen kehilangan fungsi TGF- β 1 didapatkan leukosit mononuklear menyusup ke banyak organ yang mengakibatkan peradangan multifokal yang diikuti oleh cachexia dan, akhirnya, kematian (Boivin GP, et al. 1995; Bottinger EP, et al. 1997). Oleh karena itu, toleransi terhadap inhibitor TGF- β selama periode waktu yang lebih lama perlu dinilai.

Ekspresi TGF- β 1 yang rendah pun berperan dalam perbaikan fibrosis hati. Hal ini dapat dilihat dalam penelitian yang dilakukan Schnur J, et al (2004) mendapatkan bahwa pada tikus transgenik yang mengekspresikan TGF- β 1 yang lebih rendah dan stabil lebih bertahan terhadap fibrosis. Dalam penelitian ini, fibrosis hati diinduksi oleh pemberian thioacetamide (TAA) dalam air minum. Studi



Schnur dan rekan meneliti perkembangan, dan pemulihan terhadap fibrosis hati yang diinduksi TAA pada tikus, hal ini memberikan banyak bukti bahwa TGF- β 1 memainkan peran penting dalam fibrogenesis jaringan. Pengaruh TGF- β 1 terhadap fibrosis hati berkaitan dengan pengaruhnya terhadap matriks metalloproteinase. Schnur dan rekan, mendapatkan MMP-2 meningkat pada tikus yang mengekspresikan lebih tinggi TGF- β 1. MMP-2 yang meningkat berperan dalam peningkatan deposit kolagen khususnya kolagen tipe I. Walau dalam penelitian Schnur dan rekan tidak menyebutkan sumber MMP-2, namun diketahui bahwa sumber enzim ini berasal dari HSC yang teraktivasi. Dengan demikian dapat disimpulkan penurunan ekspresi TGF- β 1 akan berpengaruh terhadap sel HSC teraktivasi dalam memproduksi MMP-2.

Hingga saat ini masih belum ada data yang dapat menjelaskan mekanisme penurunan ekspresi TGF- β 1 yang diberikan Moringa oleifera (Feustel S, et al. 2017). Kami memperkirakan, penurunan TGF- β 1 karena penghambatan fosforilasi TGF- β 1 di HSC, sehingga menurunkan HSC yang teraktivasi yang mengakibatkan penurunan ekspresi TGF- β 1 yang disekresikan oleh HSC teraktivasi. Namun demikian dibutuhkan penelitian lanjutan untuk mengetahui mekanisme Moringa oleifera dalam menurunkan ekspresi TGF- β 1.

Disisi lain, pada penelitian kami, bila kita melihat ekspresi TGF- β pada ketiga kelompok perlakuan KP1-KP3 (dosis 150mg/Kg, 300 mg/Kg, 600 mg/Kg), didapatkan hasil yang tidak berbeda secara signifikan satu sama lain dan tidak ada perbedaan secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok K-negatif, namun memberikan hasil yang berbeda terhadap derajat fibrosis pada ketiga kelompok perlakuan dengan perbaikan dimulai pada KP2 (1 sampel derajat F2 ; dosis 300 mg) dan lebih banyak sampel (2 sampel dengan derajat F1, 4 sampel dengan derajat F2) pada kelompok KP3 (dosis 600 mg/Kg). Hal ini kemungkinan ada faktor lain yang dipengaruhi oleh MO dalam perbaikan derajat fibrosis yang



membutuhkan dosis lebih besar. Faktor-faktor ini dapat diantaranya stress oksidatif dan atau sitokin inflamasi, karena efek utama yang diketahui dari *Moringa oleifera* adalah sebagai antioksidan dan antiinflamasi (Hamza A. 2010; Sivasankari, B. et al 2014). Hal ini juga sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Almatrafi, M., et al. (2017) pada hewan marmut, didapatkan pada pemberian MO dosis tinggi (15 g/100 g), sitokin inflamasi hepar yaitu IL-1 β , IL-10 dan IFN γ lebih rendah secara signifikan bila dibandingkan dengan dosis MO 10g/100g, dan grup kontrol. Sedangkan sitokin IL-6, MCP-1 and TNF α tidak berbeda bermakna pada ketiga grup. Selain faktor diatas, bisa jadi karena perbedaan respon sinyal Smad pada aktivitas HSC dan myofibroblast yang sudah terdifferensiasi secara penuh terhadap pemberian dosis *Moringa oleifera* yang berbeda. Hal ini berdasarkan penelitian Dooley, S, et al. (2000), yang mendapatkan bahwa terdapat perbedaan kualitatif dan atau kuantitatif aktivitas SMAD di HSC dan Myofibroblast yang terdifferensiasi penuh, yang dapat mengubah sifat respon transkripsi yang diprakarsai oleh TGF- β 1. Meskipun demikian dibutuhkan penelitian lanjutan untuk mengetahui faktor-faktor lain yang berpengaruh terhadap efek moringa oleifera terhadap fibrogenesis hati.

Hal yang berbeda dengan penelitian kami terhadap penelitian yang dilakukan oleh Moustafa EM, et al (2015) yang menggunakan tikus betina dan pewarnaan ELISA, kami menggunakan tikus jantan dengan pertimbangan karena hormon estrogen akan mempengaruhi proses fibrosis hati (Lee, Y. H., et al. 2019) dan kami menggunakan pewarnaan dengan metode *immunofluorescence*, hal ini berdasarkan penelitian Khan, S. A., et al (2012) yang menyimpulkan bahwa bioassay secara signifikan lebih sensitif daripada ELISA dalam mendeteksi TGF- β aktif dalam serum serta TGF- β aktif dan total dalam jaringan organ padat.



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Penelitian yang dilakukan untuk mengetahui efek pemberian *Moringa oleifera* terhadap ekspresi TGF β -1 di aHSC pada tikus yang model fibrosis hati yang diinduksi CCl₄, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Ekspresi TGF- β 1 di aHSC pada tikus model fibrosis hati lebih tinggi bila dibandingkan dengan tikus normal
2. Ekspresi TGF- β 1 di aHSC pada tikus model fibrosis hati yang diberikan *Moringa Oleifera* lebih rendah bila dibandingkan dengan tikus model fibrosis hati yang tidak diberikan *Moringa Oleifera*
3. Terdapat korelasi antara penurunan ekspresi TGF- β 1 terhadap derajat fibrosis hati akibat pemberian ekstrak daun *Moringa oleifera* pada tikus model fibrosis hati.

7.2 Saran

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diberikan beberapa saran diantaranya:

1. Melakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui mekanisme penurunan TGF- β 1 terhadap pemberian *Moringa oleifera*.
2. Melakukan penelitian lanjutan terhadap jalur smad3 terhadap HSC dan myefibroblast dan atau sitokin inflamasi, stress oksidatif yang dipengaruhi oleh pemberian *Moringa oleifera*.