



UNIVERSITAS INDONESIA

EFEK PEMBERIAN SEL PUNCA MESENKIM ASAL TALIPUSAT MANUSIA TERHADAP STRES OKSIDATIF HATITIKUS MODEL CEDERA KRONIS

TESIS

LENNY SETIAWATI

2106770574

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
JUNI 2023**



UNIVERSITAS INDONESIA

**EFEK PEMBERIAN SEL PUNCA MESENKIM ASAL TALI
PUSAT MANUSIA TERHADAP STRES OKSIDATIF HATI
TIKUS MODEL CEDERA KRONIS**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister

LENNY SETIAWATI

2106770574

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
JUNI 2023**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Lenny Setiawati

NPM : 2106770574

Tanda Tangan :



Tanggal : 19 Juni 2023

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh

Nama : Lenny Setiawati
NPM : 2106770574
Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Efek Pemberian Sel Punca
Mesenkim Asal Tali Pusat Manusia Terhadap Stres
Oksidatif Hati Tikus Model Cedera Kronis

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing 1 : dr. Isabella Kurnia Liem, M.Biomed, PhD, PA

(.....*Fellelium*.....)

Pembimbing 2 : Dr. Dra. Puspita Eka Wuyung, MS

(.....*P. Wuyung*.....)

Penguji 1 : Dr. dr. Ria Margiana, M.Biomed

(.....*Ria Margiana*.....)

Penguji 2 : Prof.Dr.rer.physiol.dr. Septelia Inawati Wanandi

(.....*Septelia Inawati Wanandi*.....)

Penguji 3 : dr. Lia Damayanti, M.Biomed, SpPA

(.....*Lia Damayanti*.....)

Ditetapkan di : Jakarta
Tanggal : 14 Juli 2023



Ketua Program Magister Ilmu Biomedik
Prof. Dr. Wawaimuli Arozal, M.Biomed, Pharm D

ABSTRAK

Nama : Lenny Setiawati
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Judul : Efek Pemberian Sel Punca
Mesenkim Asal Tali Pusat Manusia Terhadap Stres
Oksidatif Hati Tikus Model Cedera Kronis

Stres oksidatif telah diketahui menimbulkan efek yang merusak. Dalam fibrosis hati, stres oksidatif seolah-olah membentuk lingkaran setan yang menyebabkan perburukan fibrosis hati. Dalam hal ini, *Nuclear Erythroid 2-Related Factor 2* (Nrf2) sebagai regulator antioksidan akan mengaktifkan sistem pertahanan antioksidan tubuh yang dapat memutus mata rantai fibrosis. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa ekspresi Nrf2 pada jaringan hati, menganalisa kadar Malondialdehyde (MDA) sebagai oksidan bebas dan *Glutathione* (GSH) sebagai pemulung oksidan. Selain itu, juga menilai pengaruh pemberian Sel Punca Mesenkim asal Tali Pusat (SPM-TP) 1 juta dan 3 juta pada fibrosis hati. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan bahan biologis tersimpan berupa jaringan hati tikus *Wistar* 14 minggu. Terdapat empat kelompok perlakuan yaitu, kelompok sehat, kelompok 2AAF/CCL4, kelompok 2AAF/CCL4 yang diberikan SPM-TP 1 juta dan 3 juta dengan menggunakan tiga parameter yang diperiksa pada masing-masing kelompok yaitu, MDA, GSH, dan Nrf2. Pemeriksaan MDA dan GSH dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer, sedangkan pemeriksaan Nrf2 dinilai dengan menggunakan pulasan imunohistokimia dan kuantifikasi dengan *ImageJ (IHC Profiler)*. Data terdistribusi normal yang diperoleh diuji dengan *one way ANOVA* dan diuji *post hoc Tukey* sedangkan data tidak terdistribusi normal diuji dengan *Kruskal Wallis* dan *post hoc Mann Whitney*. Dari data-data tersebut didapatkan penurunan kadar MDA, peningkatan kadar GSH serta ekspresi Nrf2 pada kelompok yang diberikan SPM-TP 1 juta sedangkan pada kelompok yang diberikan SPM-TP 3 juta tidak menunjukkan hasil yang lebih baik.

Kata kunci: 2AAF/CCL4, malondialdehyde, GSH, Nrf2, regenerasi hati

ABSTRACT

Name : Lenny Setiawati
Study Program : Master's Programme in Biomedical Sciences
Title : The effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell against oxidative stress in the liver of chronic injured rats

Oxidative stress has been known to have deleterious effects. In liver fibrosis, oxidative stress seems to form a vicious circle that causes liver fibrosis to worsen. In this case, Nuclear Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) as an antioxidant regulator will activate the body's antioxidant defense system which can break the chain of fibrosis. This study aims to analyze the expression of Nrf2 in liver tissue, also the levels of Malondialdehyde (MDA) as a free oxidant and Glutathione (GSH) as an oxidant scavenger. In addition, it also assessed the effect of giving Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (UCMSCs) 1 million and 3 million on liver fibrosis. This study was an experimental study using stored biological material in the form of 14-week-old Wistar rat liver tissue. There were four treatment groups, namely the healthy group, the 2AAF/CCl₄ group, the 2AAF/CCl₄ group who were given UCMSCs 1 million and 3 million using three parameters examined in each group, namely MDA, GSH, and Nrf2. MDA and GSH examinations were carried out using a spectrophotometer, while the Nrf2 examination was assessed using immunohistochemical staining and quantification with ImageJ (IHC Profiler). Normally distributed data obtained was tested with one way ANOVA and Tukey's post hoc test while data that is not normally distributed was tested with Kruskal Wallis and post hoc Mann Whitney. From these data it was found a decrease in MDA levels, an increase in GSH levels as well as Nrf2 expression in the group given UCMSCs 1 million while the group given UCMSCs 3 million showed no better results.

Keywords: 2AAF/CCl₄, malondialdehyde, GSH, Nrf2, liver regeneration

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang menciptakan segala sesuatunya dan membuat segala sesuatu yang tidak mungkin menjadi mungkin. Penulis ucapkan terima kasih karena atas berkat dan rahmatNya maka penelitian dan penyusunan tesis ini dapat terlaksana dengan baik. Selain itu, ucapan terima kasih juga penulis haturkan atas dukungan baik moril maupun materiil yang diberikan oleh berbagai pihak. Dengan segala kerendahan hati, penulis hendak mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

- Ayahanda Gunawan Wibisono dan Ibunda Mariana Indrawati beserta Ayah mertua Husin Johan dan Ibu mertua Nelly Christina yang selalu mendoakan dan memberikan dukungan kepada penulis hingga saat ini.
- Suamiku tercinta Hendra dan anak-anakku tersayang, Charlize dan Denzel yang selalu mendukung dan sabar serta berusaha mengerti selama penulis melangsungkan studi dengan berbagai kesulitannya.
- Adik-adikku tersayang Lily, Andrew, Indra, Stessia, dan Kevin yang selalu peduli dan banyak membantu penulis di kala terdesak.
- Prof. Dr. dr. Ari Fahrial Syam, SpPD-KGEH., MMB-FINASIM, FACP selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Prof. dr. Wawaimuli Arozal, M.Biomed, PhD selaku Ketua Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia sekaligus Ketua Sidang dalam ujian Tesis penulis
- Ibu Sasanthy Kusumaningtyas, M.Biomed selaku Kepala Departemen Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang sabar dan baik hati
- dr. Isabella Kurnia Liem, M.Biomed, PhD, PA selaku Pembimbing I yang selalu mendukung, menjadi ibu, kakak, mentor, serta sahabat bagi penulis
- Dr. Dra. Puspita Eka Wuyung, MS selaku Pembimbing II yang selalu dengan sabar membimbing penulis
- Dr. dr. Ria Margiana, M.Biomed selaku Penguji I sekaligus Ketua Peminatan Anatomi, yang sabar dan selalu mendukung penulis

- Prof. Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi selaku Penguji II yang telah memberikan masukan-masukan yang membangun demi perbaikan tesis penulis
- dr. Lia Damayanti, M.Biomed, SpPA sebagai Penguji III yang juga telah memberikan masukan-masukan yang berharga demi perbaikan tesis penulis
- Ibu Rafika Indah Paramita, M.Farm., Apt selaku sekretaris sidang dalam ujian Tesis penulis
- Ibu Deswaty Furqonita, S.Si, M.Biomed selaku Staf Pengajar Anatomi yang keibuan, dan sabar dalam membimbing penulis selama studinya
- Dr. Rahmadini, M.Biomed selaku Staf Pengajar Anatomi yang selalu mengajar penulis dengan sepenuh hati
- Drg. Haamid Hasan Haikal, M.Biomed selaku Staf Pengajar Anatomi yang sangat hebat, sangat detil, namun juga sangat baik mengajar penulis
- Dr. dr. Raditya Wratsangka, SpOG (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti
- Rekan kerja sekaligus Staf Pengajar Anatomi Fakultas Kedokteran Trisakti yang telah memberikan dukungan kepada penulis selama mempelajari Ilmu Anatomi
- dr. I Made Rayo Putra Indrawan, adik, sahabat, sang buku berjalan, sekaligus teman seperjuangan dalam menjalani studi Ilmu Anatomi yang banyak membantu penulis belajar Diseksi Anatomi
- Ibu Firda Asma'ul Husna yang selalu siap membantu dan banyak memberikan masukan kepada penulis dalam banyak hal
- dr. Anggun Lestary Husein dan Siti Mutmainah Dukomalomo, teman seperjuangan dalam tim penelitian dan ujian tesis yang selalu memberikan semangat ketika penulis ingin menyerah
- Ibu Sri, Mas Achmad, Mas Agay dari Laboratorium Terpadu FKUI serta mas Arif Nurdianto dari laboratorium Biokimia yang selalu siap membantu penulis ketika penulis kesulitan dalam penelitian
- Mba Hesti, Feby dan Indah dari tim Biozatik yang selalu setia menemani penulis ketika penelitian berlangsung

- Staf administrasi dan pengawetan jenazah Departemen Anatomi FKUI yang telah banyak membantu penulis selama masa studinya
- Semua pihak yang penulis tak dapat sebutkan satu per satu

Semoga Tuhan selalu menjaga, melindungi, dan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu penulis baik selama masa studi dan penyelesaian tesis ini.

Adapun tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Magister Biomedik dari Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dengan kekhususan Anatomi. Tesis ini berisi hasil penelitian yang dilakukan oleh penulis yang menilai efek pemberian sel punca mesenkim asal tali pusat dosis satu dan tiga juta sel pada status redoks tikus cedera hati kronis. Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam tesis ini. Oleh karena ini penulis akan sangat senang menerima saran dan kritik yang membangun. Besar harapan penulis bahwa tesis ini dapat memberikan sumbangsih bagi ilmu pengetahuan khususnya Ilmu Biomedik dalam bidang *Developmental Biology*.

Jakarta, Juni 2023



Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Lenny Setiawati
NPM : 2106770574
Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik
Kekhususan : Anatomi
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Tesis

demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-Exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

“Efek Pemberian Sel Punca Mesenkim asal Tali Pusat Manusia Terhadap Stres
Oksidatif Hati Tikus Model Cedera Kronis”

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis / pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : 19 juni 2023

Yang menyatakan



Lenny Setiawati

DAFTAR ISI

BAB I.....	1
PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Pertanyaan Penelitian.....	4
1.4. Tujuan Penelitian.....	5
1.5. Manfaat Penelitian.....	5
1.6. Kerangka Teori	6
1.7. Kerangka Konsep	7
BAB II.....	8
TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. Anatomi dan Fisiologi Hati Manusia Normal	8
2.2. Hewan Coba dalam Penelitian Eksperimental Fibrosis Hati	13
2.3. Stres Oksidatif dan Respon Antioksidan Endogen.....	16
2.4. Fibrosis Hati	24
2.5. Peranan Stres Oksidatif dan Sistem Antioksidan pada Fibrosis Hati	31
2.6. Regenerasi Hati.....	33
2.7. Efek Carbon Tetrachloride pada Hati.....	41
2.8. Efek 2-Acetylaminofluorene pada Hati	43
2.9. Sel Punca Mesenkim asal Tali Pusat Manusia	44
BAB III	52
METODE PENELITIAN.....	52
3.1. Desain Penelitian.....	52
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	52
3.3. Sampel Penelitian.....	52
3.4. Karakteristik Sel Punca Mesenkim Asal Tali Pusat Manusia	55
3.5. Prosedur Pembuatan Homogenat Jaringan	55
3.6. Prosedur Pemeriksaan Malondialdehyde (MDA).....	55
3.7. Prosedur Pemeriksaan Glutathione (GSH)	56
3.8. Pemeriksaan Ekspresi Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)	57
3.8.1. Prosedur Immunohistokimia	57
3.8.2. Kriteria Penilaian Ekspresi Nrf2	59
3.9. Pengolahan data.....	59

3.10. Alur Penelitian	60
BAB IV.....	61
HASIL.....	61
4.1. Hasil Pemeriksaan Malondialdehyde (MDA)	61
4.2. Glutathione (GSH).....	62
4.3. Hasil Ekspresi Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2).....	63
BAB V	71
PEMBAHASAN	71
BAB VI.....	78
KESIMPULAN & SARAN	78
DAFTAR PUSTAKA.....	79
LAMPIRAN	87

DAFTAR SINGKATAN

2-AAF	: 2-Acetylaminofluorene
ARE	: Antioxidant Response Element
ATMP	: Advanced Therapy Medicinal Product
ATP	: Adenosin Triphosphate
BAX/BAK	: Bcl-2-associated X / Bcl-2 homologous antagonist/killer binding motif
BRCA1	: Breast Cancer Gene 1
BTB	: Tramtrack and Bric-a-Brac
B-TrCP	: Beta-Transducin repeat-Containing Protein
bZIP	: basic leucin zipper
CAT	: Catalase
CCl3	: Trichloromethyl
CCl4	: Carbon Tetrachloride
CTGF	: Connective Tissue Growth Factor
CTR	: C-terminal region
CUL3/RBX1	: Cullin-based E3 ligase/Ring Box Protein-1
DAMPs	: Damage Associated Molecular Patterns
DDC	: diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine
DEN	: Diethylnitrosamine
DNA	: Deoxyribose Nucleic Acid
DPP3	: Dipeptidyl peptidase III
DSS	: Dextran Sulfat Sodium
Dvl	: Disheveled
EGFR	: Epidermal Growth Factor
EMT	: Epithelial to Mesenchymal Transition
FADH2	: Dihydroflavin Adenine Dinucleotide
GPx	: Glutathione Peroxidase
GR	: Glutathione Reductase
GS	: Glutamine Sintase
GSH	: Glutathione
GVHD	: Graft-versus-host disease
HGF	: Hepatocyte Growth Factor
HMGB1	: High Mobility Group Box 1
IL-1B	: Interleukin-1B
IVR	: Intervening Region
Keap1	: Kelch-like ECH-associated protein 1
LGR5	: Leucin-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor 5
Marf	: Mitochondrial associated regulatory factor
MDA	: Malondialdehyde
MMP	: Matrix Metalloproteinase
MST1	: Macrophage Stimulating 1
NADH	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) + Hydrogen (H)
NADPH	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NAFLD	: Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NES	: Nuclear Export Signal
NFE2L2	: Nuclear Factor Erythroid 2 Like 2

NF-KB	: <i>Nuclear Factor-Kappa B</i>
NIK	: <i>NK-KB-inducing kinase</i>
Nrf2	: <i>Nuclear Erythroid 2-Related Factor 2</i>
Nrx	: <i>Nucleoredoxin</i>
NTR	: <i>N-terminal region</i>
OGC	: <i>2-Oxoglutarate</i>
PAMPs	: <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PDGF	: <i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PEG	: <i>Polyethylene Glycol</i>
PPAR- γ	: <i>Peroxisome Proliferators-Activated Receptor-γ</i>
PUFA	: <i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
RAGE	: <i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>
RNS	: <i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RXR- α	: <i>receptor X retinoic alpha</i>
SHPC	: <i>Small Hepatocyte-like Progenitor Cells</i>
sMaf	: <i>small musculoaponeurotic fibrosarcoma</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
SPM	: <i>Sel Punca Mesenkim</i>
SPM-TP	: <i>Sel Punca Mesenkim asal Tali Pusat</i>
TF	: <i>Tissue Factor</i>
TFAM	: <i>Transcription Factor A Mitochondria</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor-Beta</i>
TIMPs	: <i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
TLR4	: <i>Toll-like receptor 4</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Wnt	: <i>Wingless/Integrated</i>
WTX	: <i>Wilms Tumor gene on chromosome X</i>
YAP/TAZ	: <i>Yes-associated protein / Transcriptional coactivator with PDZ-</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penyakit hati kronis masih menjadi masalah global yang belum terselesaikan hingga saat ini. Pada studi epidemiologi yang dilakukan pada tahun 2019, diketahui bahwa angka kejadian sirosis hati terus mengalami peningkatan sejak 2017. Sirosis hati telah menyebabkan 1,48 juta kematian di dunia atau meningkat sebesar 8,1% bila dibandingkan data tahun 2017. Selain itu, dari studi tersebut juga ditemukan bahwa saat ini sirosis hati merupakan penyebab disabilitas ke-16 tertinggi di antara seluruh penyakit dan ketujuh terbanyak pada usia 50-74 tahun.¹

Penyakit hati kronis mengalami beberapa peristiwa penting yang mendukung fibrogenesis, sehingga pada perkembangannya akan menjadi fibrosis hati dan berakhir dengan sirosis. Penelitian telah membuktikan bahwa fibrogenesis terutama disebabkan oleh aktivasi sel stellata hati.² Dalam hal ini, inflamasi dan stres oksidatif merupakan dua peristiwa kunci yang memicu aktivasinya. Cedera pada hati akan memicu proses inflamasi yang nantinya juga akan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Tidak hanya itu, bahan toksin atau bahan kimia tertentu penyebab cedera hati juga dapat memicu ketidakseimbangan ROS dan antioksidan yang berakibat pada terjadinya stres oksidatif. Hal ini menunjukkan bahwa ROS dapat menjadi suatu hal yang berperan penting sejak awal mula cedera.

ROS yang meningkat tanpa disertai peningkatan produksi antioksidan yang seimbang akan menyebabkan tubuh masuk dalam keadaan stres oksidatif yang menimbulkan berbagai mekanisme patologis dalam tubuh. Stres oksidatif telah diketahui berperan penting dalam berbagai penyakit metabolik, misalnya diabetes melitus, penyakit kardiovaskular, penyakit neurodegeneratif, bahkan keganasan.³ Keberadaan ROS yang tinggi di tubuh menandakan kegagalan tubuh dalam mempertahankan homeostasisnya, sehingga terjadi peroksidasi lipid, kerusakan sel, DNA, maupun protein. Dalam keadaan ini, Malondialdehyde (MDA) merupakan produk samping dari peroksidase lipid yang menandakan adanya stres

oksidatif. Pada cedera hati, ROS akan mengaktifkan berbagai jalur pensinyalan termasuk jalur inflamasi utama, *Nuclear Factor-Kappa B* (NF-KB), dan jalur pro fibrotik utama, *Transforming Growth Factor-Beta* (TGF- β), serta mengaktifkan jalur pro fibrotik lainnya, yakni *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF), *Wingless/Integrated* (Wnt), serta *Yes-associated protein/Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif* (YAP/TAZ), sehingga akan merubah arsitektur hati normal menjadi fibrosis.⁴ Namun, aktivasi jalur-jalur tersebut justru akan menghasilkan lebih banyak ROS. Bagaimana lingkaran setan, kaitan antara inflamasi, stres oksidatif, dan fibrosis menjadi sesuatu yang sulit untuk diputuskan dan semakin memperberat fibrosis hati hingga pada stadium terminal, gagal hati dan kematian pun terjadi.

Meskipun demikian, tubuh masih memiliki upaya untuk mengembalikan keseimbangannya dengan cara mengaktivasi *Nuclear Erythroid 2-Related Factor 2* (Nrf2), suatu faktor transkripsi yang akan meregulasi produksi antioksidan endogen termasuk *Glutathione* (GSH) yang terutama terkonsentrasi di hati. Meskipun Nrf2 diproduksi secara konsekutif, namun pada keadaan fisiologis, ROS hanya dihasilkan dalam jumlah kecil dari mekanisme transpor elektron pada rantai pernafasan. Hal ini menyebabkan hanya sedikit Nrf2 yang bebas di sitoplasma, sedangkan sebagian besar akan diikat oleh *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) untuk didegradasi di proteasom. Akan tetapi, pada stres oksidatif, ketidakseimbangan antara jumlah ROS dan antioksidan akan berimbas pada peningkatan jumlah Nrf2 yang bebas untuk menghasilkan lebih banyak antioksidan.^{5,6}

Hingga saat ini, transplantasi hati masih menjadi suatu *gold standard therapy* yang ditempuh untuk stadium terminal penyakit hati kronis. Akan tetapi, banyak komplikasi serta keterbatasan yang ditemukan pada transplantasi hati. Keterbatasan jumlah donor hati menjadi salah satu masalah yang belum terpecahkan. Begitu pula halnya dengan imunogenisitas, *ischemic-reperfusion injury*, serta berbagai masalah lain yang mungkin terjadi setelahnya.⁷ Di tengah meningkatnya angka kejadian sirosis hati, kebutuhan terapi lain yang dapat menggantikan transplantasi hati menjadi sesuatu yang sangat mendesak.

Oleh sebab itu, berbagai penelitian dilakukan untuk menemukan terapi alternatif lain yang dapat mengembalikan fungsi hati yang rusak menjadi lebih baik. Perkembangan ilmu pengetahuan saat ini telah menyajikan terapi berbasis sel sebagai suatu terapi yang menjanjikan. Dalam hal ini, sel punca telah menjadi suatu *Advanced Therapy Medicinal Product* (ATMP) yang dianggap memiliki potensi sebagai terapi untuk mengatasi fibrosis hati. Salah satu jenis sel punca yang digunakan adalah sel punca mesenkim asal tali pusat (SPM-TP). Dalam hal ini, SPM-TP dipilih karena sifatnya yang multipoten namun juga dapat diekstraksi dengan aman dan tanpa rasa sakit serta dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. SPM-TP juga telah terbukti memiliki efek proliferasi yang tinggi dengan imunogenisitas yang rendah dan dinilai memiliki risiko penularan infeksi yang lebih rendah bila dibandingkan dengan sel punca dari jaringan dewasa (sumsum tulang).⁸ Selain itu, jaringan tali pusat tidak bermasalah dari sisi etik, karena jaringan tali pusat dianggap sebagai produk limbah kelahiran.⁸

Studi mengenai SPM-TP sebelumnya telah berhasil menunjukkan bahwa SPM-TP melalui efek parakrinnya telah terbukti mampu menurunkan inflamasi.^{9,10} Sementara itu, berbagai penelitian terkait peranan stres oksidatif, serta peranan Nrf2 dan GSH secara terpisah telah dilakukan oleh Chan dkk (2021) menunjukkan bahwa regenerasi hati terjadi pada kelompok yang diberikan aktivator Nrf2 tetapi tidak terjadi pada kelompok dengan Nrf2 *null*.¹¹ Penelitian lain yang dilakukan oleh Hermansyah dkk (2021) berhasil membuktikan bahwa pemberian SPM-TP dapat menurunkan ekspresi TGF- β yang merupakan jalur pensinyalan utama fibrosis.¹² Sejalan dengan penelitian tersebut, penelitian oleh Zahari dkk (2020) juga membuktikan hal yang sama bahwa terdapat perbedaan bermakna pada penurunan ekspresi TGF- β antara kelompok tikus yang diberikan dan tidak diberikan SPM-TP.¹³

Dari berbagai penelitian yang telah dilakukan tampaknya terdapat harapan bahwa menurunkan stres oksidatif dapat menjadi suatu peluang yang mendukung terjadinya regenerasi hati. Namun, pada penelitian sebelumnya dalam payung penelitian ini belum pernah dilakukan uji yang menilai efek pemberian SPM-TP terhadap stres oksidatif.^{13,14,15} Penelitian sebelumnya hanya menilai efek pemberian SPM-TP dosis 1 juta terhadap parameter fibrosis, inflamasi, maupun

proliferatif, serta angiogenesis pada cedera hati kronis. Akan tetapi, beberapa dari penelitian tersebut meskipun menunjukkan adanya perbedaan, namun secara statistik hasil yang didapat tidak berbeda signifikan antara kelompok yang diberikan SPM-TP 1 juta dengan yang tidak. Sementara itu, beberapa penelitian di luar payung penelitian ini mengkonfirmasi adanya efek positif yang sejalan dengan peningkatan dosis SPM.^{16,17}

Oleh sebab itu, dilakukanlah penelitian yang mengamati beberapa parameter yang menandakan adanya stres oksidatif serta respon sistem antioksidan endogen yaitu, MDA, GSH, dan Nrf2 jaringan hati serta efek yang terjadi pada pemberian SPM-TP dosis yang berbeda untuk memahami peranan SPM-TP terhadap status redoks hati yang mengalami cedera kronis yang belum pernah dilakukan sebelumnya. Penelitian ini akan memberikan gambaran mengenai status redoks jaringan hati setelah pemberian SPM-TP. Selain itu, juga akan menggambarkan apakah pemberian dosis SPM-TP yang lebih tinggi akan memberikan hasil yang lebih baik dalam menurunkan stres oksidatif.

1.2. Rumusan Masalah

Meningkatnya angka kejadian sirosis hati di dunia, peranan stres oksidatif yang besar pada cedera hati kronis, serta adanya keterbatasan transplantasi hati sebagai terapi definitif cedera hati kronis tahap akhir, mendorong ditemukannya terapi alternatif. Dalam hal ini, melalui berbagai penelitian yang dilakukan sebelumnya, SPM-TP diketahui sebagai suatu terapi yang menjanjikan, namun masih membutuhkan penelitian lebih lanjut. Penelitian untuk melihat efek antiinflamasi SPM-TP telah dilakukan, namun efeknya terhadap stres oksidatif respon sistem antioksidan endogen pada cedera hati kronis belum pernah dilakukan. Maka, telah dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah pemberian SPM-TP juga dapat menurunkan stres oksidatif dalam jaringan hati pada tikus model cedera hati kronis.

1.3. Pertanyaan Penelitian

- a. Bagaimana pengaruh pemberian SPM-TP terhadap kadar MDA pada kelompok tikus cedera hati kronis?

- b. Bagaimana pengaruh pemberian SPM-TP terhadap kadar GSH pada kelompok tikus cedera hati kronis?
- c. Bagaimana pengaruh pemberian SPM-TP terhadap ekspresi Nrf2 pada kelompok tikus cedera hati kronis?
- d. Bagaimana ekspresi Nrf2 pada setiap zona hati tikus cedera hati kronis?

1.4. Tujuan Penelitian

a. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian SPM-TP manusia terhadap jalur stres oksidatif jaringan hati tikus model cedera kronis.

b. Tujuan Khusus

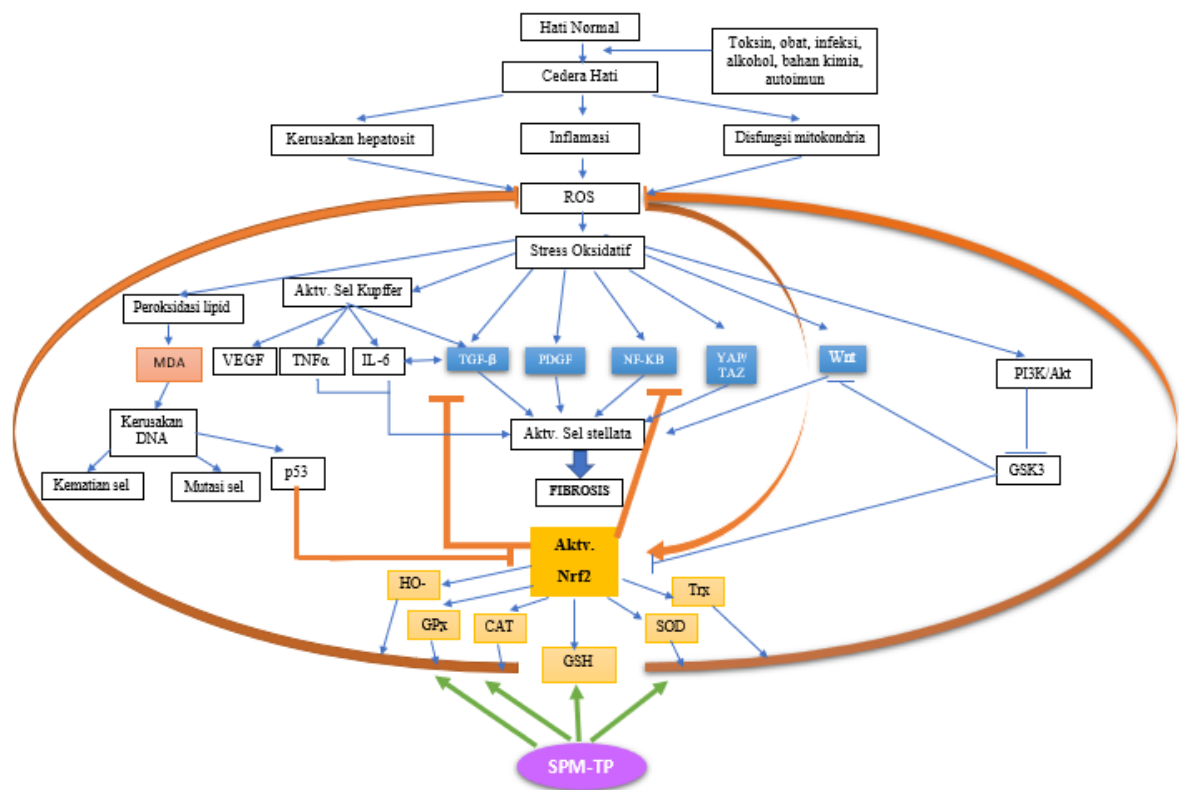
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui:

- Pengaruh pemberian SPM-TP manusia terhadap kadar MDA, kadar GSH, dan ekspresi Nrf2 pada jaringan hati tikus cedera hati kronis.
- Perbedaan pengaruh pemberian dua dosis berbeda SPM-TP terhadap kadar MDA, kadar GSH, dan ekspresi Nrf2 pada jaringan hati tikus cedera hati kronis.
- Distribusi ekspresi Nrf2 pada setiap zona hati tikus cedera kronis

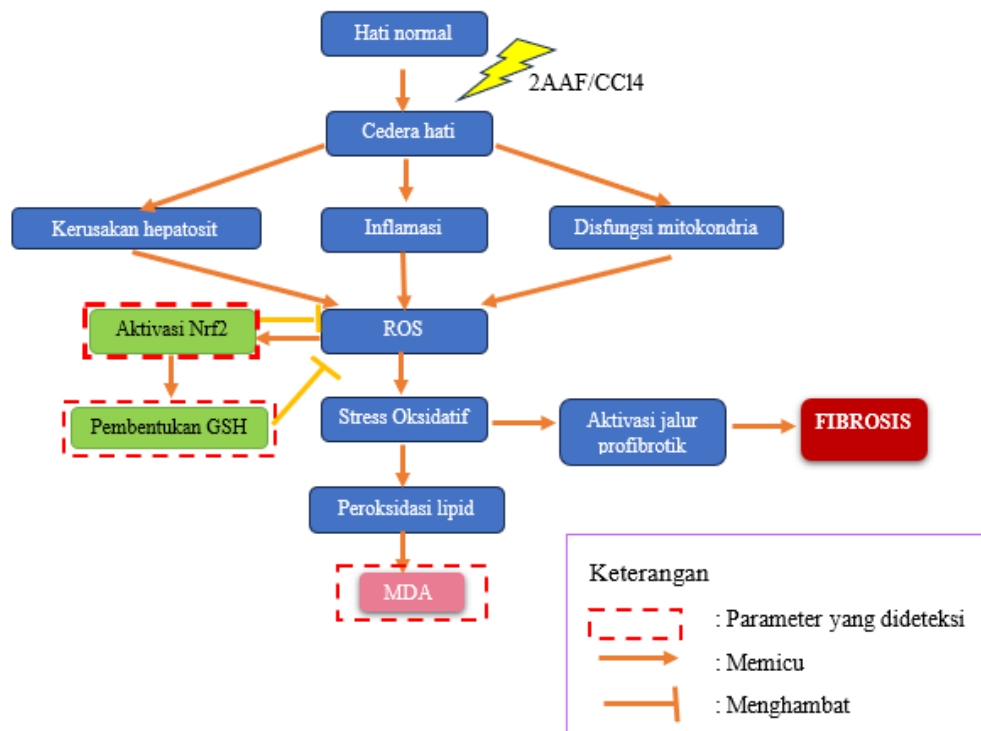
1.5. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini dapat memberikan pemahaman yang lebih baik mengenai peranan sel punca mesenkim asal tali pusat manusia yang merupakan salah satu *Advanced Therapy Medicinal Product (ATMP)* terhadap stres oksidatif. Melalui pemahaman yang lebih baik ini, diharapkan hasil penelitian ini juga dapat menjadi dasar penelitian lanjutan dalam penggunaan sel punca mesenkim asal tali pusat manusia pada kasus cedera hati kronis manusia (penelitian translasional), sehingga dapat menjadi terapi alternatif selain transplantasi hati yang dapat menolong penderitanya.

1.6. Kerangka Teori



1.7. Kerangka Konsep



1.8. Hipotesis

- Terdapat penurunan kadar MDA pada kelompok tikus cedera hati kronis yang diberikan SPM-TP dibandingkan dengan kelompok tikus cedera hati kronis yang tidak diberikan SPM-TP.
- Terdapat peningkatan kadar GSH pada kelompok tikus cedera hati kronis yang diberikan SPM-TP dibandingkan dengan kelompok tikus cedera hati kronis yang tidak diberikan SPM-TP.
- Terdapat peningkatan ekspresi Nrf2 pada kelompok tikus cedera hati kronis yang diberikan SPM-TP dibandingkan dengan kelompok tikus cedera hati kronis yang tidak diberikan SPM-TP.
- Terdapat perbedaan distribusi ekspresi Nrf2 antar zona pada setiap kelompok perlakuan

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Anatomi dan Fisiologi Hati Manusia Normal

2.1.1. Anatomi Hati Manusia Normal

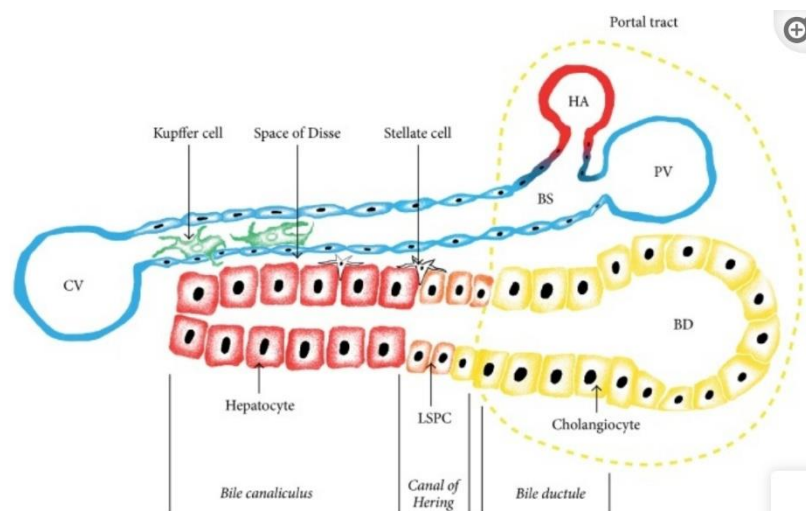
Secara makroskopis, hati manusia tampak sebagai organ terbesar yang mengisi rongga abdomen mulai dari hipokondrium kanan hingga ke epigastrium atau bahkan ke hipokondrium kiri. Organ yang berasal dari endoderm ini akan terus berkembang hingga mencapai usia 18 tahun dan mulai mengalami penurunan berat pada usia pertengahan. Pada orang dewasa, berat liver adalah sekitar 2% dari berat tubuh dengan ukuran yang bervariasi pada setiap orang dan dipengaruhi oleh jenis kelamin serta ukuran tubuh. Hati tampak berwarna coklat kemerahan dan tampak lebih kuning pada steatosis hati dan terdiri dari empat lobus yaitu, *lobus dextra* (kanan), *lobus sinistra* (kiri), *lobus quadratus*, serta *lobus caudatus*. *Lobus dextra* adalah lobus terbesar dari hati dan dipisahkan dengan *lobus sinistra* oleh *ligamentum falciforme* di bagian anterior dan superiornya, serta *ligamentum venosum* dan *fissura ligamentum teres hepatis* di bagian inferiornya.^{18,19}

Pada rongga abdomen, hati tetap dipertahankan pada tempatnya oleh faktor primer, sekunder, dan tersiernya. Faktor primer yang mempertahankan posisinya adalah perlekatannya pada dinding posterior *abdomen* menuju *vena cava inferior*, *vena hepatica*, dan *ligamentum triangulare* serta *ligamentum coronarium*. Sementara faktor sekunder adalah keberadaan ginjal kanan, *flexura colica dextra*, dan kompleks duodenopankreatikus. Selain itu, tidak kalah penting, perlekatannya dengan dinding abdomen anterior dan diafragma melalui *ligamentum falciforme* dikatakan sebagai faktor pendukung tersier.¹⁸

Sementara itu, pada hati terdapat suatu struktur penting yaitu, *porta hepatis* yang merupakan area tempat terdapatnya pembuluh darah, saraf, maupun kelenjar getah bening hati. *Porta hepatis* sendiri merupakan suatu fissura yang terletak di permukaan inferior dan berada di antara *lobus quadratus* dan *lobus caudatus* serta mengandung *vena portae hepatis*, *arteri hepatica*, *pleksus hepaticus*, *ductus hepaticus dextra* dan *sinistra* serta kelenjar getah bening hati.¹⁸

Dalam hal ini, *arteri hepatica* dan *vena portae hepatis* menjadi sistem vaskuler yang membawa darah masuk ke hati masing-masing sebesar 25% oleh *arteri hepatica* dan 75% darah oleh *vena porta*.^{19,20} Ketika *arteri hepatica* membawa darah teroksigenasi masuk ke dalam hati, *vena porta* membawa darah yang terdeoksigenasi namun kaya akan nutrisi dan antigen yang berasal dari sistem gastrointestinal. Selanjutnya, keduanya akan bercampur di dalam sinusoid hati lalu dialirkan keluar hati melalui *vena centralis*.²⁰

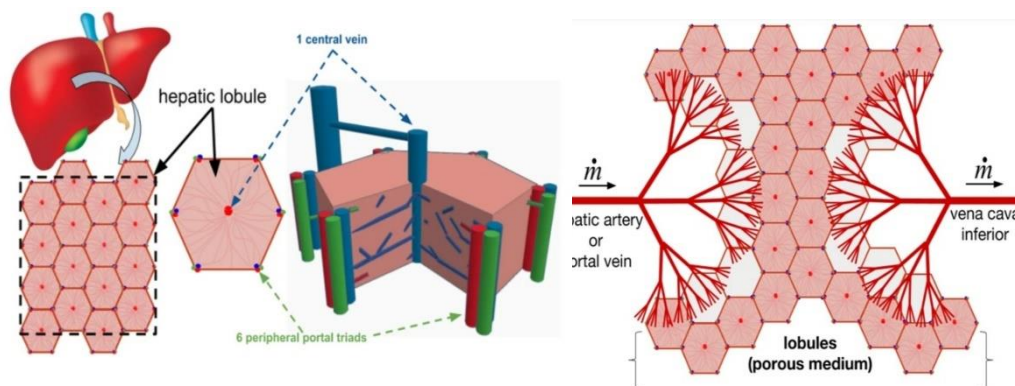
Akan tetapi, secara mikroskopis, arsitektur hati menunjukkan bangunan yang lebih kompleks. Tidak hanya menampilkan gambaran sinusoid hati, tetapi juga sel-sel yang ada di hati serta celah di antara sel tertentu yang penting untuk diketahui. *Space of Disse* dan *Canal of Hering* adalah dua buah celah penting yang tampak pada struktur mikroskopik hati. *Space of Disse* merupakan suatu celah atau ruang yang terletak di antara sinusoid dan parenkim hati (hepatosit), sedangkan *Canal of Hering* merupakan suatu celah yang terletak di antara hepatosit dan kolangiosit.²¹



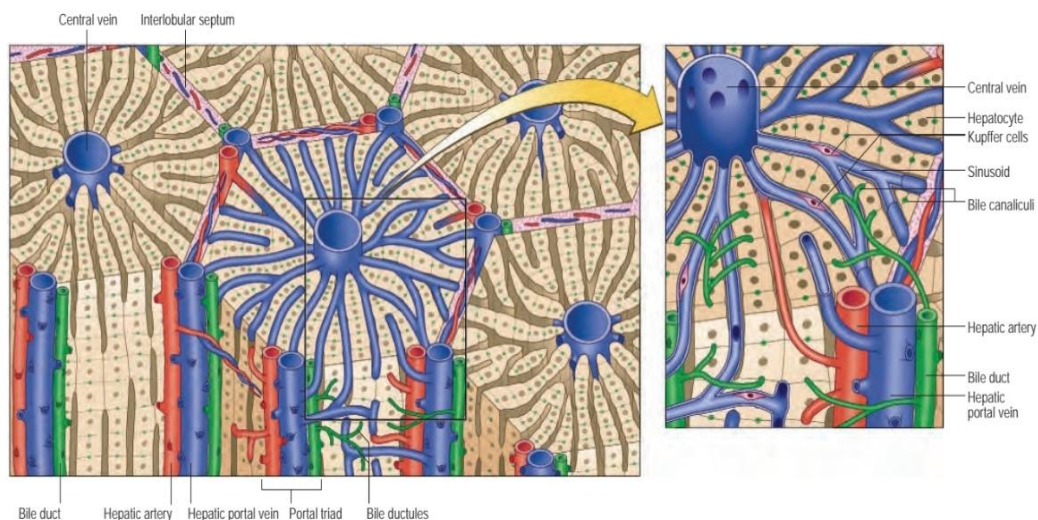
Gambar 2.1. Space of Disse dan Canal of Hering. Tampak sel stellata hati pada *Space of Disse* dan *Local Progenitor Stem Cell (LSPC)* pada *Canal of Hering*.²¹

Selain itu, gambaran mikroskopik hati juga menunjukkan hubungan vaskularisasi hati dan parenkim hati. Lorente dkk (2020) menggambarkan vaskularisasi hati bercabang seperti pohon (dendritik) dan mengalirkan darah ke sinusoid hati. Sinusoid hati akan tersebar di seluruh permukaan hati membentuk suatu sistem berpori dan bersama hepatosit akan membentuk unit fungsional

terkecil hati yaitu, lobulus. Dalam hal ini telah diketahui bahwa lobulus hati merupakan suatu struktur yang berbentuk segi enam yang mana terdapat triad porta (*arteri hepatica*, *vena portae hepatis*, dan *ductus biliaris*) pada setiap sudutnya. Pada bagian tengah lobulus terdapat *vena centralis* atau *vena hepatica*.²⁰ Akibat adanya susunan *vena centralis* yang dikelilingi oleh enam buah triad porta ini, maka selanjutnya hati terbagi menjadi tiga zona yaitu, zona 1 (periportal), zona intermediate (antara porta dan vena centralis), dan zona 3 (perisentral), yang nantinya akan berperan dalam kerja hati.



Gambar 2.2. Lobulus hati. Tampak sebagai struktur berpori berbentuk hexagonal dengan triad porta dan vena sentralisnya²⁰



Gambar 2.3. Struktur mikroskopik hati. Tampak sebagai struktur hexagonal dengan triad porta pada setiap sudutnya dan vena sentralis di tengahnya.¹⁸

Selain tampak lobulus hati dengan triad porta dan vena sentralisnya, struktur mikroskopik hati juga menunjukkan keberadaan sel-sel residen hati. Adapun hepatosit dikatakan sebagai sel utama terbanyak yang menyusun

parenkim hati yaitu, menempati sekitar 60% - 80% volume hati yang tersusun menjadi sekitar 15 lapisan sel konsentris dalam tiap lobulus.^{18,22} Dalam hal ini, hepatosit tampak sebagai sel yang berbentuk polihedral, dengan inti yang membulat, eukromatik, serta seringkali ditemukan dalam jumlah poliploidi. Akan tetapi, tidak hanya hepatosit, di hati juga terdapat sel-sel lainnya yaitu, sel stellata hati (Sel Ito) yang terletak di *Space of Disse* dan merupakan sel penyimpan vitamin A serta berperan penting dalam proses patologi hati, sel endotel sinusoid, sel Kupffer yang berperan sebagai makrofag hati, kolangiosit, sel punca hati yang terletak di *Canal of Hering*, sel *natural killer lymphocytes* (Sel Pit), dan sel-sel jaringan ikat hati.¹⁸

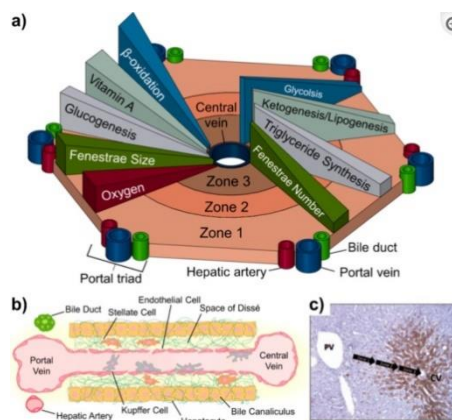
2.1.2. Fisiologi Hati Manusia Normal

Hati merupakan salah satu organ vital dalam tubuh manusia karena memiliki fungsi yang tidak sedikit. Tidak hanya berperan dalam proses metabolisme seperti metabolisme karbohidrat, lemak, protein, dan bilirubin, hati juga bekerja membantu sistem imunologi, digestif, detoksifikasi, bahkan sebagai tempat penyimpanan vitamin.^{23,24} Selain itu, hati juga berperan dalam sintesis berbagai protein plasma yaitu, albumin, *bindings globulin*, protein C, protein S, semua faktor pembekuan jalur intrinsik dan ekstrinsik kecuali faktor VIII, serta berperan dalam fungsi hormon tiroid sebagai tempat terjadinya deiodinasi T4 menjadi T3.²³

Di hati, hepatosit adalah penghasil cairan empedu yang akan disalurkan ke luar hati melalui *ductus biliaris*. Cairan ini kemudian akan disalurkan menuju duodenum lalu bekerja di usus sebagai bahan yang mampu membantu penyerapan dan pencernaan lipid.^{22, 23} Sejalan dengan fungsi tersebut, hati juga berperan dalam metabolisme bilirubin.²³ Sementara itu, sel stellata hati akan menjalankan fungsi penyimpanan vitamin A. Pada saat diperlukan, vitamin A akan mengalami oksidasi dan konjugasi hingga akhirnya disekresikan ke dalam empedu. Di sisi lain, hati berperan dalam metabolisme vitamin D sebelum dihidroksilasi di ginjal, dan vitamin E sebelum disekresikan ke sirkulasi atau diekskresikan.²³

Fungsi lain dari hati yang tidak kalah pentingnya adalah fungsi detoksifikasi xenobiotik. Pada fungsi ini, biotransformasi terjadi di hati. Hati akan mengubah xenobiotik yang lipofilik menjadi hidrofilik melalui 2 fase yaitu, reaksi fase I dan II. Reaksi ini terutama terjadi di retikulum endoplasma halus dari hepatosit yang mana pada reaksi fase I akan terjadi serangkaian proses oksidasi, reduksi, dan hidrolisis dengan melibatkan sitokrom P450. Pada akhir fase I akan dihasilkan suatu senyawa yang dapat bereaksi pada fase II.²³ Selanjutnya, reaksi fase II melibatkan beberapa reaksi seperti reaksi glukuronidasi, sulfasi, dan konjugasi.²⁵ Dalam hal ini, enzim utama yang berperan adalah transferase. Pada fase II ini pula GSH sebagai antioksidan yang terkonsentrasi di hati bekerja dalam reaksi konjugasi. Tujuan fase II ini adalah menjadikan suatu senyawa yang lebih inert, lebih polar, dan lebih larut dalam air sehingga lebih mudah disekresikan baik ke darah maupun ke empedu. Hasil dari reaksi fase II ini dapat pula diperluas ke fase III yang merupakan fase ekskresi selanjutnya.^{23,25}

Dalam menjalankan fungsinya, masing-masing dari ketiga zona hati dipengaruhi oleh gradien konsentrasi oksigen maupun zat kimia dan nutrisinya.²³ Zona 1 sebagai zona periportal terletak di sekitar triad porta sehingga memiliki kadar oksigen yang paling besar, sedangkan zona 3 sebagai zona perisentral terletak paling jauh dari porta sehingga memiliki kadar oksigen paling rendah.²³ Pada saat darah dibawa dari arteri hepatis dan vena porta masuk melalui zona 1 menuju ke zona 3, hepatosit mengambil oksigen, nutrisi, dan memetabolisme hormon hingga membentuk suatu gradien yang semakin menurun ketika mendekati zona 3.²²



Gambar 2.4. Fungsi Hati Pada Berbagai Zona. Tampak setiap zona memiliki fungsinya masing-masing.²³

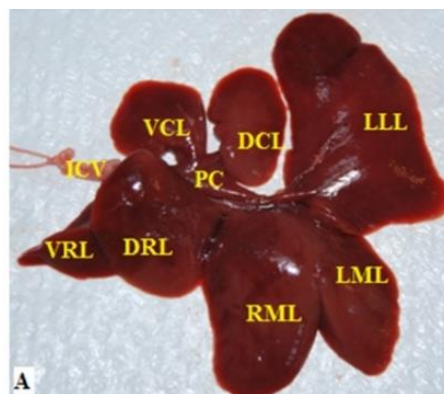
Perbedaan gradien konsentrasi ini selanjutnya akan menjadi faktor pemicu bagi ekspresi gen dan heterogenitas fungsional sel selanjutnya di dalam lobulus hati sehingga memungkinkan terjadinya fungsi metabolisme yang berlawanan untuk beroperasi bersamaan.²² Ekspresi sitokrom P450 yang berperan dalam metabolisme obat ditemukan berjalan secara berlawanan dengan gradien oksigen dan nutrisi sehingga ekspresinya paling banyak ditemukan pada zona 3. Studi yang dilakukan oleh Abdel-Bakky dkk (2015) yang menilai zona yang mengalami kerusakan pada hati setelah induksi dengan CCl₄ ditemukan bahwa pada saat dilakukan induksi toksisitas hati dengan CCl₄, maka *Tissue Factor (TF)* yang mengaktifkan sistem koagulasi ketika terdapat pembuluh darah atau jaringan yang rusak, ditemukan terdepositasi di zona perisentral.²⁶

2.2. Hewan Coba dalam Penelitian Eksperimental Fibrosis Hati

Dalam mempelajari fibrosis hati, penelitian eksperimental yang menggunakan hewan coba memberikan lebih banyak keuntungan namun juga keterbatasan bila dibandingkan dengan penelitian klinis. Fleksibilitas dalam pengumpulan jumlah sampel serta waktu yang lebih singkat dalam induksi berbagai penyakit dan kondisi menjadi beberapa faktor yang layak dipertimbangkan. Selain itu, penelitian dengan menggunakan hewan coba memberikan peluang untuk mempelajari lebih lanjut implikasi gen yang spesifik melalui rekayasa genetika, serta interaksi sel-sel yang utuh dan berbagai jalur pensinyalan yang terlibat dalam mekanisme fibrosis.²⁷

Akan tetapi, berbagai keterbatasan juga turut menyertai penelitian dengan hewan coba ini. Perbedaan secara anatomi mungkin saja ditemukan. Pada studi mengenai penyakit hati, hati hewan pengerat berbeda dengan manusia dari segi bentukan lobus hati dan ada tidaknya kandung empedunya. Pada hewan pengerat, tampak hati yang menunjukkan bentukan lobus yang lebih nyata dan mudah diligasi dibandingkan dengan lobus hati manusia.²⁸ Hati hewan pengerat terdiri dari empat lobus yaitu, lobus lateral kiri (*lobus hepatis sinister lateralis*), *lobus median* (terbagi atas subdivisi kanan dan kiri), lobus kanan (*lobus hepatis dexter*) yang terbagi atas *subdivisi dorsal* dan *ventral*), dan *lobus caudatus* (terbagi atas *subdivisi dorsal* dan *ventral*).²⁹ Sementara itu hati manusia terdiri dari *lobus*

dexter, sinister, quadratus dan *caudatus*. Akan tetapi, *lobus quadratus* dan *lobus caudatus* hanya tampak dari bagian visceral dari hati namun tidak tampak pada bagian ventral dari hati. Secara makroskopis, hati manusia tampak sebagai “*non-lobated architecture*” karena lobus-lobus hati tersebut bukanlah lobus dengan penampakan cekungan yang nyata sehingga tidak mudah diligasi seperti halnya yang tampak pada hati tikus.²⁸ Namun, dari segi ukuran, hati manusia yang berukuran jauh lebih besar dari hati tikus diketahui memiliki arsitektur internal yang serupa dengan hati tikus karena peningkatan ukuran hati terutama terjadi dengan peningkatan jumlah lobulus. Selain itu, hati yang lebih besar juga mendapat perfusi yang lebih banyak dari darah arteri secara proporsional.²⁸



Gambar 2.5. Hati Tikus. Tampak *lobus hepatis sinister lateralis* (Lateral Left Lobe (LLL)), *Lobus Median* (Median Lobe (kiri-LML, dan kanan RML)), *lobus hepatis dexter* (Ventral Right Lobe/VRL & Dorsal Right Lobe/DRL), *lobus caudatus* (ventral caudate lobe/VCL & dorsal caudate lobe/DCL)²⁹

Berbeda dengan lobus, ternyata tidak semua hewan pengerat memiliki kandung empedu. Meskipun tikus dan mencit berasal dari subfamili yang sama yaitu, Murinae, tikus tidak memiliki kandung empedu yang dimiliki oleh mencit. Meski demikian pada tahap embriologi, kedua species tersebut mengalami pembentukan *caudal foregut* yang serupa, namun tidak terbentuk *biliary bud* pada tikus.²⁸

Keterbatasan lainnya yang muncul dalam studi menggunakan hewan coba adalah tidak semua penyakit pada manusia dapat diinduksi pada hewan coba. Perbedaan respon yang terjadi pada hewan coba yang mungkin berbeda dengan respon pada manusia juga dapat ditemukan. Sebagai contoh, penyakit hepatitis C

pada manusia dapat menyebabkan fibrosis hati namun ternyata virus yang sama tidak mampu menginfeksi hepatosit tikus, simpanse, dan Tupaia belangeri (tikus pohon utara). Begitu pula halnya respon terhadap agen toksik tertentu. Terdapat variasi respon baik berupa kurang rentan atau lebih rentannya respon hewan terhadap agen toksik dibandingkan manusia. Induksi alkohol pada hewan pengerat sangat sulit dilakukan karena sifat hewan yang tidak menyukai alkohol dan adanya metabolisme alkohol yang cepat pada hewan tersebut sehingga mencegah kadar alkohol yang tinggi dalam darah.²⁷ Mengenai penyakit hati alkoholik ini, hingga hari ini belum ada hewan coba yang sempurna yang dapat menghasilkan karakteristik penyakit hati alkoholik pada manusia secara utuh.³⁰ Meskipun demikian, hingga saat ini hewan pengerat masih menjadi model hewan coba yang banyak dipilih dalam mempelajari tidak hanya penyakit hati alkoholik namun juga fibrosis hati.³¹ Kemudahan dalam budidaya hewan coba dan perawatan, serta kemiripannya dengan sistem tubuh manusia baik secara anatomi, fisiologi, genetika, molekuler, maupun biokimia tampaknya masih menjadi faktor yang melatarbelakangi pemilihannya.

Dalam mempelajari penyakit hati, terdapat dua galur tikus yang umum digunakan yaitu, *Sprague Dawley* dan *Wistar*. Keduanya merupakan subspecies dari species *Ratus norvegicus* yang mana tikus *Sprague Dawley* lebih tidak aktif bergerak sehingga lebih mudah dalam penanganannya, serta lebih cepat dikembangbiakkan.³² Selain itu, tikus *Sprague Dawley* harganya lebih murah serta tersedia secara komersial dan banyak digunakan untuk studi profil metabolik.³³ Akan tetapi, tikus *Wistar* lebih umum digunakan dalam studi toksikologi, karena database keamanan historisnya, berat badan yang lebih rendah, serta ketahanan hidup yang lebih tinggi.³³ Selain itu, dalam hal melihat perlemakan hati yang juga menjadi awal dari cedera hati, tikus *Wistar* dinilai mampu merepresentasikannya dengan lebih baik.³²

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wang dkk (2020) untuk menguji stabilitas metabolik dan jalur biotransformasi pada kedua galur tikus tersebut, ditemukan tidak terdapat perbedaan bermakna di antara kedua galur tersebut dalam hal pembersihan intrinsik in vitro antara senyawa yang diperiksa. Hal ini menunjukkan di antara kedua galur tersebut terdapat stabilitas metabolik

yang konsisten. Akan tetapi terdapat perbedaan laju pembentukan metabolit oksidatif di antara kedua galur tersebut yang bergantung pada jenis bahan toksik yang diberikan. Sebagai contoh, laju pembentukan metabolit oksidatif ditemukan lebih tinggi 150 x pada tikus *Sprague Dawley* dibandingkan *Wistar* pada pemberian midazolam, namun sebaliknya pada pemberian gemfibrozil. Pada penelitian tersebut dibuktikan pula adanya perbedaan biotransformasi obat yang signifikan di antara kedua galur yang juga dipengaruhi oleh jenis kelamin yang berbeda, namun serupa pada jenis kelamin yang sama sehingga dibutuhkan konsistensi dalam pemilihan jenis kelamin dan galur tikus. Sejalan dengan hal tersebut, hingga saat ini data mengenai metabolit manusia ditemukan serupa antara kedua galur sehingga pemilihan baik tikus galur *Sprague Dawley* maupun *Wistar* dapat dilakukan untuk studi penyakit hati asalkan konsisten.³³

2.3. Stres Oksidatif dan Respon Antioksidan Endogen

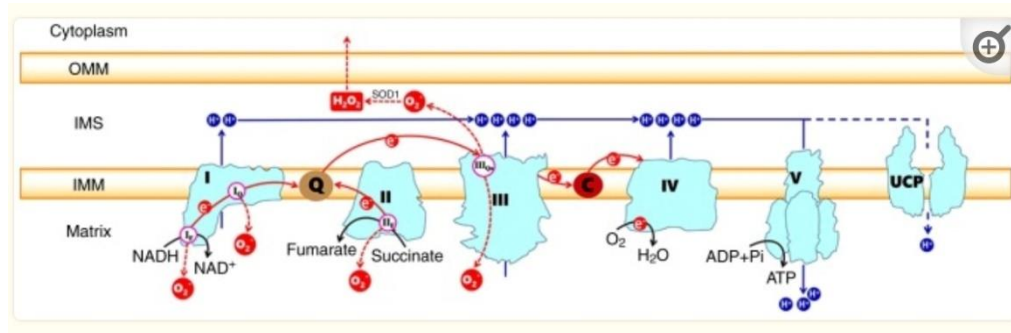
Tubuh manusia merupakan serangkaian sistem yang saling bekerja sama demi mempertahankan homeostasis. Beberapa senyawa dalam keadaan kecil mungkin memang diperlukan oleh tubuh, akan tetapi senyawa yang sama justru dapat berbahaya bagi tubuh ketika berada dalam jumlah yang berlebihan. *Reactive Oxygen Species* (ROS) adalah contohnya. Dalam jumlah kecil ROS tidak hanya dibutuhkan oleh tubuh dalam sistem imunitas akan tetapi justru dihasilkan secara terus menerus oleh tubuh sebagai metabolit dari sistem rantai pernafasan. Akan tetapi, pada keadaan tertentu, jumlah ROS dapat meningkat lebih daripada antioksidan di dalam tubuh sehingga dapat membahayakan tubuh. Dalam hal ini, tubuh akan berusaha mengeliminasi kelebihan ROS demi mempertahankan homeostasisnya. Namun, sayangnya hal ini tidak selalu berhasil. Pada saat ROS terlalu banyak tanpa disertai peningkatan antioksidan, tubuh masuk ke dalam keadaan stres oksidatif yang telah terbukti memicu perkembangan berbagai penyakit lainnya.³⁴

Adapun ROS sendiri merupakan salah satu bentuk umum dari radikal bebas selain *Reactive Nitrogen Species* (RNS). Radikal bebas didefinisikan sebagai suatu senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan pada kulit terluarnya sehingga cenderung radikal dan tidak stabil. Sebagian besar senyawa

yang tergolong dalam radikal bebas ini adalah senyawa yang memiliki gugus oksigen (ROS), termasuk di antaranya *Superoxide* ($O_2^{\cdot-}$), *Hydrogen peroxide* (H_2O_2), *Hydroxyl radical* ($OH^{\cdot}$) dan *Oxygen singlet*. Sementara itu, kelompok senyawa RNS seperti *Nitric oxide* (NO), *Nitrous oxide* (N_2O), *Peroxynitrit* ($NO_3^{\cdot-}$) kerap kali dianggap sebagai subklas dari ROS.^{34,35}

ROS sendiri mengandung bentuk yang radikal maupun non radikal. Kelompok ROS radikal meliputi *Superoxide anion* ($O_2^{\cdot-}$), *Hydroxyl radical* ($OH^{\cdot}$), dan *Peroxyl radical* ($OOH^{\cdot}$). Kelompok ROS radikal bersifat sangat reaktif sebaliknya dengan kelompok ROS yang non radikal. Kelompok ROS non radikal tidak memiliki elektron yang tidak berpasangan di kulit terluarnya. Akan tetapi, ROS yang non radikal masih tereduksi secara tidak sempurna, sehingga masih dapat mengalami reaksi redoks yang menghasilkan radikal bebas yang reaktif. Dalam hal ini keberadaan logam seperti Fe^{2+} dan Cu^+ akan menimbulkan reaksi yang membuat ROS non radikal menghasilkan *Hydroxyl radical* yang merupakan oksidan yang kuat.³⁵ Kelompok ROS non radikal ini meliputi hidrogen peroksida (H_2O_2), asam hipoklorat (HOCl), asam hipobromus (HOBr), Ozon (O_3), peroksida organik (ROOH), asam peroksinitrat (ONOOH), peroksinitrat (O_2NOO) dan peroksinitro ($ONOO^{\cdot-}$).³⁴

Di dalam tubuh, ROS dapat berasal dari sumber eksogen maupun endogen. Dari sumber eksogen, ROS dapat dihasilkan dari sinar UV, infeksi virus, alkohol, stres, merokok, radiasi pengion, diet, logam, pestisida, ataupun senyawa beracun lainnya. Sementara itu, dari sumber endogen, ROS dihasilkan sebagai produk samping berbagai reaksi enzimatik dan metabolisme yang membutuhkan oksigen, termasuk pada mekanisme transpor elektron rantai pernafasan maupun jalur detoksifikasi yang dilakukan oleh hati.³⁶ Dari jalur endogen ini, ROS terutama dihasilkan di mitokondria dalam bentuk anion superoksida terutama dari kompleks I dan III mekanisme transpor elektron rantai pernafasan yang merupakan sesuatu yang terjadi secara fisiologis. Secara umum, di dalam mitokondria, kompleks I akan menghasilkan lebih banyak ROS dibandingkan kompleks III.³⁷

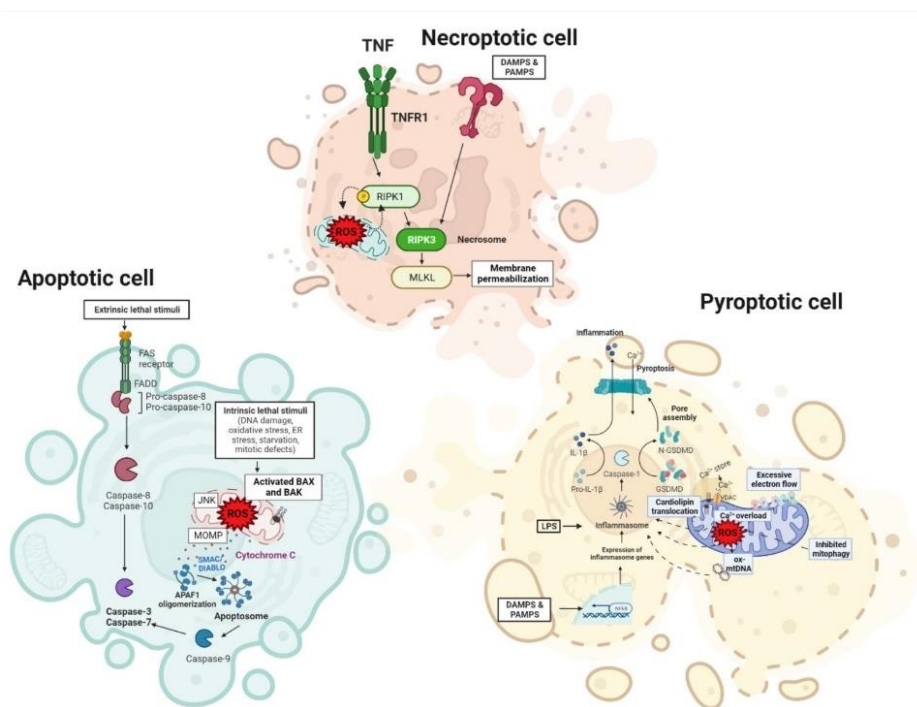


Gambar 2.6. Transpor elektron.³⁷

Akan tetapi, sebagian ROS endogen juga dihasilkan di luar mitokondria. Dalam hal ini ROS pun juga dapat dihasilkan dari reaksi yang melibatkan Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oksidase, lipoksigenase, siklooksigenase, peroksidase, xanthin oksidase, asam lemak peroksisomal beta oksidasi, dan detoksifikasi mikrosomal hati.³⁶ ROS yang dihasilkan pada akhirnya akan memicu disfungsi mitokondria, bereaksi dengan lipid, protein, dan DNA, serta menyebabkan berbagai kerusakan serta memicu kematian sel.³⁶

Secara keseluruhan, ROS yang berlebih terutama akan berinteraksi dengan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) yang berada di membran sel dan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dan menghasilkan suatu senyawa akhir yaitu, *Malondialdehyde* (MDA) yang dapat ditemukan baik pada jaringan hati maupun plasma dan berfungsi sebagai biomarker yang potensial dalam melihat ada tidaknya stres oksidatif. MDA selanjutnya akan menempel pada DNA dan menyebabkan kerusakan pada DNA maupun sel yang akan berakibat pada mutasi ataupun kematian sel. Selain itu, oksidasi lipid yang terus terjadi akan menyebabkan perubahan pada potensial membran mitokondria. Dalam hal ini, Ca^{2+} akan masuk secara berlebih dan menyebabkan pembukaan transisi permeabilitas mitokondria yang meningkat, menimbulkan semakin banyak ROS, hingga mengaktifkan berbagai jalur kematian seluler baik melalui jalur apoptosis, jalur ferroptosis, jalur nekroptosis, dan jalur piroptosis. Melalui jalur apoptosis, ROS mengaktifkan baik jalur ekstrinsik maupun intrinsik. Ketika jalur ekstrinsik apoptosis diaktifkan oleh FasR dengan protein adaptor FADD, jalur intrinsik apoptosis sangat bergantung pada kerusakan mitokondria yang memicu ROS yang

diinduksi oleh *Bcl-2 associated X/ Bcl-2 homologous antagonist/killer* (BAX/BAK) hingga akhirnya aktivasi caspase 9, 3, dan 7. Sementara itu, melalui jalur ferroptosis, ROS sangat tergantung pada keberadaan zat besi yang selanjutnya mendorong peroksidasi membran fosfolipid. Pada jalur piroptosis dan nekroptosis, yang termasuk jalur kematian terprogram, diawali dengan disekresikannya *Damage associated molecular patterns* (DAMPs) dan *Pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) yang memicu diaktifkannya jalur pensinyalan inflamasi yaitu, *Nuclear Factor-Kappa B* (NF- κ B) sehingga terjadi inflamasi yang hebat dan mengaktifkan kematian sel sebagai respon pertahanan tubuh.³⁶



Gambar 2.7. Apoptosis, Nekroptosis, dan Piroptosis³⁶

Keberadaan ROS selanjutnya akan direspon oleh tubuh dengan menghadirkan sistem pertahanan antioksidan. Dalam keadaan fisiologis, keberadaan ROS berada dalam keseimbangan dengan aktivasi sistem antioksidan. Namun, dalam keadaan patologis keseimbangan itu tidak lagi dapat dipertahankan. Meski demikian sistem antioksidan akan tetap diaktifkan melalui keberadaan ROS. Dalam hal ini, Nuclear Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2)

yang merupakan faktor transkripsi yang meregulasi antioksidan endogen akan bekerja.

Pada tahun 1994 Moi dkk telah berhasil mengisolasi Nrf2 yang merupakan molekul berukuran 66,1 kDa dan merupakan anggota dari *cap'n'collar* family dari faktor transkripsi *basic leucin zipper* (bZIP). Nrf2 merupakan protein yang dikode oleh gen *Nuclear Factor Erythroid 2 Like 2* (NFE2L2) pada manusia dan ditemukan terekspresi pada jaringan tubuh manusia dengan tingkatan yang berbeda-beda. Ekspresi terbanyak Nrf2 ditemukan di otot, ginjal, paru, dan hati. Secara keseluruhan, Nrf2 dikatakan memiliki efek pleiotropik yang mengatur ekspresi lebih dari 240 gen pada berbagai fungsi seluler.³⁸ Nrf2 diketahui meregulasi induksi ekspresi gen yang terlibat dalam mekanisme detoksifikasi dan induksi proliferasi melalui ikatannya dengan *Antioxidant Response Element* (ARE).^{39,40} Selain itu, ikatan Nrf2 dengan ARE juga diketahui bertanggung jawab atas ekspresi konstitutif beberapa gen yang mengendalikan ROS yang dihasilkan secara konstan pada proses metabolisme aerob normal.⁴⁰ Bahkan pada penelitian yang dilakukan oleh Liu dkk (2023) dibuktikan bahwa Nrf2 mampu menghambat autofagi, peroksidasi lipid dan ferroptosis yang merupakan mekanisme penting yang terjadi pada *Non Alcoholic Fatty Liver Disease* (NAFLD).⁴¹

Terdapat tujuh domain yang terkonservasi pada Nrf2 yaitu, Neh1 hingga Neh7 yang masing-masing memiliki fungsinya sendiri. Neh1 merupakan domain yang terikat dengan Neh3 yang berperan penting dalam heterodimerisasi dengan protein *small Musculoaponeurotic fibrosarcoma* (sMaf) yaitu, MafF, MafG, dan MafK yang sangat penting perannya dalam proses pengikatan Nrf2 dengan ARE. Neh1 juga merupakan domain tempat sekuens *Nuclear Export Signal* (NES) berada sekaligus tempat Nrf2 berikatan dengan faktor transkripsi lainnya. Sementara itu, domain Neh2 merupakan domain yang mengandung motif ETGE dan DLG yang menjadi tempat Nrf2 berikatan dengan protein Keap-1, represor Nrf2⁴² dan domain Neh3, Neh4, dan Neh5 merupakan domain transaktivasi. Domain Neh4 dan Neh5 akan merekrut *histone acetyl-transferase cAMP responsive element binding protein* (CBP) dan kompleks mediator untuk transaktivasinya. Domain lainnya yaitu, domain Neh6 dan Neh7 yang mana domain Neh6 merupakan domain yang berperan dalam pengikatan Nrf2 dengan

Beta Transducin repeat-Containing Protein (B-TrCP) yang juga merupakan regulator negatif Nrf2 sedangkan Neh7 merupakan domain yang akan mempromosikan ikatan Nrf2 ke *Receptor X Retinoic alpha* (RXR- α) yang juga akan menghambat jalur pensinyalan Nrf2-ARE.^{43,44}

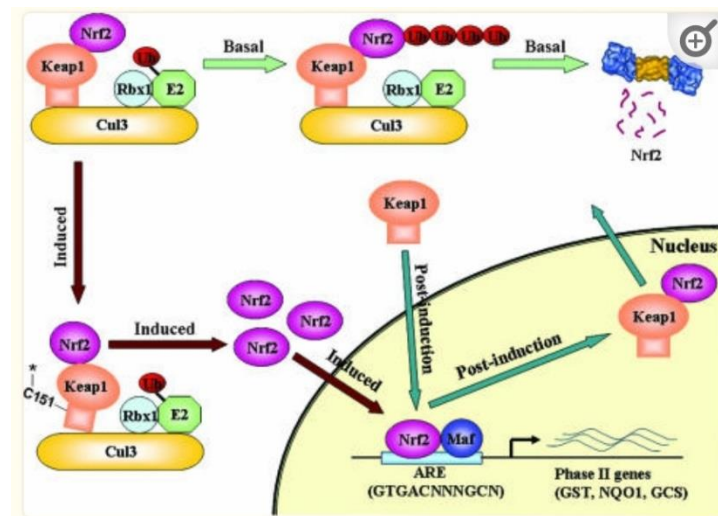
Di dalam sitoplasma, Nrf2 akan tetap diproduksi secara konsektif. Akan tetapi, keberadaannya terutama akan direpresi oleh *Kelch like-ECH associated protein 1* (Keap-1) yang akan mengikatnya dan membuatnya mengalami ubiquitinasi untuk selanjutnya didegradasi oleh proteasom. Pada keadaan fisiologis atau basal, hanya sedikit Nrf2 bebas yang nantinya akan bergerak dari sitoplasma ke dalam nukleus. Sedikit ROS yang dihasilkan dari proses fisiologis hanya akan menyebabkan sedikit Nrf2 yang bebas. Namun, berbeda halnya pada keadaan stres oksidatif. ROS yang banyak akan menyebabkan lebih banyak Nrf2 yang bebas dan teraktivasi. Keberadaan ROS telah diketahui akan menyebabkan perubahan konformasi pada residu sistein Keap-1, sehingga Keap-1 tidak dapat mengikat Nrf2.⁵ Aktivasi Nrf2 akibat modifikasi pada residu sistein Keap-1 ini dikenal sebagai aktivasi Nrf2 jalur kanonikal. Dalam hal ini, ROS dan senyawa elektrofilik merupakan penginduksi klasik aktivasi Nrf2 kanonikal ini.⁵

Meskipun demikian, penelitian-penelitian selanjutnya menemukan bahwa aktivasi Nrf2 tidak hanya terjadi melalui modifikasi residu sistein Keap-1 oleh penginduksi klasik sehingga Keap-1 tidak lagi dapat mengikat Nrf2, tetapi juga dapat disebabkan oleh mekanisme kompetisi oleh protein lain seperti p62, p21, dipeptidyl peptidase III (DPP3), *Breast cancer Gene 1* (BRCA1), dan *Wilms Tumor gene on chromosome X* (WTX) dengan Keap-1 untuk berikatan dengan Nrf2 sehingga mengganggu ikatan Nrf2-Keap1.⁶ Aktivasi Nrf2 dengan cara ini dikenal sebagai jalur non-kanonikal.^{5,6, 45,46,47}

Sementara itu, Keap-1 yang merupakan penekan induksi Nrf2 yang utama, merupakan suatu protein kaya sistein yang terdiri dari 624 asam amino. Keap-1 memiliki lima domain yaitu, domain *N-terminal region* (NTR), domain *Tramtrack and Bric-a-Brac* (BTB), domain *central intervening region* (IVR), domain *Kelch repeats*, dan domain *C-terminal region* (CTR).⁴³ Dari domain-domain ini, domain BTB dan IVR adalah domain yang berperan penting dalam dimerisasi dengan kompleks *Cullin-based E3 ligase/Ring Box Protein-1* (CUL3/RBX1) untuk proses

ubiquitinasi Nrf2. Sementara itu, domain CTR dan DGR adalah domain yang mengikat motif DLG dengan afinitas rendah dan motif ETGE dengan afinitas tinggi pada domain Neh2 dari Nrf2. Domain *Kelch repeats* merupakan domain penting yang menghubungkan Keap1 dengan Nrf2 dan p62.^{43,44}

Beberapa penelitian yang telah dilakukan mengenai Nrf2-Keap-1 kemudian juga menunjukkan bahwa Keap-1 tidak hanya ada di sitoplasma dan berperan mengikat Nrf2 sitoplasma saja namun juga ada di nukleus dan meregulasi ekspor Nrf2 dari nukleus ke sitoplasma. Penelitian Sun dkk (2007) menunjukkan bahwa terdapat regulasi post induksi Nrf2 oleh Keap-1 yang ditandai dengan terjadinya lokalisasi Keap-1 ke nukleus. Penelitian ini menunjukkan bahwa lokalisasi Keap-1 tersebut merupakan suatu peristiwa independen yang tidak bergantung pada Nrf2. Keberadaan Keap-1 di nukleus ini akan menyebabkan disosiasi Nrf2 dan ARE dan menghantarkan Nrf2 kembali ke sitoplasma.⁴⁸ Tentu saja hal ini erat kaitannya dengan keberadaan NES yang terdapat pada domain IVR protein Keap-1. Meskipun domain Neh1 pada Nrf2 juga memiliki NES, namun dalam hal ini, NES yang terdapat pada Nrf2 tidak berperan dalam ekspor Nrf2 tetapi lebih dikhususkan dalam proses ubiquitinasi dan degradasinya.⁴⁸ Hambatan pada NES yang ada di Nrf2 justru akan memperkuat stabilisasi Nrf2.⁴⁸ Melengkapi pemahaman tersebut, Hu dkk (2020) pada penelitian yang dilakukannya menemukan bahwa translokasi Keap-1 ke nukleus merupakan suatu proses yang tergantung pada interaksinya dengan NF-KB. Protein subunit NF-KB yaitu, p65 dan p50 berperan dalam translokasi Keap-1 ke nukleus dimana protein p65 berfungsi untuk merepresi jalur Nrf2-ARE, sedangkan protein p50 berfungsi secara langsung dan spesifik mentranslokasikan Keap-1 ke nukleus.⁴⁹ Pada akhirnya Keap-1 yang membawa Nrf2 ke sitoplasma akan membawa Nrf2 diubiquitinasi dan didegradasi oleh proteasom.



Gambar 2.8. Mekanisme post induksi Nrf2. Tampak Keap-1 masuk ke nukleus secara independen dan menyebabkan disosiasi Nrf2-ARE serta membawa Nrf2 keluar dari nukleus menuju sitoplasma.⁴⁸

Sementara itu, Nrf2 yang teraktivasi akan mengaktifkan sintesis berbagai antioksidan endogen yang bersifat enzimatik maupun non enzimatik. Kelompok antioksidan enzimatik adalah kelompok antioksidan lini pertama yang melawan oksidan dengan cara memecah senyawa radikal menjadi H_2O_2 lalu menjadi air. Sementara itu, kelompok antioksidan non enzimatik adalah kelompok antioksidan lini kedua yang bekerja melalui interupsi reaksi rantai dari radikal bebas. Dalam hal ini, *superoxide dismutase* (SOD), *catalase* (CAT), dan *Glutathione Peroxidase* (GPx) termasuk ke dalam kelompok antioksidan enzimatik, sedangkan vitamin C, vitamin E, senyawa polifenol dari tumbuhan, karotenoid, thioedoksin, dan glutathione termasuk dalam kelompok antioksidan non enzimatik.⁵⁰

Enzim SOD adalah antioksidan lini pertama yang mereduksi superoksida radikal dari rantai pernafasan menjadi H_2O_2 . Selanjutnya, H_2O_2 di mitokondria akan direduksi oleh GPx mitokondria dalam reaksi berantai dengan GSH sebagai donor elektronnya sehingga GSH berubah menjadi GSSG yang nantinya akan kembali menjadi GSH dalam reaksi yang melibatkan *Glutathione reductase* (GR) yang bergantung pada NADPH dan Nrf2.^{36,51} Pentingnya keberadaan GSH mitokondria dikarenakan tidak adanya enzim CAT di mitokondria tetapi di peroksisom.

Secara eksklusif, GSH yang disintesis di sitosol akan membutuhkan mekanisme tertentu untuk dapat masuk ke mitokondria. Dalam hal ini, terdapat *2-oxoglutarate carrier* (OGC) yang berperan untuk membawa GSH ke mitokondria dan menukarnya dengan 2-oksoglutarat. Akan tetapi, OGC sangat tergantung pada fluiditas membran yang dipengaruhi oleh komposisi asam lemak dan kolesterol. Pada keadaan stres oksidatif, peroksidasi yang terjadi akan merangsang aktivitas lipoksigenase yang akan mengoksidasi fosfolipid pada membran sel sehingga terjadi perubahan fluiditas dan permeabilitas membran. Asam lemak dan kolesterol yang tinggi akan menyebabkan peningkatan pada kekakuan membran sehingga menyebabkan terganggunya proses transportasi ini ke mitokondria. Akibatnya, disfungsi mitokondria hingga kematian sel pun tak dapat dihindari.³⁶

Akan tetapi, ketika jalur Nrf2-ARE diaktifkan dan antioksidan endogen dihasilkan, maka antioksidan akan bekerja secara langsung sebagai *ROS Scavenger* yang langsung menstabilkan senyawa radikal agar tidak lagi radikal.⁵² Hal ini akan menyebabkan berkurangnya stres oksidatif dan peroksidasi lipid sehingga transpor GSH dapat terlaksana. Selain itu, Nrf2 juga bekerja menurunkan respons inflamasi, mengeliminasi mitokondria yang rusak melalui respons mitofagi dengan cara menginduksi biogenesis lisosom, serta mempromosikan biogenesis mitokondria melalui stabilisasi *Transcription Factor A Mitochondria* (TFAM), serta peningkatan ekspresi *Mitochondrial associated regulatory factor* (Marf), *dynamin-related protein 1*, dan *peroxisome proliferators-activated receptor-γ* (PPAR-γ).^{53,54}

2.4. Fibrosis Hati

Fibrosis hati merupakan respon dan upaya tubuh yang tidak berhasil mengatasi cedera yang terjadi secara berkepanjangan. Berbagai agen kausatif seperti virus yang menginfeksi, senyawa toksik, obat-obatan, autoimun maupun lemak yang terakumulasi akan menyebabkan cedera pada hati. Cedera yang terjadi akut dapat segera tertangani oleh kemampuan regenerasi hati. Hati akan berusaha melokalisasi cedera untuk melindungi dirinya dengan cara meningkatkan sintesis matriks ekstraseluler seperti kolagen dan fibronektin.⁵⁵ Namun, ketika cedera telah mulai tertangani, degradasi matriks ekstraseluler akan menjadi proses

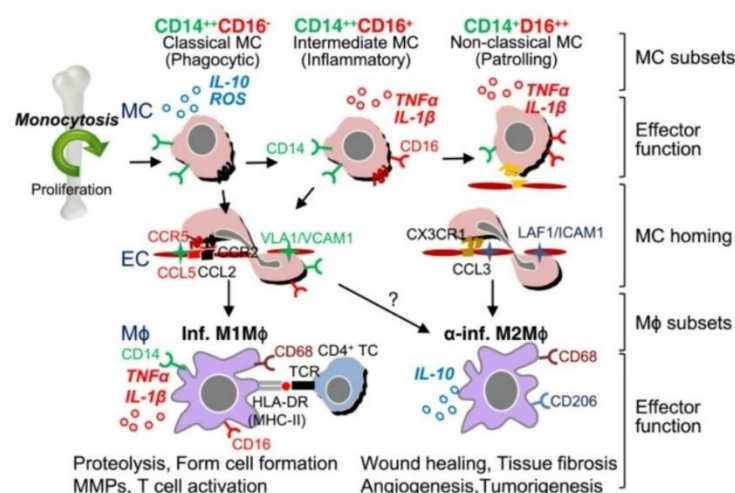
yang mengikutinya sehingga jaringan hati yang sehat kembali terbentuk. Berbeda halnya bila yang terjadi adalah paparan agen kausatif yang terus-menerus. Degradasi matriks ekstraseluler tidak mampu mengimbangi akumulasi matriks ekstraseluler yang terjadi. Peningkatan matriks ekstraseluler ini kemudian akan mengubah arsitektur hati baik secara makroskopis maupun mikroskopis hingga mengganggu kinerja hati. Apabila hal ini tetap tidak tertangani, maka hati yang tadinya fibrosis akan berkembang menjadi sirosis atau bahkan muncul sebagai karsinoma hepatoseluler.⁵⁵

Secara lebih detail, paparan agen kausatif akan menyebabkan nekrosis dari hepatosit sehingga terjadi perubahan membran yang akan menyebabkan disekresikannya *Damage-associated Molecular Patterns* (DAMPs) sebagai alarm penanda bahaya. Tidak hanya oleh hepatosit, sel-sel lain yang dalam keadaan stres juga akan mensekresikan DAMPs ini. DAMPs yang disekresikan selanjutnya akan mengaktifasi sel-sel di sekitarnya termasuk sel Kupffer dan sel stellata hati.⁵⁶ Sekresi DAMPs inilah yang kemudian menjadi dasar aktivasi sel stellata hati pada cedera hati yang tidak disebabkan patogen.⁵⁷

Salah satu DAMPs yang banyak dipelajari adalah *High Mobility Group Box 1* (HMGB1). HMGB1 merupakan suatu protein yang terkonservasi pada semua jenis sel.⁵⁸ Pada saat terjadi cedera, kematian sel yang terjadi akan melepaskan HMGB1 sebagai sistem alarm penanda bahaya yang selanjutnya akan berikatan dengan reseptornya yaitu, *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) dan *Toll-like Receptor 4* (TLR4) untuk mengaktifkan proses inflamasi. Dalam hal ini, HMGB1 dapat bertindak baik sendiri sebagai mediator pro inflamasi, maupun berkelompok dengan membentuk kompleks dengan molekul pro inflamasi lainnya seperti DNA, RNA, histon, nukleosom, lipopolisakarida, IL-1A, IL-1B, dan sebagainya.⁵⁸

Adapun reseptor RAGE maupun TLR diekspresikan di hepatosit, sel Kupffer, maupun sel stellata hati sehingga DAMPs yang disekresikan dan terikat pada reseptor RAGE dan TLR akan mengaktifkan sel Kupffer maupun sel stellata hati. Aktivasi sel Kupffer akan menyebabkan disekresikannya berbagai kemokin yang nantinya akan berperan dalam perekrutan monosit yang akan memicu sekresi berbagai sitokin pro inflamasi seperti IL-1B dan TNF- α . Pada tikus, kemokin

tersebut akan mempromosikan perekrutan monosit Ly6C^+ (terdiri atas Ly6C^{hi} dan $\text{Ly6C}^{\text{middle}}$), terutama Ly6C^{hi} yang akan berinteraksi dengan reseptor kemokin CCR2 untuk kemudian mengalami maturasi menjadi makrofag M1 inflamasi yang nantinya akan berkontribusi dalam degradasi jaringan dan aktivasi sel T.⁵⁹ Sedangkan pada manusia, kemokin CCR2 akan menyebabkan perekrutan monosit klasik yang mengekspresikan *human* $\text{CD14}^{++}\text{CD16}^-$ dari sumsum tulang yang dalam keadaan stabil dapat berdiferensiasi menjadi monosit klasik *intermediate* lalu berdiferensiasi menjadi monosit non klasik yang beredar. Monosit klasik memiliki kemampuan fagositosis yang kuat, mensekresikan ROS dan IL-10 pada stimulus lipopolisakarida patogen, sedangkan monosit intermediate dan non klasik akan mensekresikan sitokin pro inflamasi. Pada saat cedera, monosit klasik dan *intermediate* akan menginvasi jaringan melalui ikatannya dengan reseptor CCR2/CCL2 dan aatu CCR5/CCL5. Monosit klasik selanjutnya akan mengalami maturasi menjadi M1Mo yang pada akhirnya akan berperan dalam aktivasi sel T.⁵⁹ Pada akhirnya, aktivasi sel Kupffer yang terjadi akibat dilepaskannya DAMPs dari sel hati yang rusak akan menyebabkan disekresikannya pula berbagai sitokin pro inflamasi seperti *Transforming Growth Factor-B* ($\text{TGF-}\beta$), *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF), *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF), *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPs), dan sebagainya, serta teraktivasinya berbagai jalur pensinyalan pro fibrotik.⁶⁰



Gambar 2.9. Monosit klasik, intermediat, dan non klasik⁵⁹

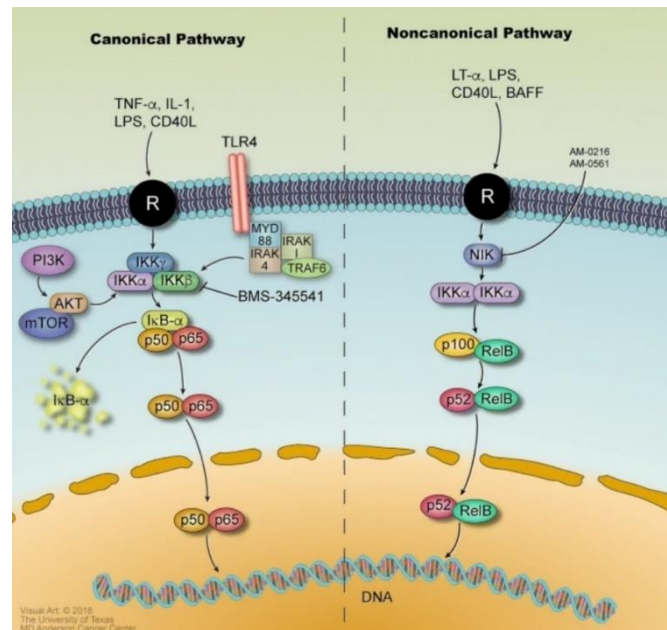
Dalam fibrogenesis di hati, aktivasi sel stellata hati telah diketahui sebagai faktor utama penyebab fibrosis hati. Sel stellata hati yang tadinya diam atau *quiescent* merupakan sel yang berada di *Space of Disse* dan berperan sebagai sel penyimpan vitamin A. Pada saat tidak terjadi cedera, sel ini tampak berbentuk bulat, agak memanjang, dengan nukleus yang besar serta mengandung banyak tetesan lemak yang mengandung vitamin A. Namun, pada saat terjadi cedera dan teraktivasi, sel ini akan tampak lebih memanjang, dan lebih sedikit mengandung tetesan lemak. Pada keadaan ini, ia telah bertransformasi menjadi myofibroblas yang menyebabkan peningkatan matriks ekstraseluler serta terjadinya fibrosis hati.^{61,62} Pada saat ini, setidaknya terdapat tujuh perubahan pada sel stellata hati yaitu, proliferasi, kemotaksis, fibrogenesis, kontraktilitas, degradasi matriks, hilangnya retinoid, dan kemoatraktan leukosit, serta lepasnya sitokin.⁵⁶

Dalam proses fibrogenesis, sel stellata hati dapat teraktivasi melalui berbagai jalur pensinyalan. Jalur pensinyalan TGF- β dan PDGF disebut-sebut sebagai jalur utama fibrosis hati.⁵⁶ Namun, tidak hanya itu, jalur lain seperti *Nuclear Factor-Kappa B* (NF-KB), *Yes-associated Protein/Transcriptional coactivator with PDZ binding motif* (YAP/TAZ), dan *Wingless/Integrated* (Wnt) juga diketahui menyebabkan fibrogenesis.⁶³ Telah diketahui bahwa seluruh jalur pensinyalan tersebut berperan menyebabkan fibrosis melalui aktivasi sel stellata hati.

Jalur TGF- β merupakan jalur utama fibrosis hati. Jalur ini akan mengaktivasi sel stellata hati melalui ikatannya dengan protein SMAD2/3 maupun dengan protein lainnya seperti RhoA, TRAF4/6, PI3K/Akt, MAP3K7, dan protein Ras.⁶⁴ Jalur TGF- β yang melibatkan protein SMAD2/3 dikenal sebagai jalur kanonikal, sedangkan jalur yang tidak melibatkan protein SMAD2/3 dikenal sebagai jalur non kanonikal.⁶⁴ Penelitian yang dilakukan oleh Solhi dkk (2022) menunjukkan bahwa dalam perannya sebagai aktivator sel stellata hati, TGF- β ternyata juga menginduksi aktivasi jalur pensinyalan *Hedgehog* serta menyebabkan stres pada retikulum endoplasma sel stellata hati secara terus menerus.⁶⁵ Selain itu, pada aktivasi sel stellata yang dipicu oleh aktivasi jalur TGF- β , juga ditemukan sekresi kolagen dan penanda fibrogenik yang meningkat.⁶⁵

Jalur lainnya yang tidak kalah penting dengan jalur TGF- β adalah jalur PDGF. Jalur ini juga dikatakan sebagai jalur utama fibrosis karena kemampuannya dalam mengaktivasi berbagai jalur pro fibrotik lainnya. PDGF sendiri merupakan suatu faktor pertumbuhan yang diproduksi oleh trombosit. Namun, pada cedera hati, sel Kupffer akan memediasi perekrutan trombosit menuju intrahepatik. Pada cedera hati, selain di trombosit, PDGF juga diekspresikan oleh sel stellata hati serta sel endotel yang teraktivasi. Sementara itu, reseptor PDGF yaitu, PDGFR terekspresi di sel stellata hati. Ikatan antara PDGF dan PDGFR akan mengaktifkan jalur pensinyalan Ras/Raf-1 yang akan menyebabkan fosforilasi berbagai protein target di sitoplasma, mengatur aktivitas berbagai protease, serta fosforilasi berbagai faktor transkripsi yang pada akhirnya akan memberikan efek kemotaksis dan proliferasi sel stellata hati.⁶⁶ Tidak hanya itu, aktivasi jalur PDGF juga akan mengaktifkan jalur pensinyalan NF-KB yang merupakan jalur pensinyalan inflamasi yang utama.⁶⁶

Serupa dengan TGF- β , jalur pensinyalan NF-KB juga terbagi atas jalur kanonikal dan non kanonikal. Jalur kanonikal NF-KB merupakan jalur yang dipicu oleh TLRs, TNF-A, IL-1 yang mengarah pada aktivasi relA (p65) atau kompleks yang mengandung cRel. Jalur kanonikal NF-KB ditenggarai sebagai jalur yang berperan dalam respon inflamasi, regulasi imunitas, perlindungan radiasi ultraviolet, dan proliferasi sel.^{67,68} Sementara itu, jalur non kanonikal NF-KB merupakan jalur yang dipicu oleh sitokin *family* TNF termasuk TNFSF3, ligan CD40 (CD40L dan TNFSF5) serta *B-cell activating factor* (BAFF dan TNFSF13B). Aktivasi jalur non kanonikal ini akan mengarah pada pematangan sel B dan organogenesis limfoid.⁶⁸



Gambar 2.10. Jalur kanonikal dan non kanonikal NF-KB⁶⁸

Jalur non kanonikal NF-KB dimediasi oleh kompleks NF-KB yang terdiri dari subunit p100 (menyerupai molekul IKB), p52, an relB. Jalur ini melibatkan peran serta NK-KB-inducing kinase (NIK) yang memfosforilasi IKKa yang kemudian memfosforilasi residu serine pada p100 sehingga didegradasi dan menyebabkan lepasnya kompleks p52 dan relB untuk dapat bertranslokasi ke nukleus.⁶⁸ Meskipun jalur non kanonikal ini telah dikenal dengan perannya dalam pematangan sel B dan organogenesis limfoid, penelitian baru-baru ini justru menunjukkan bahwa NIK berperan dalam inflamasi.^{69,70} Xiong dkk (2018) berhasil membuktikan bahwa NIK mampu menekan regenerasi hati pada penyakit hati akut maupun kronis. Dalam hal ini, NIK hati terbukti menghambat proliferasi hepatosit melalui supresi jalur JAK2/STAT3.⁶⁹

Sementara itu, jalur NF-KB kanonikal sendiri juga dapat teraktivasi tanpa melalui PDGF tetapi teraktivasi melalui jalur TLR4-MyD88-NF-KB yang aktif pada saat DAMPs berikatan dengan TLR4.⁷¹ Selain itu, jalur ini juga dapat teraktivasi akibat mediator pro inflamasi yang muncul akibat aktivasi sel Kupffer. Dalam hal ini, TNF- α , IL-1B, dan lipopolisakarida bakteri merupakan aktivator terkuatnya. Kompleks NF-KB yang berperan dalam jalur kanonikal terdiri dari 3 komponen subunit yaitu, relA (p65), p50, dan IKB yang merupakan kompleks

yang ada secara inaktif di sitoplasma. Pada saat reseptor TNF teraktivasi, IKB kinase (IKK) akan memfosforilasi IKB sehingga dapat didegradasi. Akibatnya NF-KB dimer (p65 dan p50) dapat bertranslokasi ke nukleus dan menjadi faktor transkripsi yang akhirnya mengaktivasi sel stellata hati.⁶⁷

Selain jalur-jalur pensinyalan yang telah disebutkan di atas, masih ada jalur pensinyalan lain yang berperan dalam fibrosis hati yaitu, jalur pensinyalan Wnt dan YAP/TAZ. Jalur pensinyalan Wnt juga terdiri dari jalur kanonikal yang melibatkan B-catenin, dan jalur kanonikal yang terdiri dari jalur *Planar Cell Polarity* (PCP) dan jalur Wnt/Ca²⁺. Aktivasi jalur kanonikal Wnt akan menyebabkan aktivasi sel stellata hati, sedangkan aktivasi jalur non kanonikalnya akan menyebabkan stabilitas sitoskeleton sel stellata hati, polimerasi aktin, dan stabilisasi mikrotubul, yang selanjutnya akan berpengaruh pada polaritas dan motilitas sel stellata hati.⁷²

Sementara itu, jalur YAP/TAZ merupakan jalur yang berperan dalam homeostasis jaringan, perkembangan, dan kanker. Pada fibrosis hati, aktivasi jalur YAP/TAZ juga berperan dalam mempromosikan *Epithelial to Mesenchymal Transition* (EMT). Selain itu, jalur ini juga akan berinteraksi dengan jalur TGF- β melalui interaksinya dengan SMAD2/3 dimana protein TAZ dikatakan mampu mendorong akumulasi SMAD2/3 di nukleus. Jalur YAP/TAZ memiliki efek yang bertentangan dengan jalur Hippo sehingga aktivasi Hippo akan menekan ekspresi YAP/TAZ. Begitu pula halnya dengan NF-KB yang juga ditekan pada saat Hippo aktif, maka pada saat Hippo ditekan, YAP/TAZ yang aktif juga sejalan dengan aktifnya NF-KB.⁷³

Seluruh aktivasi jalur pensinyalan pro fibrotik ini akan mengarah pada peningkatan akumulasi matriks ekstraseluler. Dari sejak tahap awal paparan agen kausatif yang mencederai hepatosit dan menyebabkannya nekrosis hingga aktivasi berbagai jalur pensinyalan yang mengaktivasi sel stellata hati, tahap ini dikenal sebagai tahap inisiasi (*pre inflammatory stage*). Selanjutnya, mulai tahap dimana aktivasi tersebut dipertahankan dikenal sebagai tahap perpetuasi (*perpetuation stage*). Akan tetapi, ketika cedera mulai tertangani, hati mulai masuk dalam tahap resolusi (*resolution stage*). Pada tahap akhir ini, hati juga mulai meningkatkan faktor degradasi matriks. Keberhasilan faktor degradasi matriks dalam

mendegradasi matriks ekstraseluler yang terakumulasi akan menjadi awal yang baru dalam proses selanjutnya yakni regenerasi. Pada tahap resolusi ini, sel Kupffer yang tadinya mensekresikan sitokin pro fibrotik akan beralih mensekresikan sitokin anti fibrotik. Monosit yang mengekspresikan Ly6C^{hi} akan berubah menjadi Ly6C^{low} (Ly6C^+) yang memicu disekresikannya berbagai sitokin seperti IL-1, IL-10, disekresikannya *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Matrix Metalloproteinase*-9, -12, dan -13 (MMP-9, MMP-12, MMP-13) yang mendorong degradasi matriks ekstraseluler. Pada tahap ini juga terjadi apoptosis, senescence, atau quiescence dari sel stellata hati.⁵⁶

2.5. Peranan Stres Oksidatif dan Sistem Antioksidan pada Fibrosis Hati

Telah diketahui bahwa berbagai jalur pensinyalan akan berperan dalam proses fibrogenesis dengan TGF- β dan PDGF dikatakan sebagai jalur fibrosis yang utama. Selain itu, telah diketahui pula bahwa ROS merupakan suatu peristiwa kunci yang telah ada sejak awal mula yaitu, sejak dilepaskannya DAMPs, yang tidak hanya memicu aktivasi sel stellata hati, namun juga sebagai produk samping yang dihasilkan dari setiap proses menuju fibrosis serta membentuk lingkaran setan dengan fibrogenesis itu sendiri. ROS seolah menjadi suatu produk metabolit yang selalu menyertai proses fibrogenesis yang jumlahnya semakin terakumulasi hingga sistem antioksidan berhasil mengendalikannya.⁵⁶

Pada jalur TGF- β , ROS dapat mengaktifkan TGF- β laten dan meningkatkan ekspresinya. TGF- β yang meningkat akan menginduksi apoptosis hepatosit masif yang menyebabkan cedera hati kronis.⁵⁶ Di sisi lain, aktivasi TGF- β ternyata juga akan meningkatkan produksi ROS. Hal ini tampak dalam penelitian yang dilakukan oleh Ishikawa dkk (2014) yang berhasil membuktikan adanya peningkatan ROS pada mitokondria dan sitoplasma sel epitel mammary tikus pada 20 jam setelah diberikan TGF- β .⁷⁴ Selain itu, aktivasi TGF- β juga akan mensupresi sistem antioksidan seperti glutaredoksin, katalase, superoksida dismutase, dan glutathione peroksidase yang seharusnya diperlukan sebagai ROS scavenger.⁷⁵ Akan tetapi penelitian yang dilakukan oleh Prestigiacomo V dkk (2018) menunjukkan bahwa pada tikus dengan *Nrf2 knocked down*, aktivitas

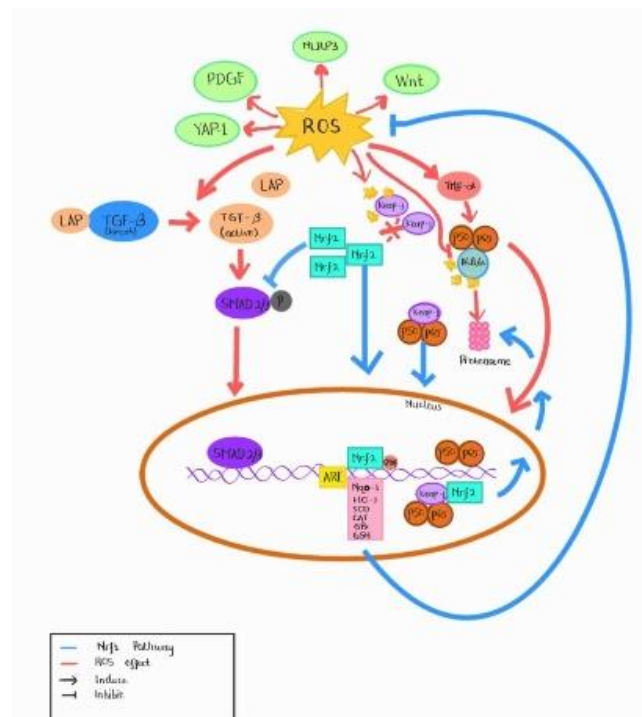
TGF- β /SMAD ditemukan lebih tinggi dibandingkan dengan *wild type* (memiliki Nrf2). Hal ini menunjukkan kemampuan Nrf2 dalam mengganggu ikatan TGF- β /SMAD melalui ikatannya secara langsung dengan SMAD2/3.⁷⁶ Berdasarkan kedua penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa TGF- β yang diaktifkan oleh ROS, akan mensupresi sistem antioksidan, sebaliknya sistem antioksidan yang meningkat akan menghambat jalur kanonikal TGF- β .⁴

Berbeda dengan TGF- β yang distimulasi aktivasinya oleh ROS, jalur pensinyalan PDGF tidak distimulasi oleh ROS namun justru menghasilkan ROS. Telah diketahui bahwa pada peningkatan PDGF diiringi dengan peningkatan ROS.⁷³ Bahkan pada fibrosis hati, aktivasi sel stellata hati akibat aktivasi PDGF dimediasi oleh ROS melalui fosforilasi Akt pada jalur PI3K/Akt dan p38 MAPK.⁷³

Sementara itu pada jalur inflamasi NF-KB, keberadaan ROS akan mengaktifkan jalur NF-KB namun jalur NF-KB juga akan menghasilkan ROS. Dalam hal ini NF-KB akan mendorong aktivitas mitokondria dan mengekspresikan NADPH Oxidase yang mana keduanya merupakan penghasil utama ROS endogen. Bersama dengan TGF- β , jalur NF-KB menjadi jalur pro fibrotik yang dapat dihambat secara langsung oleh Nrf2.⁴ Pada keadaan terdapat Nrf2 yang dipicu oleh stres oksidatif, Nrf2 akan meningkatkan produksi antioksidan endogen termasuk GSH. Adanya GSH yang meningkat akan berperan secara langsung sebagai *ROS scavenger* sekaligus mencegah ekspresi p65 sehingga NF-KB tidak dapat bekerja menjadi faktor transkripsi.⁶⁷

Berbeda halnya dengan NF-KB, pada jalur pensinyalan Wnt, mediator antara jalur Wnt dan ROS diperankan oleh protein *Disheveled* (Dvl) yang sebenarnya diregulasi secara negatif oleh keberadaan *Nucleoredoxin* (Nrx). Jalur Wnt akan aktif pada saat terdapat protein Dvl sehingga dalam keadaan tanpa stres oksidatif, Nrx akan berikatan dengan Dvl sehingga Dvl akan didegradasi dan tidak dapat mengaktifkan jalur Wnt. Namun, pada adanya ROS, Nrx akan dioksidasi oleh ROS (H_2O_2) sehingga tidak dapat mengikat Dvl. Hasilnya, Dvl yang bebas akan mengaktifkan jalur Wnt.⁷⁷ Akan tetapi, sejalan dengan supresi sistem antioksidan pada aktivasi TGF- β , pada aktivasi Wnt, keberadaan GSK3-B akan menginduksi degradasi Nrf2.⁷⁸

Pada jalur YAP/TAZ, ROS dapat dihasilkan melalui aktivasi TLR1/2/4 yang selanjutnya mengaktifkan *Macrophage Stimulating1/2* (MST1/2) yang merupakan bagian dari jalur pensinyalan Hippo. Namun, peneliti lainnya juga ada yang mengatakan bahwa ROS intraseluler juga dapat dihasilkan oleh YAP/TAZ sendiri yang tidak bergantung pada jalur pensinyalan Hippo. ROS yang meningkat pada stres oksidatif akan menyebabkan peningkatan aktivasi MST1 dari jalur Hippo yang merupakan regulator negatif bagi protein YAP/TAZ sehingga menghambat perkembangan ukuran organ. Aktivasi MST1 ini akan memodulasi stabilisasi Nrf2 agar semakin banyak Nrf2 yang bebas dan menjadi faktor transkripsi bagi aktivasi sistem antioksidan endogen.⁷



Gambar 2.11. Interaksi antara ROS, Nrf2, dan jalur pensinyalan pro fibrotik⁴

2.6. Regenerasi Hati

Regenerasi hati merupakan suatu proses yang terjadi ketika hati mengganti jaringannya yang rusak atau hilang sehingga dapat berfungsi normal kembali. Mengingat fungsinya sebagai pintu gerbang yang terpapar dengan berbagai bahan toksik, hati merupakan organ yang memiliki kemampuan yang luar biasa untuk beregenerasi. Bahkan, pada hepatektomi parsial 2/3 bagiannya, hati akan

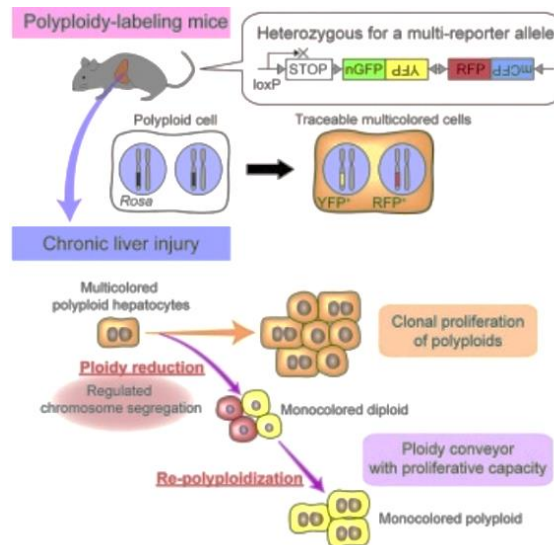
beregenerasi hingga mencapai 100% ukuran dan bentuk aslinya. Kemampuan hati yang berusaha mencapai 100% dari ukuran aslinya dikenal sebagai hepatostat hati.²¹

Adapun proses regenerasi hati sebenarnya telah dimulai segera setelah cedera terjadi.²¹ Pada dasarnya terdapat tiga tahapan penting dalam proses regenerasi hati. Tahap pertama dikenal sebagai **tahap persiapan**, merupakan tahap awal yang mana pada tahap ini hepatosit dipersiapkan untuk merespon sinyal dari faktor pertumbuhan. Pada tahap ini >100 gen diaktifkan. Tahap selanjutnya adalah **tahap proliferasi**, yang mana pada tahap ini reseptor faktor pertumbuhan seperti *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) dan reseptor HGF, yaitu, c-Met memegang peranan penting. Kedua reseptor ini bertindak secara sinergis sehingga tanpa salah satunya akan menimbulkan hambatan dalam proses regenerasi.²¹ Pada tahap proliferasi ini, hepatosit mengalami hipertrofi dan hiperplasia. Tahap terakhir adalah **tahap terminasi**, yang mana pada tahap ini hati telah mencapai ukuran dan fungsi normalnya sehingga proliferasi dihentikan. Pada tahap ini, TGF- β dan Integrin menjadi faktor yang penting.⁷⁹

Proses regenerasi hati ini juga diketahui berbeda antara regenerasi yang terjadi pada keadaan homeostasis, regenerasi setelah hepatektomi parsial, maupun regenerasi pada cedera hati akibat paparan bahan toksin. Regenerasi pada keadaan homeostasis merupakan regenerasi yang terjadi untuk menggantikan hepatosit yang rusak sebagai bagian mempertahankan homeostasis hati. Sementara regenerasi setelah hepatektomi parsial menunjukkan gambaran regenerasi hati mencapai ukuran dan fungsi normalnya dengan keadaan hepatosit sehat pada jaringan hati yang tertinggal.⁸⁰ Pada regenerasi ini, terdapat perbedaan respon regenerasi yang berkaitan dengan luas hepatektomi yang dilakukan. Regenerasi yang terjadi setelah dilakukan hepatektomi parsial yang menyisakan 2/3 bagian hati hanya melibatkan hipertrofi hepatosit saja dalam regenerasinya. Sementara itu, hepatektomi parsial yang hanya menyisakan 1/3 bagian hati melibatkan proliferasi dan hipertrofi hepatosit, namun tidak melibatkan sel progenitor hati. Hipertrofi hepatosit dimulai dalam beberapa jam setelah hepatektomi parsial, yang dengan segera diikuti oleh hiperplasia hepatosit. Pada tikus dan mencit, diketahui sintesis DNA dimulai dalam 12-16 jam setelah dilakukan hepatektomi parsial dan

mencapai puncaknya pada 24-48 jam. Sementara itu, massa hati ditemukan mulai kembali meskipun secara histologi masih belum seperti normalnya pada 3-7 hari setelah hepatektomi parsial. Proses regenerasi hati yang menghasilkan jaringan yang normal secara histologi maupun fungsinya dapat dicapai dalam 8-10 hari. Berbeda dengan mekanisme yang terjadi pada hepatektomi parsial di atas, hepatektomi parsial yang hanya menyisakan 10% hingga 20% bagian hati, justru akan memicu *cell reprogramming* berupa transdiferensiasi sel epitel biliaris menjadi hepatosit fungsional dalam regenerasinya.⁷⁹ Berbeda pula dengan regenerasi setelah hepatektomi parsial, regenerasi setelah cedera akibat toksin merupakan regenerasi yang bertujuan mengganti hepatosit yang rusak atau yang mengalami apoptosis.⁸⁰

Secara umum, berdasarkan pelakunya terdapat dua jenis regenerasi hati yaitu, regenerasi klasik yang dilakukan oleh hepatosit dan regenerasi alternatif yang dimediasi oleh sel punca / sel progenitor. Di antara kedua mekanisme ini, telah diketahui bahwa pelaku regenerasi utama di hati adalah hepatosit yang mengalami hipertrofi dan proliferasi kompensatif. Proliferasi yang terjadi pada hepatosit saat regenerasi hati akan menyebabkan hepatosit dewasa yang tadinya ada dalam bentuk poliploidi (4N hingga 32N) menjadi diploidi. Akan tetapi, penelitian yang dilakukan oleh Matsumono T dkk (2019) membuktikan bahwa repoliploidisasi akan terjadi pada bentuk hepatosit yang diploid tersebut.^{81,82} Hal tersebut menunjukkan bahwa hepatosit sebagai pelaku utama regenerasi hati memiliki keistimewaan tersendiri. Bahkan, hepatosit ini ternyata juga diketahui menjadi sumber *small hepatocyte-like progenitor cells* (SHPC) serta mampu bertransdiferensiasi menjadi kolangiosit pada saat dibutuhkan.^{83,84,85}



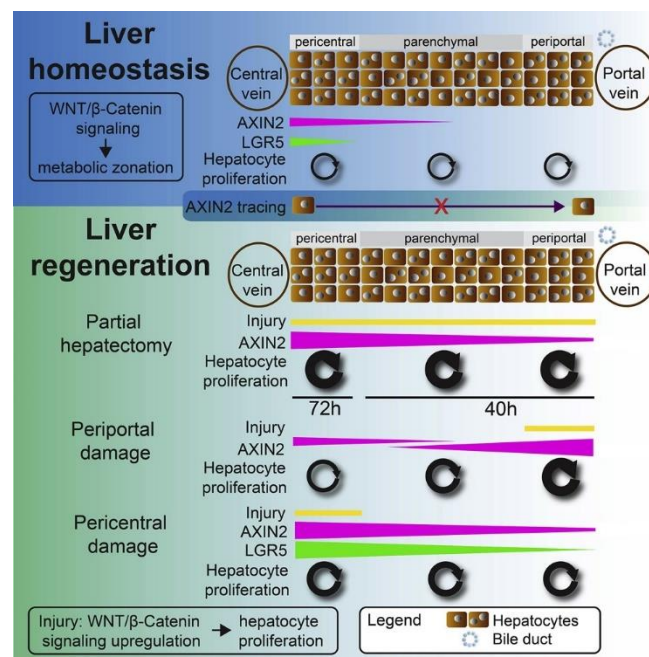
Gambar 2.12. Poliploidi, diploidi, dan repoliploidisasi pada hepatosit⁸¹

Selain itu, hepatosit pada hati juga memiliki perbedaan yang berhubungan dengan sistem zonasi hati dan cedera yang terjadi. Hepatosit di zona 1 terdiri dari hepatosit yang mengekspresikan $Mfsd2a^+$ dan hepatosit hibrid yang mengekspresikan $Sox9^+$.⁸⁰ Hepatosit di zona 2 merupakan kelompok hepatosit yang mengekspresikan $Hamp2$. Hepatosit di zona 3 (perisentral) mengekspresikan $Axin^{2+}$, $Tbx3$, *Glutamine sintase* (GS), serta tidak mengekspresikan CPS. Akan tetapi, selain ke 3 zona tersebut, juga terdapat kelompok hepatosit yang tersebar di seluruh zona hati yaitu, hepatosit dengan Tert-positive (*high* dan *low*).

Mengenai hepatosit yang mana yang berperan pada suatu keadaan, telah terjadi perdebatan. Penelitian oleh Wang dkk (2015) membuktikan bahwa hepatosit zona 3 merupakan hepatosit yang sebagian besar adalah diploid, dengan kemampuan proliferasi yang lebih cepat dibandingkan dengan hepatosit lainnya. Namun, ketika hepatosit itu keluar dari zona 3, ia telah berubah menjadi hepatosit yang poliploidi. Penelitian tersebut menyimpulkan bahwa hepatosit yang mengekspresikan $Axin^{2+}$ merupakan sel punca hepatosit yang berperan penting dalam proses regenerasi liver pada keadaan homeostasis. Hepatosit jenis ini memiliki kemampuan untuk memperbaharui dirinya sendiri karena pada penelitian tersebut diketahui bahwa hepatosit $Axin^{2-}$ tidak pernah menggantikan hepatosit di perisentral tersebut.⁸⁷ Sementara itu, keberadaan $Axin^{2+}$ pada sekitar

vena sentralis di zona 3 erat kaitannya dengan banyak terekspresinya Wnt2 dan Wnt9b di zona tersebut dimana jalur pensinyalan Wnt adalah jalur pensinyalan yang penting dalam proliferasi hepatosit di perisentral.⁸⁷ Hasil penelitian ini mematahkan pendapat bahwa hepatosit di seluruh zona hati memiliki peranan yang sama dalam proses regenerasi.

Akan tetapi, pada tahun 2020, penelitian oleh Sun dkk menyatakan hal yang justru sebaliknya. Mereka mengatakan bahwa hepatosit yang mengekspresikan Axin²⁺ memiliki kontribusi yang terbatas pada proses homeostasis dan regenerasi hati. Pada hati post hepatektomi parsial ditemukan bahwa proliferasi hepatosit terjadi pada hepatosit di seluruh hati, tidak hanya pada zona perisentral. Mereka juga menyatakan bahwa hepatosit di seluruh hati mampu mengupregulasi Axin²⁺ dan *Leucin-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5* (LGR5) setelah terjadi cedera hati.⁸⁶ Hal ini tampak bahwa ketika dilakukan ablasi Axin²⁺ dari hepatosit perisentral, maka zonasi hati akan terganggu sementara sehingga seluruh zona di hati akan mengupregulasi Axin2/LGR5 untuk merestorasi lingkungan perisentral kembali.⁸⁶



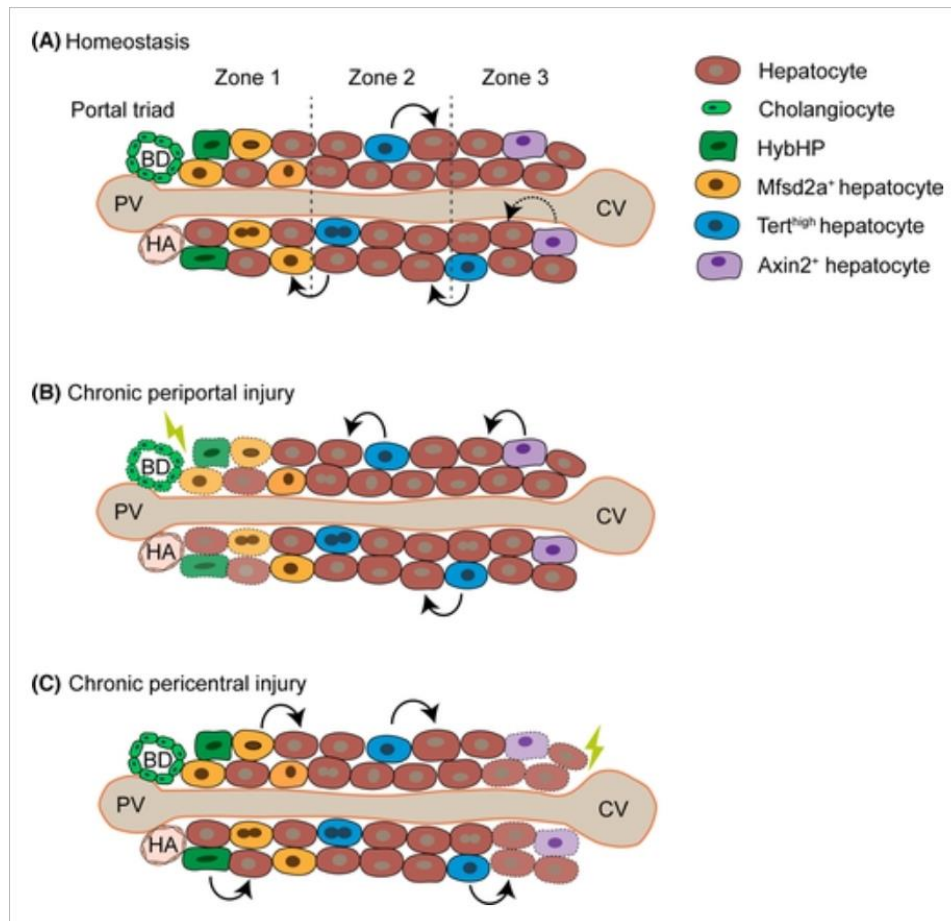
Gambar 2.13. Regenerasi hati menurut Sun dkk.⁸⁶

Pendapat yang berbeda kemudian juga dikemukakan oleh Wei dkk (2021) yang mengatakan bahwa homeostasis hati dipelihara oleh sel hepatosit pada zona

2. Pada keadaan homeostasis, Wei dkk juga berhasil memastikan bahwa sel epitel bilier yang dapat bertransdifferensiasi menjadi hepatosit pada keadaan cedera berat, ternyata tidak mengalami transdifferensiasi menjadi hepatosit sehingga pada homeostasis liver, peran regenerasi sepenuhnya dilakukan oleh hepatosit sendiri. Selain itu, mereka juga berhasil membuktikan bahwa hepatosit di zona 1 ternyata tidak berkontribusi terhadap generasi hepatosit baru dalam keadaan stabil, sebaliknya hepatosit di zona 2 dan 3 berkontribusi dalam pembentukan hepatosit di zona 1 dalam keadaan homeostasis. Sejalan dengan penelitian Sun dkk, penelitian oleh Wei dkk juga membuktikan bahwa zona 3 bukanlah sumber hepatosit baru yang signifikan pada keadaan homeostasis, sebaliknya hepatosit zona 3 juga dipertahankan secara independen oleh hepatosit di zona 1 dan 2. Sementara itu, hepatosit pada zona 2 yang mengekspresikan *Hamp2* justru bertambah banyak dalam homeostasis normal, yang menunjukkan bahwa repopulasi hepatosit pada keadaan homeostasis justru terjadi di zona 2.⁸² Tidak hanya itu, hepatosit zona 2 juga berkontribusi dalam regenerasi hati akibat cedera setelah pemberian *diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine* (DDC) pada hewan coba untuk menginduksi kolangiopati, sirosis biliaris, serta kerusakan duktus biliaris akibat obat-obatan. Selanjutnya, penelitian ini juga membuktikan bahwa hepatosit yang mengekspresikan *Tert*-positive yang sebelumnya dilaporkan terdistribusi secara acak di seluruh lobulus hati, ternyata ditemukan tidak didistribusikan secara acak, tetapi kemungkinan tumpang tindih dengan *Hamp2* serta mungkin turut berkontribusi pada repopulasi hepatosit pada keadaan homeostasis. Secara keseluruhan hepatosit di zona 2 tidak hanya berperan dalam homeostasis hati, namun juga berperan dalam regenerasi ketika zona 1 dan zona 3 rusak akibat hepatotoksin.⁸²

Hingga saat ini hepatosit mana yang secara pasti berperan dalam regenerasi hati masih menjadi masalah diskusi yang belum terpecahkan. Akan tetapi, dari berbagai penelitian yang telah dilakukan dapat dinyatakan bahwa pada keadaan cedera hati kronis di periportal, hepatosit di zona 1 (Hepatosit hibrid dan hepatosit yang mengekspresikan *Mfsd2a*⁺) akan menjadi hepatosit yang paling terdampak, sehingga regenerasi akan dilakukan terutama oleh hepatosit perisentral dan midlobuler terutama hepatosit *Tert-high*. Sementara itu, pada keadaan cedera

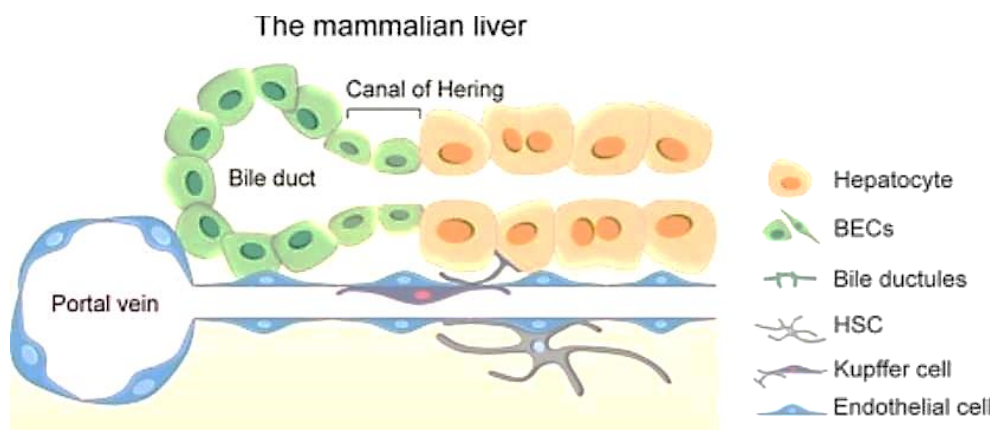
kronis di perisentral, hepatosit *Tert-high*, hibrid, dan *Mfsd2a*⁺ lah yang akan melakukan regenerasi dan mengembalikan populasi hepatosit di perisentral.⁸⁰



Gambar 2.14.Hepatosit pelaku regenerasi pada berbagai keadaan⁸⁰

Di sisi lain, regenerasi alternatif terjadi ketika regenerasi klasik tidak dapat terlaksana. Adapun mekanisme regenerasi alternatif ini diperankan oleh sel punca/progenitor hati. Pada manusia, terdapat Sel Punca Mesenkim (SPM) intrahepatik yang akhir-akhir ini banyak diteliti potensinya sebagai salah satu terapi pada fibrosis hati.⁸⁸ Seperti pada jaringan lainnya, sel mesenkim intrahepatik digambarkan sebagai sel dengan morfologi seperti fibroblas yang dapat berasal baik dari sel parenkimal hati maupun dari sel non parenkimal hati.⁸⁸ Ketika SPM intrahepatik berdiferensiasi hepatogenik, SPM tersebut akan berubah menjadi berbentuk poligonal.⁸⁸ Sementara itu, sel progenitor hati pada tikus dikenal sebagai sel oval, yang diketahui dapat berasal dari hepatosit sendiri, maupun dari sel epitel biliaris. Bersama dengan sel punca intrahepatik, sel

progenitor hati ini terletak di *Canal of Hering*, suatu tempat di antara hepatosit dan *ductus biliaris*. Regenerasi alternatif ini oleh kedua jenis sel ini terjadi pada cedera hati yang parah atau kronis yang disertai dengan penghambatan pada proliferasi hepatosit yang menggambarkan adanya reaksi duktular, melibatkan infiltrasi makrofag, renovasi matriks ekstraselular, serta adanya aktivasi sel stellata hati.⁸⁹ Selain itu, regenerasi alternatif ini juga dipicu oleh adanya kematian hepatosit yang akan mensekresikan ligan bagi jalur pensinyalan Hedgehog yang selanjutnya akan mempromosikan aktivasi sel progenitor hati dan myofibroblas.⁸⁹



Gambar 2.15. Lokasi sel progenitor hati pada *Canal of Hering*.⁸⁹

Sementara itu, terdapat sumber lain ekstrahepatik yang juga berperan dalam regenerasi hati. Sel punca yang berasal dari sumsum tulang (sel punca mesenkim dan sel punca hematopoetik) juga ditemukan memiliki peran dalam regenerasi hati meskipun kecil. Akan tetapi, pada penelitian oleh Lai dkk (2021) ditemukan bahwa pada keadaan fibrosis maupun sirosis hati, peranan sel punca ekstrahepatik dalam regenerasi hati ditemukan tidak sebanding dengan sel punca intrahepatik yang telah disebutkan sebelumnya. Dalam hal ini, sel punca intrahepatik menunjukkan kemampuan bertahan hidup dan diferensiasi menjadi hepatosit yang lebih baik dibandingkan dengan sel punca ekstrahepatik pada keadaan yang sama.⁹⁰ Sejalan dengan hal tersebut, penelitian oleh Menthen dkk (2008) bahkan membuktikan bahwa sel punca ekstrahepatik yang berasal dari sumsum tulang justru tidak bertransdiferensiasi menjadi sel oval hati.⁹¹

Pada regenerasi hati, telah diketahui pula bahwa perubahan proses redoks selalu mengiringi proses tersebut sehingga dalam hal ini, Nrf2 juga disebut-sebut

sebagai salah satu faktor transkripsi yang turut memodulasi regenerasinya.⁹² Nrf2 diketahui berkontribusi dalam mengatur efek proliferasi dari parenkim hati serta mempertahankan diferensiasi hepatosit yang baru beregenerasi sehingga pada regenerasi hati Nrf2 ditemukan meningkat ekspresinya.⁹² Pada penelitian yang dilakukan oleh Chan dkk (2021), dibuktikan bahwa pada tikus post hepatektomi parsial 2/3 bagiannya, adanya aktivasi Nrf2 secara signifikan dapat meningkatkan laju pemulihan volume hati dan fungsinya. Pada penelitian ini didapatkan bahwa terdapat hipertrofi dan proliferasi hepatosit, penekanan sistem imun dan inflamasi, serta terjadinya adaptasi metabolik pada jaringan hati yang tersisa yang bergantung pada Nrf2.¹¹

2.7. Efek Carbon Tetrachloride pada Hati

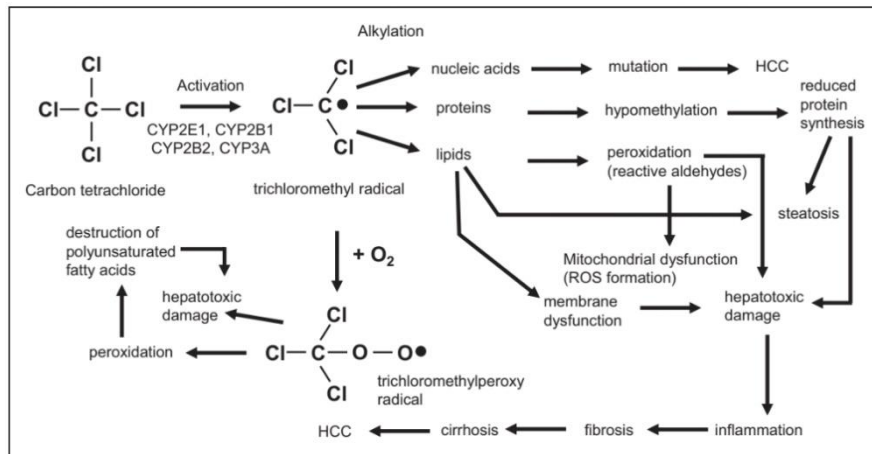
Carbon tetrachloride (CCl₄) merupakan suatu senyawa kimia organik non polar yang dibuat untuk dimanfaatkan dalam produksi cairan pendingin dan propelan untuk kaleng aerosol. Selain itu juga dipakai sebagai pestisida, cairan pembersih dan bahan pembersih, pelarut lemak dan cat, serta sebagai bahan dalam alat pemadam kebakaran maupun sebagai bahan penghilang noda. Oleh karena termasuk dalam bahan kimia berbahaya, maka saat ini penggunaannya hanya dibatasi pada beberapa aplikasi industri dan penelitian.^{93,94}

Penggunaan CCl₄ dalam bidang penelitian telah diaplikasikan sejak lama. CCl₄ merupakan bahan yang tidak berwarna, lebih kental dari air dan tidak larut dalam air, tidak mudah meledak, namun sangat beracun dan bersifat karsinogenik.⁹³ CCl₄ telah diketahui memiliki efek hepatotoksitas yang tinggi yang dimanfaatkan untuk menginduksi munculnya penyakit hati pada hewan coba baik yang terjadi secara akut maupun kronis.

Adapun, CCl₄ dapat masuk ke tubuh melalui berbagai cara yaitu, melalui sistem respirasi, gastrointestinal, atau melalui absorpsi kulit. Uap CCl₄ dapat terinhalasi masuk melalui sistem respirasi dan menyebabkan depresi sistem saraf pusat serta degenerasi hati maupun ginjal. Sementara absorpsi dari kulit hanya mungkin terjadi oleh CCl₄ yang cair namun tidak dalam bentuk gas (uap). Dalam bidang penelitian yang menggunakan CCl₄ untuk menginduksi cedera hati pada hewan coba, pemberian CCl₄ terutama secara injeksi. Beberapa peneliti

menginduksi cedera hati dengan menginjeksikan CCl₄ secara intraperitoneal.^{96,97} Sementara peneliti lainnya menginjeksikan CCl₄ secara subkutan.^{98,99}

Setelah masuk ke dalam tubuh, CCl₄ akan segera terdistribusi baik ke jaringan lemak, hati, sumsum tulang, kelenjar adrenal, darah, otak, medulla spinalis, maupun ginjal.^{93,95} Akan tetapi, CCl₄ merupakan bahan toksik yang terutama dimetabolisme di hati.⁹⁴ Akan tetapi, beratnya kerusakan yang ditimbulkannya sangat dipengaruhi oleh konsentrasi dan frekuensi pemberiannya. Mekanisme toksisitas CCl₄ terhadap hati terjadi dalam beberapa fase yang berbeda. Pada fase pertama setelah CCl₄ diberikan, hati mengalami nekrosis, peningkatan aktivitas enzim hati dan menurunnya pseudokolinesterase. Kerusakan yang ditimbulkan oleh CCl₄ terhadap sel-sel hati ini merupakan kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh peroksidasi lipid. Melalui fungsi hati yang mampu memetabolisme xenobiotik, CCl₄ oleh enzim sitokrom P450 khususnya CYP2E1 akan diubah menjadi *trichloromethyl* (CCl₃) yang radikal yang akan menghantarkan hati masuk ke fase kedua. Pada fase kedua ini, CCl₃ radikal akan bereaksi dengan asam nukleat, protein, lemak, dan mengganggu proses seluler dalam metabolisme lipid sehingga terjadi degenerasi lemak dan steatosis serta menurunkan kuantitas protein. Pada fase ini, akumulasi lemak hati secara masif akan terjadi dan disertai dengan peningkatan trigliserida serum dan Aminotransferase (AST) serum yang signifikan. Selain itu, peningkatan kadar hidroksiprolin dan menurunnya fungsi liver secara menyeluruh juga terjadi.^{94,95} Pada fase akhir, pseudokolinesterase yang semakin menurun juga akan disertai dengan atrofi hati serta penurunan albumin serum, penurunan berat badan, dan perubahan morfologi menjadi fibrosis.⁹⁵ CCl₃ yang bereaksi dengan DNA dapat pula menyebabkan mutasi DNA sehingga terbentuk karsinoma hepatoseluler. Secara keseluruhan, CCl₄ yang diberikan akan menyebabkan penurunan permeabilitas membran pada seluruh kompartemen baik mitokondria, retikulum endoplasma, dan membran plasma sehingga terjadi kerusakan hati yang menyeluruh yang menunjukkan gambaran inflamasi, fibrosis, sirosis, hingga karsinoma.⁹⁵



Gambar 2.16. Metabolisme CCl₄⁹⁵

2.8. Efek 2-Acetylaminofluorene pada Hati

2-Acetylaminofluorene (2-AAF) / C₁₅H₁₃NO merupakan bahan kimia turunan fluorene, berbentuk kristal padat yang berwarna coklat muda, tidak larut dalam air, namun larut dalam alkohol, glikol, eter, asam asetat, serta pelarut lemak. Pada manusia, 2-AAF dapat masuk ke tubuh melalui inhalasi dan kontak kulit.¹⁰⁰ Adapun 2-AAF banyak digunakan sebagai bahan yang memiliki sifat antimitotik, karsinogenik, dan mutagenik, sehingga juga banyak digunakan oleh para ilmuwan dalam studi karsinogenesis dan mutagenesis.^{84,100,101} Efek antimitotik 2-AAF diketahui dapat menghambat proliferasi hepatosit, namun, pada saat hepatosit dihambat, justru sel punca/sel progenitor hati akan berproliferasi untuk meregenerasi hati.⁸⁴

Penggunaan 2-AAF untuk menginduksi model cedera hati telah sering dilakukan. Dalam hal ini, pemberian 2-AAF bersama bahan induktor lainnya dapat menginduksi model cedera hati kronis.⁸⁴ Pada penelitian yang dilakukan oleh Sanchez-Meza dkk (2022), penggunaan *Diethylnitrosamine* (DEN) bersama dengan 2-AAF secara kronis berhasil menciptakan model tikus Wistar dengan karsinoma hepatoseluler.¹⁰² Begitu pula dengan penelitian oleh Liem dkk (2020) telah berhasil menciptakan model cedera hati kronis pada tikus dengan paparan berulang 2-AAF dan CCl₄.⁹⁹ Sejalan dengan penelitian ini, penelitian oleh Xu dkk (2021) juga telah berhasil menciptakan model hewan dengan fibrosis hati dengan menggunakan 2-AAF bersama dengan CCl₄.⁹⁸

Pada penelitian yang dilakukan oleh Hasanin dkk (2021) yang menilai kemampuan 2-AAF dalam mempromosikan timbulnya lesi prakanker bila dikombinasikan oleh DEN. Pada penelitian tersebut, tampak terjadinya peningkatan persentase area fokus prakanker yang disertai penurunan signifikan pada mRNA, RAB11A, Bax, dan p53. Sebagai bahan karsinogenik, 2-AAF mempromosikan lesi prakanker dengan proliferasi sel yang disertai dengan menurunkan ekspresi gen autofagi, apoptosis, supresor tumor. Selain itu, juga meningkatkan proliferasi sel dengan cara yang bergantung pada waktu dan dosis.¹⁰³

2.9. Sel Punca Mesenkim asal Tali Pusat Manusia

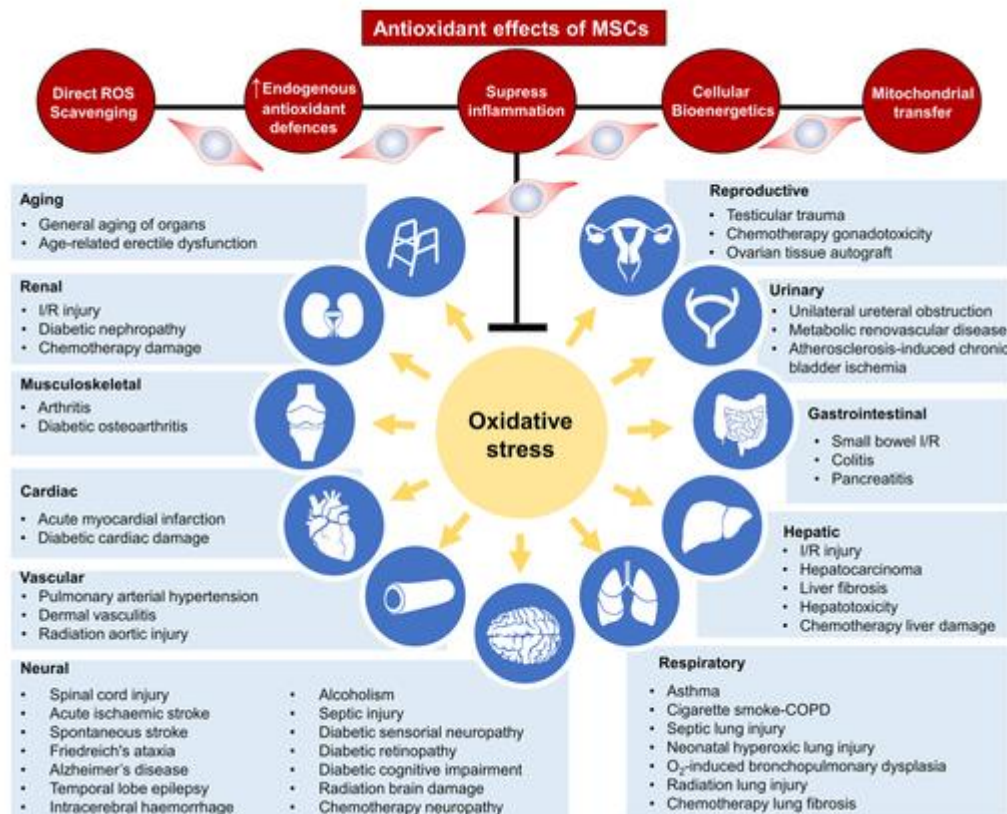
Sel punca didefinisikan sebagai sel yang belum berdiferensiasi, yang dapat membentuk replikanya sendiri, maupun mengalami diferensiasi lebih lanjut membentuk berbagai jenis sel yang ada di dalam tubuh. Ketika sebuah sel punca membelah secara simetris, ia akan menjadi dua buah sel punca yang sama. Namun ketika ia membelah secara asimetris, ia akan menghasilkan sebuah sel punca dan sebuah sel yang siap berdiferensiasi.¹⁰⁴

Pertama kali ditemukan oleh Theodor Heinrich Boveri (1862 – 1915) dan Valentin Hacker (1864 – 1927), sel punca awalnya digambarkan sebagai sel yang berkomitmen menjadi sel lapisan germinal. Selanjutnya penemuan tersebut terus berkembang hingga kemudian pada tahun 1981, Sir Martin John Evans (lahir tahun 1941) dan Matthew Kaufman (1942 – 2013) membudidayakan sel induk embrio tikus di laboratorium pertama kalinya yang selanjutnya bersama Mario Capecchi dan Oliver Smithies memenangkan hadiah nobel bidang fisiologi dan kedokteran pada tahun 2007. Pada tahun 1988 transplantasi sel punca mesenkim asal tali pusat (SPM-TP) pertama kali dilakukan pada seorang anak dengan anemia Fanconi dan tahun 1998 James Alexander Thomson, seorang ahli biologis, mulai menemukan sel punca embrio manusia. Pada tahun 2012 Shinya Yamanaka dan John Gurdon mendapat hadiah nobel atas penemuannya yang berhasil mengembalikan kepuncaan sel dewasa (*induced Pluripotent Stem Cell / iPSC*).¹⁰⁴

Berdasarkan plastisitasnya, sel punca dikelompokkan menjadi lima jenis sel punca yaitu, totipoten / omnipoten, pluripoten, multipoten, oligopoten, dan

unipoten. Dari kelima jenis sel punca ini, sel punca embrionik (berasal dari embrio) mulai dari *zigot* hingga tahap awal *blastomere* merupakan sel yang paling mampu menjadi sel apa saja (totipoten) termasuk menjadi sel ekstraembrionik dan sel lapisan germinal. Sementara sel pluripoten adalah sel yang dapat menjadi sel lapisan germinal namun tidak dapat menjadi sel ekstraembrionik. Kelompok ini terutama diwakili oleh sel embrionik yang berasal dari *inner cell mass* dari fase *blastocyst*. Jenis sel punca lainnya yaitu, multipoten dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel. Contoh dari sel punca jenis ini adalah SPM yang mana saat ini yang paling sering digunakan adalah SPM dari sumsum tulang, jaringan adiposa, serta tali pusat.^{104,105} Sel punca hematopoetik dan sel punca bronkoalveolar merupakan contoh sel punca oligopoten yang dapat berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel. Dalam hal ini diferensiasinya menjadi lebih terbatas dibandingkan jenis multipoten. Yang terakhir yaitu, jenis unipoten yang merupakan jenis sel punca yang hanya mampu berdiferensiasi menjadi satu jenis sel saja misalnya sel punca otot.¹⁰⁴

Dalam beberapa tahun terakhir ini, SPM telah banyak diteliti untuk memahami perannya dalam fungsi regeneratif di berbagai organ. Banyak uji klinis telah dilakukan dengan menggunakan SPM.¹⁰⁵ Bahkan akhir-akhir ini, SPM diketahui juga memiliki efek antioksidan yang ditemukan pada berbagai model penyakit sehingga dapat memperbaiki cedera oksidatif dan nitrosatif. Secara garis besar, SPM dikatakan mampu menurunkan peroksidasi lipid, oksidasi protein, meningkatkan aktivitas antioksidan endogen, menurunkan apoptosis, menelan mitokondria sel yang diberikan hidrogen peroksida, serta menyumbangkan mitokondria fungsional ke sel yang diberi perlakuan hidrogen peroksida. Selain itu, SPM juga diketahui dapat menekan inflamasi serta berperan sebagai *direct ROS scavenger*.¹⁰

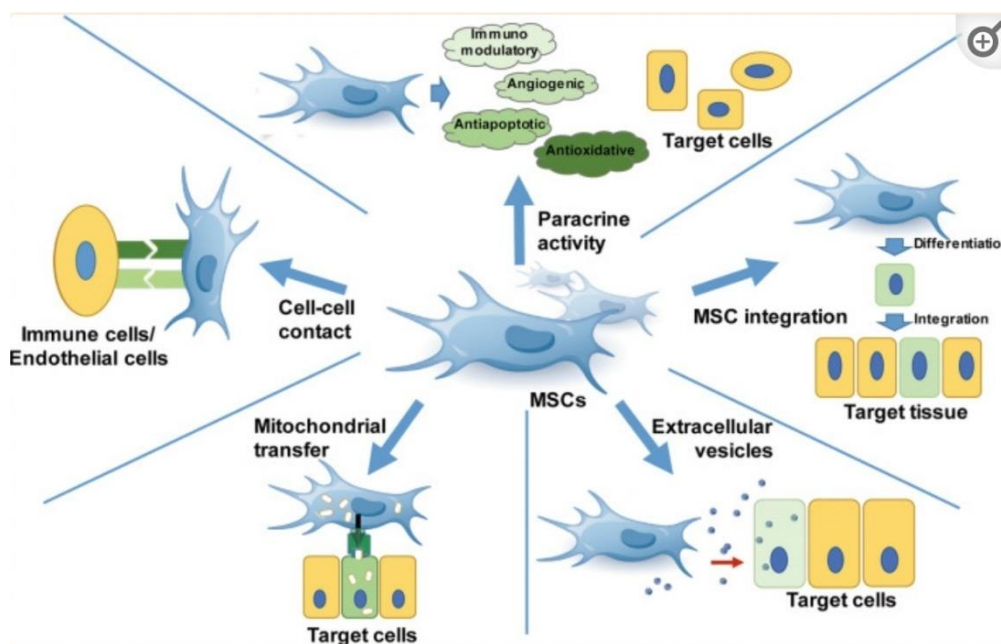


Gambar 2.17. Efek Antioksidan SPM¹⁰

Secara garis besar terdapat dua mekanisme utama yang menjelaskan bagaimana SPM bekerja yaitu, dengan cara berdiferensiasi untuk menggantikan sel yang rusak dan dengan meregulasi respon imun. Kedua mekanisme ini terkait erat dengan fungsi parakrin SPM itu sendiri dimana SPM mengeluarkan berbagai faktor terlarut yang memberikan efek imunomodulator, angiogenik, antiapoptotik, maupun antioksidan.¹⁰⁵ Dengan adanya efek parakrin dari faktor terlarut ini, SPM dapat memodulasi sistem imunopresifnya, meningkatkan viabilitas sel, bahkan mentransfer mitokondria ke sel yang rusak melalui sistem *tunneling nanotubes* (TNT).¹⁰⁵

Namun, beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa tidak hanya SPM secara langsung yang memberikan efek terapeutik yang baik, namun eksosom maupun media terkondisi yang diturunkan dari SPM ini juga mampu memberikan efek yang menjanjikan. Basir dkk (2022) menemukan bahwa media terkondisi yang diturunkan dari SPM-TP manusia juga mampu meningkatkan keseimbangan

antara kandungan oksidan dan antioksidan hati, menurunkan TGF- β dan TNF- α yang berperan dalam fibrosis hati dan inflamasi.⁹ Sementara itu, Ling dkk (2023) menemukan bahwa eksosom dari SPM dapat memperbaiki gangguan morfologis pada hati yang menua melalui kemampuannya dalam pemrograman ulang metabolik dan stabilitas genom. Eksosom SPM ditemukan mampu menurunkan kadar gliserofolipid jenuh, palmitoil-gliserol, dan turunan eicosanoid yang terkait dengan lipotoksitas dan peradangan yang konsisten dengan penurunan fosforilasi enzim metabolik.¹⁰⁶



Gambar 2.18. Mekanisme Kerja SPM. SPM bekerja melalui aktivitas parakrin, integrasi SPM, vesikel ekstraseluler, transfer mitokondrial, hingga sel endotel.¹⁰⁵

Lebih lanjut dalam memahami peranan SPM dalam stres oksidatif, penelitian da Costa Goncalves dkk (2017) dengan hewan coba tikus yang diinduksi colitis menggunakan *Dextran Sulfat Sodium* (DSS) 2% oral selama tujuh hari lalu diberikan SPM pada hari kedua dan kelima secara intravena mengkonfirmasi bahwa kelompok yang mendapat SPM terlindungi dari kerusakan colon akibat DSS. Selain itu, pada kelompok ini juga didapatkan kadar antioksidan endogen yang tidak menurun meskipun diberikan DSS. Pada kelompok yang diberi DSS dan SPM, kadar GSH dan SOD tampak hampir sama

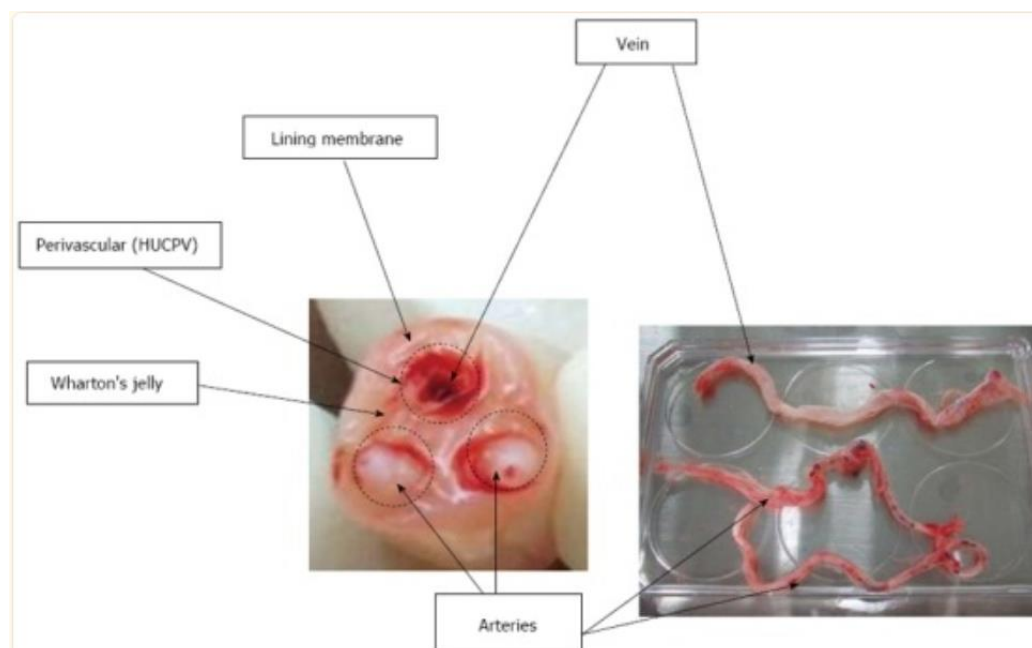
dengan kontrol sehat, namun kadarnya justru menurun pada kelompok yang diberikan DSS tanpa SPM. Tetap stabilnya kadar GSH ini diduga bahwa kemungkinan SPM merupakan sumber sistein yang dibutuhkan oleh GSH, namun tetap stabilnya SOD belum dapat dijelaskan sebabnya.¹⁰⁷

Akan tetapi, penelitian Jeong dkk (2018) mengenai glutathion dan SPM membuktikan adanya peranan GSH dalam mempertahankan sifat kepuncaan dan kapasitas migrasi SPM.¹⁰⁸ Sementara itu, gangguan homeostasis GSH pada penerima transplantasi sel punca menyebabkan patogenesis *Graft-versus-host disease* (GVHD).¹⁰⁹ Pada penelitian lanjutan oleh Lim J (2020) mengenai dinamika GSH diketahui bahwa produksi GSH ditentukan oleh upregulasi dari CREB1/Nrf2 dan keberadaan GSH yang tinggi pada SPM yang diinjeksikan terbukti mampu memberikan perbaikan jaringan yang lebih baik dibandingkan dengan pemberian SPM tanpa suplementasi GSH.⁵¹

Penelitian lainnya oleh Liu dkk (2023) yang juga berusaha memahami efek antioksidan pada SPM menemukan bahwa selain perannya dalam menghambat infiltrasi sel-sel radang dan ekspresi sitokin pro inflamasi, sel punca ini juga secara langsung mengaktifkan jalur pensinyalan Nrf2 dengan menurunkan ekspresi Keap1 sehingga lebih banyak Nrf2 yang bebas. Pada penelitian ini, pada kelompok yang diberikan inhibitor Nrf2, tampak SPM tidak mampu melindungi colon. Hal ini semakin memperkuat bahwa SPM memiliki efek protektif yang dijumpai oleh keberadaan jalur Nrf2/Keap1/ARE.¹⁰⁷ Dari penelitian-penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan timbal balik secara positif antara CREB1/Nrf2/GSH dengan SPM. Pada penelitian ini dipilihlah SPM yang berasal dari tali pusat manusia. Dalam hal ini, tali pusat manusia merupakan suatu sumber yang menjanjikan dalam perkembangan sel punca karena memberikan berbagai manfaat. Di antaranya adalah prosedur yang noninvasif sehingga tidak sakit untuk mendapatkannya, bersifat multipoten, tidak terkait dengan masalah etik karena tali pusat adalah bahan yang akan dibuang, serta memiliki kemampuan imunomodulator.¹¹¹ SPM-TP juga memiliki imunogenisitas yang rendah karena kurangnya HLA-DR dan ekspresi molekul MHC kelas I, serta kurangnya ekspresi CD80 dan CD86 dimana CD80 dan CD86 merupakan molekul kostimulator yang menginduksi aktivasi dan kelangsungan hidup sel T. Kekurangan faktor-faktor ini

menyebabkan rendahnya penolakan akut oleh tubuh resipien terhadap SPM-TP sehingga sel punca ini dapat menjadi kandidat yang potensial untuk pemberian sel punca secara alogenik.¹¹¹ Selain itu SPM-TP juga diketahui memiliki kemampuan immunosupresif yang diaktivasi oleh adanya sitokin pro inflamasi yang selanjutnya akan menekan proliferasi sel T.¹¹¹

SPM-TP sendiri ternyata dapat diisolasi dari beberapa kompartemen yang terdapat di tali pusat. Ia dapat diisolasi dari darah tali pusat, tali pusat utuh, Wharton's Jelly, subamnion, maupun sel punca perivaskular. Dalam hal ini terdapat metode yang berbeda untuk mengisolasi SPM-TP dari kompartemen yang berbeda. Terdapat dua metode dasar untuk isolasinya yaitu, **metode eksplan** yang dilakukan dengan melakukan kultur pada sel dan fragmen-fragmen kecil hasil pencincangan pada tali pusat sebelumnya dan **metode digestif enzimatik** yang menggunakan enzim kolagenase sederhana, atau kombinasi kolagenase dan hyaluronidase dengan atau tanpa tripsin, atau kombinasi antara kolagenase, dispase II, dan hyaluronidase.¹¹¹



Gambar 2.19. Kompartemen dalam Tali Pusat Manusia¹¹¹

Sel punca yang berhasil dikultur selanjutnya akan dianalisa dengan menggunakan *flowcytometri*. Pada tahap ini, sel punca akan dikenali oleh alat karena mengekspresikan biomarker tertentu. Namun, tidak ada biomarker spesifik

tunggal untuk mengidentifikasi sel punca multipoten.¹¹¹ Biomarker mesenkimal dapat berupa CD90, CD73, dan CD105. Sel punca yang berasal dari Wharton's Jelly dan vaskular tali pusat juga positif untuk CD13, CD29, CD73, CD90, dan CD105.¹¹¹

Dilatarbelakangi oleh berbagai keuntungan yang didapat dari penggunaan SPM asal tali pusat ini, maka berbagai penelitian secara luas dilakukan untuk menilai potensinya. Pada cedera hati, SPM-TP secara efektif bekerja dengan menekan proliferasi dan menginduksi apoptosis sel stellata hati, serta mengurangi produksi TGF- β , HGF, maupun IL-10.⁸⁸ Sejalan dengan hal tersebut, penelitian oleh Sa'dyah dkk (2021) juga membuktikan bahwa kadar TGF- β yang merupakan jalur utama fibrosis hati ditemukan menurun secara signifikan setelah tujuh hari pasca pemberian SPM pada hewan coba.¹¹²

Perkembangan penelitian mengenai SPM tidak hanya berhenti pada bagaimana SPM bekerja, namun secara lebih lanjut mengarah pada penentuan dosis optimum yang dapat memberikan hasil yang baik. Hingga saat ini masih terdapat perdebatan antara dosis optimum yang diberikan. Secara umum, terdapat penelitian yang menyatakan bahwa dosis yang lebih tinggi akan memberikan hasil yang lebih baik. Namun, beberapa peneliti justru menyatakan sebaliknya. Penelitian oleh Chin dkk membuktikan bahwa pemberian SPM-TP dosis 2 juta sel/kgBB menghasilkan hasil yang lebih baik pada semua parameter yang diuji serta tidak ditemukan adanya efek samping bila dibandingkan dengan dosis SPM-TP 1 juta sel/kgBB.¹⁶ Sejalan dengan hasil ini, penelitian oleh Florea dkk (2017) membuktikan bahwa pemberian SPM dari sumsum tulang dengan dosis 100 juta sel pada pasien dengan *Ischemic cardiomyopathy* (ICM) memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dosis 20 juta sel.¹⁷ Sebaliknya, penelitian yang dilakukan oleh Chen dkk (2023) membuktikan bahwa penurunan volume infark terbaik justru ditemukan pada pemberian SPM dengan dosis rendah yaitu, dosis 1 juta sel. Akan tetapi, dosis yang lebih tinggi dapat menghambat aktivasi mikroglia lebih kuat dibandingkan dengan dosis rendah SPM.¹¹³ Sementara itu, pada penelitian oleh Li dkk (2023) yang membandingkan dosis sel punca mesenkim jaringan adiposa membuktikan bahwa hasil terbaik dicapai dengan pemberian dosis 20 juta sel / kgBB pada mencit dengan sepsis, sedangkan pada dosis yang

lebih rendah hasil kurang baik dan pada dosis yang lebih tinggi (40 juta sel/kgBB) justru terjadi perburukan pada disfungsi koagulasi.¹¹⁴ Penelitian lain oleh Fazekas dkk (2022) membuktikan bahwa hasil lebih baik dicapai pada pemberian SPM-TP berulang pada 4 dan 48 jam setelah pemberian pertama.¹¹⁵

Penelitian mengenai SPM terutama SPM-TP masih terus dikembangkan. Masih banyak hal yang belum diketahui hingga saat ini terkait mekanisme kerja hingga dosis optimumnya. Akan tetapi, hasil yang menjanjikan dari penggunaan SPM-TP telah tampak secara jelas dalam berbagai penelitian menggunakan hewan coba.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian payung penelitian dr. Isabella Kurnia Liem, M.Biomed, PhD, PA dari Departemen Anatomi FKUI yang berjudul Pengaruh Pemberian Sel Punca Mesenkim Asal Tali Pusat Terhadap Status Oksidasi, Aktivitas Endotel dan Matriks Ekstraseluler Jaringan Hati Tikus yang Mengalami Cedera Hati Kronis. Penelitian ini merupakan penelitian dengan desain penelitian eksperimental.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Developmental Biology Departemen Anatomi FKUI dan Laboratorium Departemen Biokimia FKUI pada bulan Desember 2022 – Juni 2023

3.3. Sampel Penelitian

Subyek penelitian adalah bahan biologi tersimpan (BBT) dari penelitian sebelumnya dalam bentuk *Formalin Fixed Paraffin Embedded* (FFPE) dan *tissue homogenate* yang disimpan pada suhu -80 C. Penelitian ini telah mendapatkan izin etik dari Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Nomor: KET-559/UN2.F1/ETIK/PPM.00.02/2022. Adapun bahan biologi tersimpan tersebut berupa jaringan hati tikus *Rattus norvegicus* strain *Wistar* jantan milik dr. Isabella Kurnia Liem, M.Biomed, PhD, Departemen Anatomi FKUI, yang mana tikus yang digunakan sebagai sampel adalah tikus dengan usia 8 minggu dan berat antara 160 – 200 gram. Jaringan hati tersebut terdiri dari empat kelompok perlakuan. Penentuan jumlah subyek penelitian per kelompok dilakukan dengan menggunakan rumus Frederer:

$$(n-1)(t-1) \geq 15 ; \text{ dengan}$$

t = jumlah kelompok, n = jumlah sampel

Berdasarkan penghitungan sampel, maka subyek yang akan digunakan adalah enam sampel BBT per kelompok perlakuan untuk setiap parameter yang akan diperiksa, dengan riwayat perlakuan pada setiap kelompok sebagai berikut:

Kelompok Tikus	Perlakuan
Kelompok I (kontrol sehat / kelompok sehat)	Injeksi <i>Olive oil</i> subkutan 2x/minggu pada kuadran bawah abdomen selama 12 minggu + Polyethylene Glycol (PEG)intragastrik tiap hari pada minggu ke-9 hingga minggu ke-12. Euthanasia dilakukan pada akhir minggu ke-14.
Kelompok II (kontrol sakit / kelompok 2AAF/CCl4)	CCl4 2mL/kg (pelarut <i>olive oil</i>) injeksi subkutan (abdomen kuadran bawah), 2x seminggu selama 12 minggu, dengan perbandingan CCl4: <i>Olive Oil</i> pada minggu pertama hingga ke-8 = 1:1, selanjutnya 3:7 hingga minggu ke-12. 2AAF 10 mg/kg dalam PEG, intragastrik, tiap hari, mulai minggu ke-9 hingga minggu ke-12. Euthanasia dilakukan pada akhir minggu ke-14.
Kelompok III (2AAF/CCl4 + SPM-TP 1 juta / Kelompok SPM-TP 1 juta)	CCl4 2mL/kg (pelarut <i>olive oil</i>) injeksi subkutan (abdomen kuadran bawah), 2x seminggu selama 12 minggu, dengan perbandingan CCl4: <i>Olive Oil</i> pada minggu pertama hingga ke-8 = 1:1, selanjutnya 3:7 hingga minggu ke-12. 2AAF 10 mg/kg dalam PEG, intragastrik, tiap hari, mulai minggu ke-9 hingga minggu ke-12. SPM-TP diberikan secara intravena melalui vena ekor permukaan dengan dosis 1×10^6 sel dalam 500 μ L NaCl Fisiologis. Euthanasia dilakukan pada akhir minggu ke-14.
Kelompok IV (2AAF/CCl4 + SPM-TP 3 juta / Kelompok SPM-TP 3 juta)	CCl4 2mL/kg (pelarut <i>olive oil</i>) injeksi subkutan (abdomen kuadran bawah), 2x seminggu selama 12 minggu, dengan perbandingan CCl4: <i>Olive Oil</i> pada minggu pertama hingga ke-8= 1:1, selanjutnya 3:7 hingga minggu ke-12. 2AAF 10 mg/kg dalam PEG, intragastrik, tiap hari, mulai minggu ke-9 hingga minggu ke-12. SPM-TP diberikan secara intravena melalui vena ekor permukaan dengan dosis 1×10^6 sel dalam 500 μ L NaCl Fisiologis diberikan pada minggu ke-12 selama tiga hari berturut-turut (total 3×10^6 sel). Euthanasia dilakukan pada akhir minggu ke-14.

Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Satuan	Cara Ukur	Skala
Bebas SPM-TP		sel		Nominal
Terikat Konsentrasi MDA	Kadar MDA dalam homogenat jaringan hati	nmol/mgprot	Spektrofotometri	Numerik
Konsentrasi GSH	Kadar GSH pada homogenat jaringan hati	ug/mgprot	Spektrofotometri	Numerik
Ekspresi Nrf2	Distribusi ekspresi Nrf2 dengan interpretasi pewarnaan positif pada inti sel yang berwarna coklat pada zona I,II, dan III	<i>Optical Density</i>	Imunohistokimia, ImageJ (IHC Profiler)	Numerik

Kriteria Inklusi dan Eksklusi Sampel

1. Kriteria inklusi:

- blok parafin dalam keadaan baik, tidak berjamur, dan tidak rusak
- jaringan hati untuk tissue homogenat dalam keadaan baik, tidak berbau busuk dan tidak rusak

2. Kriteria eksklusi:

- Jaringan terlipat
- Hasil pewarnaan tidak dapat memberikan gambaran yang jelas, misalnya batas inti dan sitoplasma tidak jelas, pulasan terlalu tebal, dan lain sebagainya.

3.4. Karakteristik Sel Punca Mesenkim Asal Tali Pusat Manusia

Sel punca mesenkim asal tali pusat (SPM-TP) yang digunakan adalah SPM-TP yang diproduksi oleh *Stem Cells and Tissue Engineering Cluster (SCTE)*, *Indonesian Medical Education and Research Institute (IMERI)*, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Adapun SPM-TP tersebut memiliki karakteristik yang sesuai dengan ketentuan dari *International Society Cell & Gene Therapy (ISCT)* yaitu sel melekat pada cawan kultur, mengekspresikan CD73 ($\geq 95\%$), CD90 ($\geq 95\%$), CD105 ($\geq 95\%$), mengekspresikan *negative marker* ($< 2\%$), dan dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas, adiposit, dan kondroblas.

3.5. Prosedur Pembuatan Homogenat Jaringan

Pembuatan homogenat jaringan hati dimulai dengan menimbang masing-masing sampel sebanyak 100 mg dan dimasukkan ke *centrifuge tube*. Jaringan kemudian dihancurkan dengan cara dicacah dan ditambahkan PBS sebanyak @ 1000 mikroliter pada setiap sampel. Dengan menggunakan homogenizer, jaringan dihancurkan selama 10-30 detik. Pada tahap ini, *tube* harus diletakkan di dalam gelas berisi es batu. Jaringan dihomogenizer hingga tampak homogen lalu dilakukan sentrifugasi pada suhu 4 °C, 5000 rpm, selama 5 menit. Setelah itu, supernatan diambil dan homogenat jaringan siap disimpan pada suhu -80 °C.

3.6. Prosedur Pemeriksaan Malondialdehyde (MDA)

Pemeriksaan MDA dilakukan dengan spektrofotometri (TBA). Adapun prosedur pemeriksaannya diawali dengan persiapan bahan berupa pembuatan larutan *Trichloroacetic acid (TCA)* 20% dengan cara melarutkan 20 gr TCA ke dalam 100 ml aquades. Selanjutnya perlu pula disiapkan larutan *Thiobarbituric acid (TBA)* 0,67% dengan cara melarutkan 0,67 gram ke dalam 100 ml aquades dan dipanaskan. Pemeriksaan kemudian dilakukan dengan terlebih dahulu memeriksa kadar MDA pada larutan standar dalam berbagai konsentrasi dengan menggunakan larutan tetraepoksipropan (TEP) 1: 80000 (50 nmol/ml) sebagai prekursor. TEP akan dihidrolisis oleh air menjadi MDA.

Selanjutnya pemeriksaan dilanjutkan pada sampel dengan menggunakan 50 ul sampel yang dicampur dengan 350 ul aquades. Jumlah sampel yang

digunakan ini ditentukan dari hasil optimasi yang dilakukan sebelumnya yang menunjukkan bahwa pada pengenceran sampel sebanyak 8 kali masih dapat memberikan hasil yang dapat dibaca oleh spektrofotometer. Pada sampel ditambahkan TCA 20% sebanyak 200 μ l lalu di vortex dan disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan kemudian diambil untuk ditambahkan 400 μ l TBA 0,67% dan kemudian diinkubasikan di *waterbath* pada suhu 96 -100°C selama 10 menit. Sampel kemudian dibiarkan benar-benar dingin dalam suhu ruang dan dengan spektrofotometer, absorbansi selanjutnya dibaca pada panjang gelombang 530 nm. Adapun terhadap larutan standard dilakukan tahapan yang sama dengan tahapan pada sampel. Hasil absorbansi dikonversikan menjadi konsentrasi dalam nmol/ml dengan menggunakan rumus $y=ax+b$ yang terdapat pada kurva standar.

3.7. Prosedur Pemeriksaan Glutathione (GSH)

Glutathione diperiksa dengan menggunakan metode Elman dan diukur kadarnya dengan menggunakan spektrofotometer *Genesys 10 uv*. Pemeriksaan ini didasarkan pada reaksi antara *Ditio bisnitro benzoate* (DTNB) dan GSH yang akan menghasilkan senyawa dianion tionitro benzoate yang berwarna kuning. Adapun sebelum memulai pemeriksaan, terdapat beberapa bahan yang perlu dipersiapkan. Diantaranya adalah reagen DTNB yang dibuat dengan melarutkan 39,6 mg dalam 10 ml dapar phosphate 0,01 M pH 7,0, membuat larutan TCA 5% (5 gram TCA dalam 100 ml aquades), serta membuat larutan standard Glutathione 2 mg /ml dalam dapar phosphate pH 8,0. Serupa dengan pemeriksaan MDA, pada pemeriksaan GSH juga dilakukan pemeriksaan kadar GSh pada larutan standard dengan berbagai konsentrasi yaitu konsentrasi 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 2.5, dan 5 μ g/ml dalam dapar phosphate pH 8,0. Setelah itu diberikan reagen DTNB sebanyak 12,5 μ l ke dalam setiap tube lalu diinkubasi dalam ruangan gelap selama 1 jam. Selanjutnya, serapan dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 412 nm. Hasil pembacaan spektrofotometer akan menghasilkan gambaran kurva standar dengan rumus $y =ax+b$ yang nantinya akan digunakan dalam penghitungan konsentrasi GSH.

Setelah larutan standar dibuat, pengujian dilakukan pada sampel dengan menggunakan 50 ul sampel dimasukkan ke dalam microtube 2 ml yang berisikan 1750 ul dapar phosphate pH 8,0. Setelah itu dilakukan penambahan TCA 5%, vortex serta sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Setelah itu, supernatan diambil sebanyak 1000 ul, ditempatkan di tabung lainnya dan diberikan 12,5 ul reagen DTNB untuk selanjutnya diinkubasi selama 1 jam di ruangan gelap sebelum akhirnya diperiksa dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 412 nm.

3.8. Pemeriksaan Ekspresi Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)

3.8.1. Prosedur Imunohistokimia

Diawali dengan pembuatan slide yang belum diwarnai (*unstained slide*) dengan cara memotong blok FFPE masing-masing setebal 3 mikrometer, lalu dikeringkan di suhu 37 °C dan panaskan di atas slide warmer pada suhu 60 °C selama 30 menit. Selanjutnya, *unstained slide* tersebut dipersiapkan lebih lanjut untuk pewarnaan dengan teknik imunohistokimia. Pada tahap awal teknik pulasan imunohistokimia dilakukan deparafinisasi slide sampel menggunakan *xylol* dengan cara merendam preparat sebanyak tiga kali, masing- masing selama 5 menit kemudian dilakukan rehidrasi jaringan dengan alkohol bertingkat menurun dari konsentrasi 100% (absolut), 96%, 80%, 70% masing- masing selama 5 menit.

Setelah itu, proses dilanjutkan dengan mencuci slide dengan air mengalir selama 5 menit untuk selanjutnya dilakukan proses antigen retrieval. Adapun proses antigen retrieval yang digunakan adalah dengan metode *Heat Induce Epitope Retrieval* (HIER) yang mana hal ini dilakukan untuk membuka *cross-linking* DNA akibat penggunaan formaldehyde sebelumnya sehingga nantinya diharapkan antigen yang akan kita periksa dapat terekspose dan dapat dengan mudah diikat oleh antibodi primer. Pada tahap ini, digunakan *Citrate Buffer* PH 6,0 yang nantinya bersama dengan slide yang direndam di dalamnya akan dimasukkan ke dalam *decloaking chamber* (Biogear®) dan dipanaskan pada suhu 95°C selama 15 menit.

Sementara itu, preparasi reagen IHK yang akan digunakan pada mesin *intellipath* mulai dilakukan. Reagen yang disiapkan antara lain *blocking agent* (Hidrogen

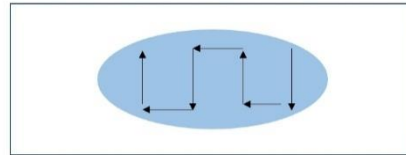
peroksida, skim milk 5% dalam PBS, normal horse serum, dan Excel block), buffer pencucian (Phosphate-buffered saline / PBS) dan antibodi primer (anti-Nrf2 antibodi 1:500, Genetex GTX103322). Semua prosedur pada preparasi reagen mengikuti protokol yang tersedia di kit manufaktur yang digunakan. Setelah antibodi primer ditetaskan, slide dikeluarkan dari *Intellipath* dan disimpan pada suhu 4 °C selama 17 jam. Selanjutnya dilakukan protokol lanjutan sesuai kit manufaktur yang meliputi pemberian antibodi sekunder (*Excel Link*), *Excel-HRP*, dan penggunaan *Diaminobenzidine* (DAB)-substrat buffer selama 2 menit, serta dilanjutkan dengan pewarnaan *Hematoxylin Mayer* selama 3 menit, pencelupan dalam *Lithium carbonate* selama 2 menit, dehidrasi kembali dengan alkohol konsentrasi meningkat (70%, 80%, 96%, absolut, absolut), *clearing* dengan *xylol*, serta pemberian mounting (entelan). Setelah seluruh prosedur selesai dilakukan, kode slide ditutup untuk tujuan *blinding* lalu diamati di bawah mikroskop Olympus CX333 dan difoto dengan menggunakan perangkat lunak OptiLab. Analisa dimulai dengan membandingkan hasil pewarnaan dengan hasil kontrol positif dan negatif untuk menghindari positif atau negatif palsu untuk selanjutnya diamati pada pembesaran 400x untuk melihat ekspresi Nrf2 pada setiap zona hati yaitu,:

- Zona 1 : zona periportal
- Zona 2 : zona intermediate
- Zona 3 : zona perisentral



Gambar 3.1. Pengambilan foto pada setiap zona hati

Selanjutnya, diambil foto sebanyak lima foto pada setiap zona yang menyajikan ekspresi terbanyak hingga akhirnya didapatkan 20 gambar untuk setiap sampel yang diperiksa.



3.8.2. Kriteria Penilaian Ekspresi Nrf2

Penilaian ekspresi Nrf2 dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *ImageJ (IHC Profiler)*¹¹⁶ sehingga didapatkan hasil kuantifikasi dalam *Optical Density*. Pada penelitian ini, ekspresi Nrf2 dinilai pada ekspresinya di nukleus yang berkaitan dengan perannya sebagai faktor transkripsi. Adapun kuantifikasi Nrf2 ini dinilai dengan mempertimbangkan kuat lemahnya intensitas warna sehingga ekspresinya dibagi menjadi tiga kategori yaitu, *high positive* (positif kuat), *positive* (positif sedang), dan *low positive* (positif lemah).¹¹⁷ Adapun rumus yang digunakan untuk menilai *Optical density score (ODS)* adalah:

$$\frac{((\text{Jumlah sel } high \text{ positive} \times 4) + (\text{jumlah sel } moderate \text{ positive} \times 3) + (\text{jumlah sel } low \text{ positive} \times 2) + (\text{jumlah sel } negative \times 1))}{100}$$

sedangkan rumus untuk menilai H Score adalah sebagai berikut:

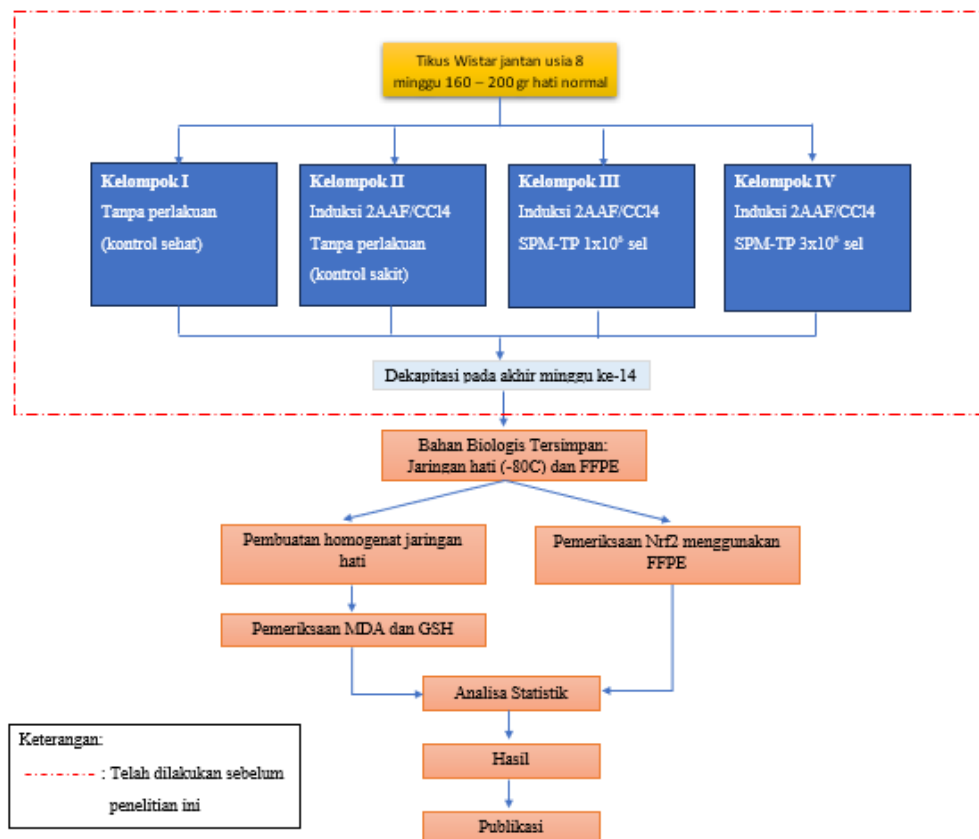
$$(\text{Jumlah sel } high \text{ positive} \times 3) + (\text{jumlah sel } moderate \text{ positive} \times 2) + (\text{jumlah sel } low \text{ positive} \times 1) + (\text{jumlah sel } negative \times 0)$$

3.9. Pengolahan data

Data yang didapat dari penelitian ini adalah data numerik yang menunjukkan konsentrasi MDA, konsentrasi GSH dan hasil kuantifikasi ekspresi Nrf2 hati. Data yang ada dianalisa statistik dengan menggunakan SPSS 27. Data yang terdistribusi normal dilakukan pengolahan data dengan uji *one way ANOVA* dan uji *post-hoc* menggunakan metode Tukey. Data akan disajikan dalam

grafik yang menunjukkan nilai Mean $\pm$ SD. Sementara itu, data yang tidak terdistribusi normal dilakukan uji non parametrik Kruskal Wallis dan dilanjutkan uji Mann Whitney. Data akan disajikan dalam grafik yang menunjukkan nilai Median (min-max). Seluruh data dianalisis dengan nilai signifikansi pada $p < 0,05$.

3.10. Alur Penelitian



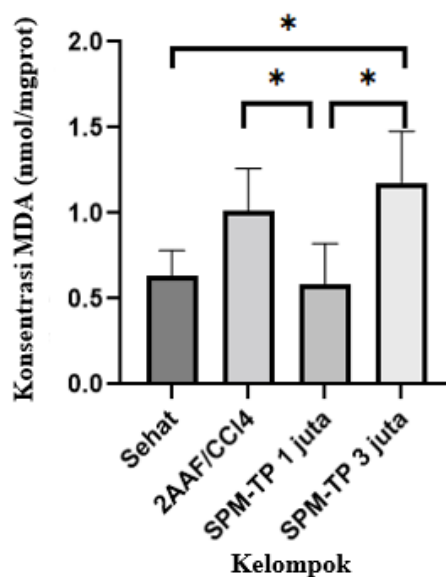
BAB IV

HASIL

Penelitian ini merupakan penelitian yang menilai efek pemberian SPM-TP terhadap status redoks hati tikus yang mengalami cedera kronis. Oleh karena itu, penilaian dilakukan terhadap penanda stres oksidatif yaitu, MDA serta mekanisme antioksidan yang menekan stres oksidatif yaitu, GSH dan Nrf2. Berikut adalah hasil pemeriksaan ketiga parameter tersebut:

4.1. Hasil Pemeriksaan Malondialdehyde (MDA)

Seluruh sampel bahan biologis tersimpan berupa jaringan hati segar yang dibuat menjadi homogenat jaringan diperiksa kadar MDA nya. Setelah itu, hasilnya dikelompokkan ke dalam setiap kelompok perlakuan dan didapatkan gambaran hasil sebagai berikut:

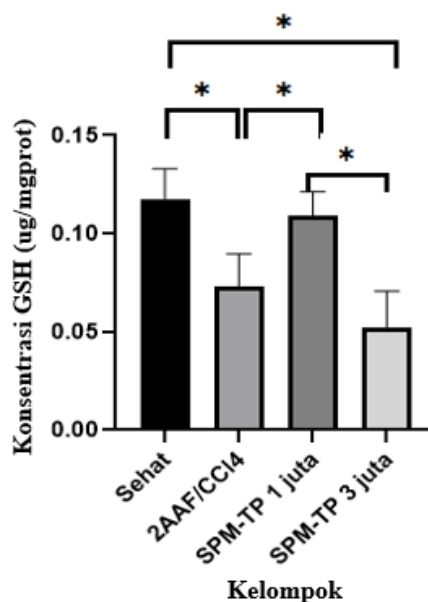


Gambar 4.1. Perbandingan kadar MDA (nmol/mgprot) pada setiap kelompok perlakuan. Nilai $p < 0.05^*$

Grafik di atas menunjukkan bahwa kadar MDA ditemukan meningkat pada kelompok 2AAF/CCl₄ ($1,0164 \pm 0,24255$) bila dibandingkan dengan kelompok sehat ($0,6387 \pm 0,14423$). Sementara itu kelompok yang diberikan SPM-TP 1 juta menunjukkan adanya penurunan kadar MDA ($0,5837 \pm 0,24190$) bila dibandingkan dengan kelompok 2AAF/CCl₄. Bahkan secara statistik, kadar MDA kelompok SPM-TP 1 juta tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok sehat ($p = 0,978$). Akan tetapi, pada kelompok SPM-TP 3 juta, justru terjadi peningkatan kadar MDA ($1,1784 \pm 0,29996$) yang bahkan melebihi kelompok 2AAF/CCl₄. Secara statistik, kadar MDA kelompok yang diberikan SPM-TP 3 juta tidak berbeda signifikan dengan kelompok 2AAF/CCl₄ ($p = 0,649$), namun berbeda signifikan dengan kelompok sehat ($p = 0,004$) dan kelompok SPM-TP 1 juta ($p = 0,002$).

4.2. Glutathione (GSH)

Serupa dengan MDA, GSH diperiksa dengan menggunakan homogenat jaringan hati serta menggunakan spektrofotometer. Hasil pemeriksaan GSH tersebut menunjukkan gambaran sebagai berikut:

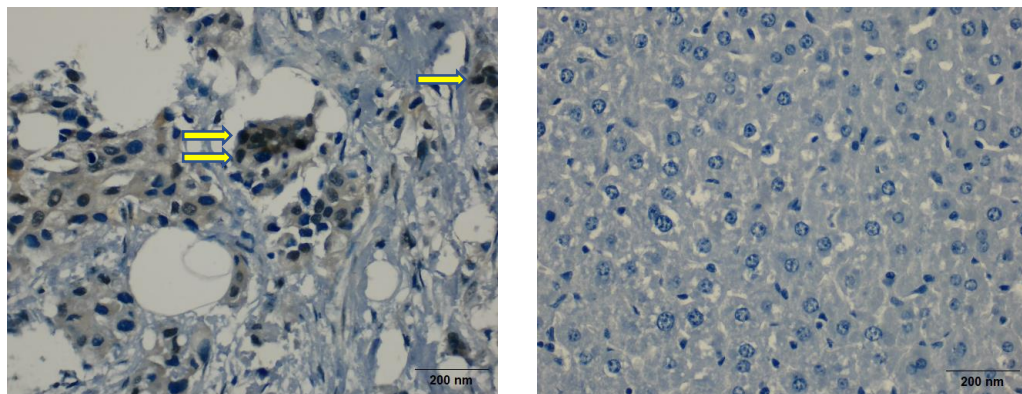


Gambar 4.2. Perbandingan kadar GSH (ug/mgprot) pada berbagai kelompok perlakuan. Nilai $p < 0,05^*$

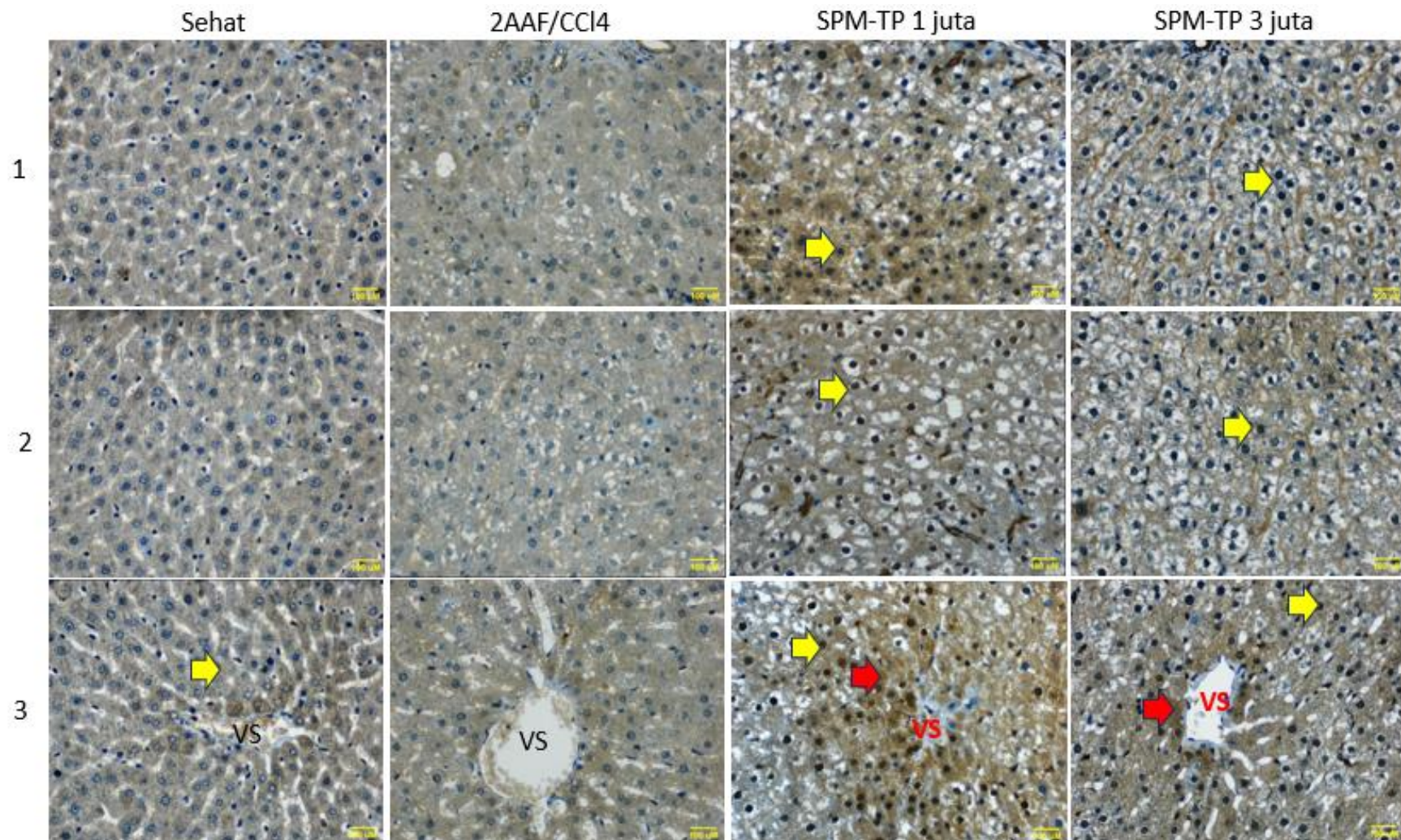
Pada grafik di atas tampak kadar GSH tertinggi pada kelompok sehat ($0,117730 \pm 0,0153191$). Sementara itu, pada kelompok 2AAF/ CCl_4 , kadar GSH justru ditemukan menurun ($0,072918 \pm 0,0167639$). Secara statistik penurunan ini menimbulkan perbedaan yang signifikan dengan $p < 0,001$. Sementara itu, pada kelompok SPM-TP 1 juta didapati kadar GSH ($0,108964 \pm 0,123125$) yang meningkat secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok 2AAF/ CCl_4 dengan $p = 0,004$. Akan tetapi, kadar GSH justru ditemukan paling rendah pada kelompok yang diberikan SPM-TP 3 juta ($0,052206 \pm 0,0186616$). Di antara kelompok SPM-TP 3 juta dan 2AAF/ CCl_4 tidak ditemukan perbedaan yang signifikan ($p = 0,144$). Begitu pula halnya tidak ditemukan perbedaan yang signifikan antara kelompok sehat dan SPM-TP 1 juta ($p = 0,777$).

4.3. Hasil Ekspresi Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)

Ekspresi Nrf2 yang diamati melalui metode imunohistokimia dilakukan dengan menggunakan kontrol positif berupa jaringan karsinoma mammae manusia sesuai *data sheet*. Selain itu, juga digunakan jaringan hati mencit yang tidak diberikan antibodi sebagai kontrol negatif. Keduanya digunakan sebagai kontrol agar tidak terjadi negatif maupun positif palsu (lihat Gambar 4.3). Selanjutnya diambil foto pada pembesaran 400x pada setiap sediaan (lihat Gambar 4.4).

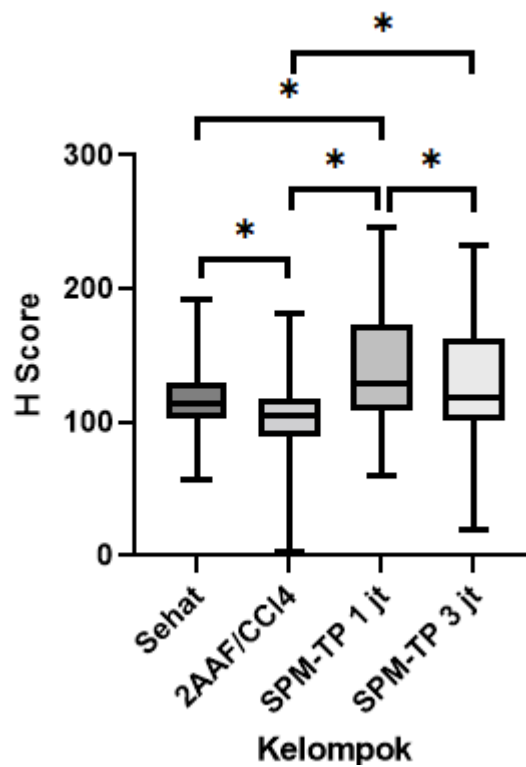


Gambar 4.3. Kontrol positif berupa jaringan karsinoma mammae manusia (kiri). Tampak nukleus yang terpulas warna coklat (panah) menandakan ekspresi Nrf2.



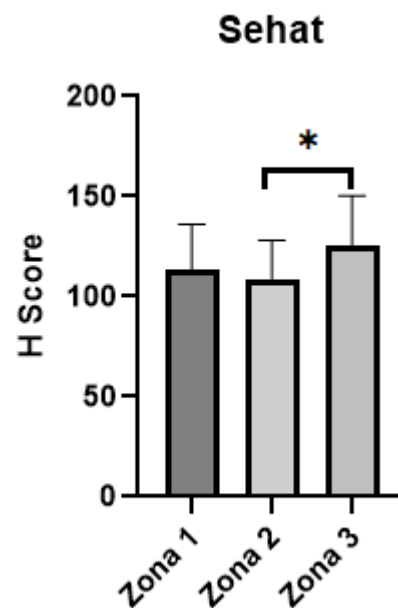
Gambar 4.4. Ekspresi Nrf2 pada setiap kelompok perlakuan pada setiap zona hati. Ekspresi Nrf2 tampak sebagai nukleus yang berwarna coklat (panah kuning) dan sitoplasma yang berwarna coklat (panah merah). VP : Vena Porta, VS : Vena Sentralis

Hasil foto kemudian dikuantifikasi dengan menggunakan perangkat lunak ImageJ (IHC Profiler)¹¹⁶ dengan mode *Nucleus Staining Image* untuk mendeteksi ekspresi Nrf2 pada nukleus. Data yang didapat kemudian diolah dengan menggunakan SPSS 27 dan disajikan dalam bentuk grafik berikut:



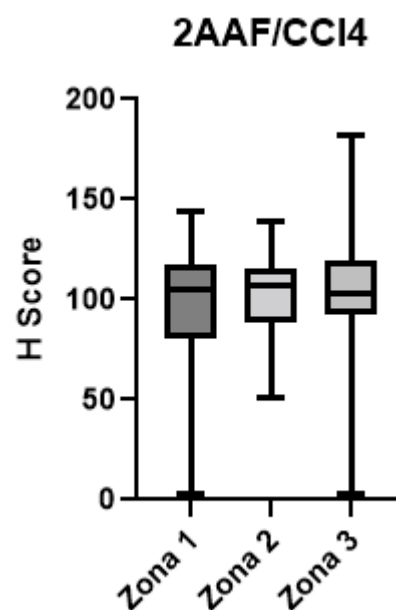
Gambar 4.5. Perbandingan ekspresi Nrf2 pada setiap kelompok perlakuan Nilai $p < 0,05^*$

Dari grafik di atas tampak bahwa ekspresi Nrf2 ditemukan rendah pada kelompok sehat 114,64 (56,66 – 192,04) namun lebih rendah lagi pada kelompok 2AAF/CCl4 104,53 (2,84 – 181,99). Sementara itu, ekspresi Nrf2 kelompok SPM-TP 1 juta 129,18 (60,59 – 245,94) lebih tinggi dibandingkan dengan SPM-TP 3 juta 118,22 (19,01 – 231,91). Perbedaan seluruh kelompok ini menghasilkan nilai $p < 0,001$.



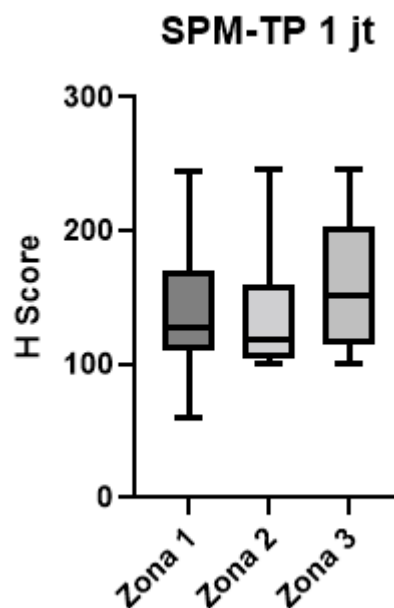
Gambar 4.6. Perbandingan ekspresi Nrf2 pada setiap zona pada kelompok kontrol sehat. Nilai $p < 0,05$

Pada penelitian ini, analisa juga dilakukan untuk menilai ekspresi Nrf2 pada berbagai zona pada setiap kelompok perlakuan. Pada kelompok sehat, ekspresi Nrf2 antar zona secara keseluruhan menunjukkan adanya perbedaan dengan signifikansi $p = 0,012$ yang tampak pada ekspresi Nrf2 antara zona 2 ($108,98 \pm 19,08$) dan zona 3 ($125,80 \pm 24,64$). Sementara itu, antara zona 1 ($113,33 \pm 22,71$) dan 2 maupun antara zona 1 dan 3 tidak terdapat perbedaan yang signifikan (Gambar 4.6).



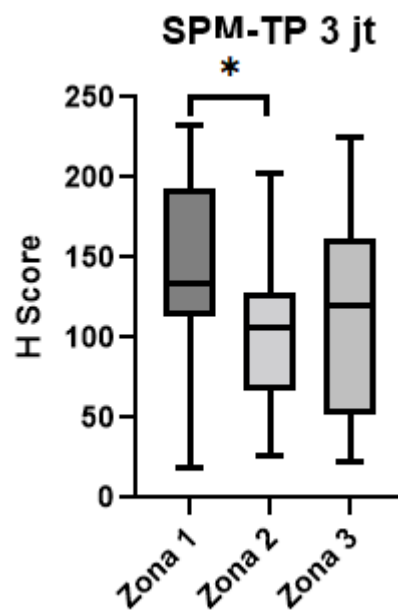
Gambar 4.7. Perbandingan ekspresi Nrf2 pada setiap zona pada kelompok 2AAF/CCI4

Pada kelompok 2AAF/CCl4 secara umum tidak tampak adanya perbedaan yang signifikan antar zona ($p = 0,799$). Pada kelompok ini zona 3 tampak paling sedikit mengekspresikan Nrf2 103,09 (2,88 -181,99), diikuti zona 1 sebesar 104,53 (2,84 – 143,75). Sementara itu, zona 2 mengekspresikan paling banyak Nrf2 107,06 (50,74 – 138,95) (Gambar 4.7).



Gambar 4.8. Perbandingan ekspresi Nrf2 pada setiap zona pada kelompok SPM-TP 1 juta ($p=0,145$)

Pada kelompok SPM-TP 1 juta tampak zona terbanyak yang mengekspresikan Nrf2 adalah zona 3 151,85 (100,93 – 245,47). Zona kedua terbanyak adalah zona 1 127,88 (60,59 – 244,01), sedangkan zona 2 118,06 (100,84 – 254,94) mengekspresikan Nrf2 paling sedikit. Meskipun demikian, secara keseluruhan kelompok SPM-TP 1 juta ini juga tidak mencerminkan adanya perbedaan yang signifikan ekspresi Nrf2 antar zona ($p = 0,086$).



Gambar 4.9. Perbandingan ekspresi Nrf2 pada setiap zona pada kelompok SPM-TP 3 juta. Nilai $p < 0,05^*$

Pada kelompok SPM-TP 3 juta tampak zona terbanyak mengekspresikan Nrf2 adalah zona 1 133,90 (19,01 – 231,91) lalu zona 3 119,60 (22,81 – 225,47), dan zona 2 105,99 (25,78 – 202,39). Secara umum, dari ketiga zona tersebut, ditemukan perbedaan signifikan dengan $p = 0,034$ yang tampak pada perbandingan ekspresi Nrf2 antara zona 1 dan 2 ($p = 0,007$). Sementara di antara zona 1 dan 3 maupun zona 2 dan 3 tidak tampak adanya perbedaan yang bermakna ($p = 0,214$ dan $p = 0,280$).

BAB V

PEMBAHASAN

Stres oksidatif telah diketahui sebagai pemicu munculnya berbagai kerusakan dalam tubuh. Berbagai penelitian dilakukan untuk melihat kaitan antara stres oksidatif dengan morfologi dan fisiologi organ. Banyak dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa hambatan pada jalur stres oksidatif dapat membawa hasil terapi yang lebih baik terhadap cedera yang terjadi pada berbagai organ. Sementara itu, penyakit hati kronis yang kian bertambah jumlah penderitanya telah terbukti meningkatkan angka morbiditas dan mortalitas.¹ Terdapat suatu kebutuhan yang mendesak untuk menemukan terapi yang potensial dalam menangani cedera hati terutama yang telah berkembang menjadi fibrosis bahkan sirosis. Dalam hal ini, terapi sel punca yang akhir-akhir ini sangat berkembang dan menunjukkan potensinya sebagai suatu terapi yang menjanjikan bagi banyak penyakit, dipilih sebagai perlakuan yang akan dinilai potensinya dalam perbaikan cedera hati kronis. Pemberian sel punca mesenkim allogenik yang berasal dari tali pusat mungkin mampu mendukung proses regenerasi hati ketika hepatosit sebagai pemain utama regenerasi tidak dapat menjalankan perannya.

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian payung dr. Isabella Kurnia Liem, M.Biomed, PhD, PA yang bertujuan untuk memahami peranan SPM-TP pada cedera hati kronis. Berbagai penelitian dalam payung penelitian yang sama telah dilakukan, di antaranya adalah penilaian peranan SPM-TP terhadap ekspresi TGF- β dan IL-10 yang menunjukkan hasil yang signifikan dalam menurunkan ekspresi keduanya. Selain itu, penilaian peranan SPM-TP terhadap perbaikan anatomi makroskopik hati, penurunan derajat fibrosis, dan penurunan kematian sel juga telah dilakukan dan memberikan hasil yang positif. Namun, pada beberapa parameter ditemukan adanya perbedaan yang tidak signifikan misalnya, peranan SPM-TP terhadap ekspresi DLK1, Ki67, dan VEGF.^{13,14,15} Meski tidak signifikan, ekspresi parameter-parameter ini ditemukan meningkat pada pemberian SPM-TP. Oleh karena itu, secara keseluruhan, SPM-TP masih mungkin berpeluang menjadi terapi alternatif bagi penderita cedera hati kronis.

Dalam hal ini penelitian pada jalur stress oksidatif akan semakin meningkatkan pemahaman mengenai peranan SPM-TP pada cedera hati kronis.

Penelitian ini merupakan suatu penelitian eksperimental dengan menggunakan tikus Wistar jantan sebagai hewan coba. Pemilihan tikus Wistar didasarkan pada ketahanan hidupnya yang lebih tinggi, serta kemampuannya yang baik dalam merepresentasikan cedera hati. Induksi bahan toksin CCl₄ yang diimbangi dengan 2AAF tidak hanya merusak hati namun juga memastikan terjadinya efek antimitosis sehingga kombinasi kedua bahan ini telah terbukti menghasilkan model hewan coba cedera hati kronis.⁹⁹

Keberadaan kedua senyawa tersebut di dalam tubuh akan menyebabkan stres oksidatif. Sebagai suatu peristiwa yang telah diketahui menimbulkan dampak luas yang merugikan, stres oksidatif dapat dinilai melalui penilaian kadar Malondialdehyde (MDA). Dalam hal ini, MDA merupakan suatu aldehide yang dihasilkan sebagai produk samping pada peroksidasi lipid akibat stres oksidatif. Hal ini menunjukkan kadar MDA akan berbanding lurus dengan derajat stres oksidatif.

Di sisi lain, pembahasan stres oksidatif tentu tidak akan lengkap tanpa pembahasan mengenai antioksidan sebagai penghambat stres oksidatif itu sendiri. Dalam hal ini, Nrf2 merupakan suatu regulator antioksidan yang akhir-akhir ini banyak diteliti. Berbagai penelitian telah membuktikan peran positif Nrf2 pada berbagai organ tubuh yang cedera termasuk hati. Nrf2 juga berperan dalam diproduksinya GSH, suatu antioksidan yang sangat terkonsentrasi di hati. GSH merupakan suatu tripeptida yang terdiri dari glisin, glutamin, dan sistein. Dalam pembentukannya, GSH membutuhkan enzim seperti glutamate sistein ligase, yang mengkatalisis pembentukan dipeptida gamma-glutamilsistein pada awal pembentukan GSH serta enzim Glutathione sintetase yang selanjutnya mengkatalisis pembentukan glutathione dari gamma-glutamylsistein dan glisin.¹¹⁸ Pada peristiwa ini, Nrf2 berperan sebagai faktor transkripsi yang meregulasi produksi enzim-enzim tersebut. Selain itu, Nrf2 juga berperan dalam upregulasi enzim Glutathione Reductase yang mengkatalisasi perubahan GSSG (bentuk glutathione teroksidasi) menjadi GSH (bentuk glutathione tereduksi) kembali.

Keberhasilan sistem antioksidan dalam menurunkan stres oksidatif diharapkan mampu menjadi suatu pemicu diawalinya proses regenerasi hati.

Dari penelitian ini, dapat diketahui bahwa pemberian 2AAF/CCl₄ telah berhasil meningkatkan kadar MDA yang artinya menjadikan tikus dalam keadaan stres oksidatif. Namun, kadar MDA kemudian ditemukan menurun pada kelompok yang diberikan SPM-TP 1 juta. Hal ini sejalan dengan penelitian Li dkk (2016) yang menilai efek SPM-TP pada pankreatitis traumatik pada tikus juga menemukan hal serupa dimana kadar MDA cenderung ditemukan lebih rendah pada kelompok sakit yang diberikan SPM-TP.¹¹⁹ Akan tetapi, berbeda halnya dengan kelompok SPM-TP 1 juta, kelompok SPM-TP 3 juta justru menunjukkan hasil yang kontradiktif. Pada kelompok ini, MDA tidak ditemukan menurun namun justru meningkat lebih tinggi dari sakit.

Sejalan dengan hal tersebut, hasil pemeriksaan GSH juga menunjukkan penurunan pada kelompok SPM-TP 3 juta yang tidak terjadi pada kelompok SPM-TP 1 juta. Pada kelompok SPM-TP 1 juta, kadar GSH justru ditemukan meningkat. Secara fisiologis, GSH akan tetap dihasilkan di hati mengingat fungsi hati yang lebih sering terpapar senyawa toksin. Namun, pada hati yang sehat, hanya sedikit GSH yang dibutuhkan. Hal ini dapat menjelaskan mengapa GSH ditemukan tinggi pada kelompok sehat. Selain itu, pada keadaan sehat, sedikitnya ROS yang diproduksi hanya akan menyebabkan sedikit Nrf2 yang bebas yang memicu produksi GSH. Dalam hal ini, tingginya kadar GSH pada kelompok sehat dapat merupakan suatu akumulasi GSH sendiri.⁷⁵

Sebaliknya, kelompok yang diinduksi 2AAF/CCl₄ mempresentasikan peningkatan pada MDA, namun penurunan pada GSH dan Nrf2. Pada kelompok ini, induksi cedera hati kronis dengan bahan toksik 2AAF/CCl₄ menyebabkan stres oksidatif sehingga dihasilkan lebih banyak MDA dan tubuh lebih banyak menggunakan GSH sebagai upayanya dalam mempertahankan homeostasis. Akan tetapi, secara bersamaan, hal ini juga menyebabkan teraktivasinya jalur pensinyalan TGF- β yang merupakan jalur utama fibrosis hati. Aktivasi TGF- β akan menyebabkan disregulasi dari sistem antioksidan termasuk GSH.⁷⁵ Selain itu, stres oksidatif yang terjadi terus menerus dapat menyebabkan modifikasi epigenetik seperti metilasi DNA maupun modifikasi histon yang dapat

mempengaruhi ekspresi dan aktivasi dari Nrf2. MDA yang dihasilkan akan menimbulkan kerusakan DNA yang selanjutnya memicu sekresi protein p53. Dalam hal ini, protein p53 memiliki 3 fungsi utama yaitu, menghentikan siklus sel untuk menghambat replikasi DNA yang rusak, memperbaiki DNA, serta berperan dalam apoptosis sel. Untuk menjamin terjadinya apoptosis seluler, maka p53 akan menekan aktivasi Nrf2 melalui ikatan p53 pada ARE sehingga akan mengganggu transkripsi berbagai protein yang bergantung pada Nrf2.^{120,121,122} Dalam hal ini, p53 diketahui memodulasi Nrf2 melalui mediasi respon dua fase yang mana pada fase awal, p53 justru meningkatkan aktivasi Nrf2 tetapi pada ekspresi berlebih p53 justru akan menekan aktivasi Nrf2. Akan tetapi, penekanan Nrf2 ternyata tidak hanya karena kehadiran protein p53 saja. Penelitian oleh Méndez-García dkk (2019) juga menunjukkan terjadinya inaktivasi Nrf2 pada apoptosis yang tidak bergantung pada kehadiran p53.¹²²

Sementara itu, SPM-TP sendiri merupakan sel yang telah terbukti mengeluarkan bahan bioaktif baik yang bersifat autokrin maupun parakrin.¹²³ Di antaranya adalah berbagai sitokin, kemokin, protease matriks ekstraseluler, serta faktor-faktor pertumbuhan. Terdapat penelitian yang membuktikan bahwa pada pemberian SPM-TP ditemukan peningkatan antioksidan seperti SOD, GSH, GPx, maupun CAT.¹⁰⁷ Bahkan beberapa publikasi juga menyatakan bahwa SPM sebagaimana sel lainnya juga memiliki Nrf2 nya sendiri yang akan terekspresi ketika ada ROS.¹⁰ Sejalan dengan itu, beberapa penelitian lainnya membuktikan bahwa *exosome* SPM mampu meningkatkan efek antioksidan dan menurunkan stres oksidatif secara langsung sebagai *ROS scavenger* maupun secara parakrin melalui sekresi stanniocalcin-1 yang dapat menurunkan ROS mitokondria dan melemahkan inflamasi. Selain itu, efek parakrin SPM juga dapat ditemui dari sekresi protein DJ-1 (*Parkinson Disease Protein 7 / PARK7*) yang berperan dalam menjaga biogenesis mitokondria serta efisiensi rantai pernafasan sehingga turut serta dalam mengurangi produksi ROS. Bahkan baru-baru ini ditemukan bahwa kemungkinan SPM juga mampu menjadi donor mitokondria yang rusak yang bergantung pada ada tidaknya stimulasi dari LPS.^{10,107}

Berbeda dengan kelompok sehat dan 2AAF/CCl4, kelompok yang diberikan SPM-TP 1 juta dan 3 juta mengalami peningkatan ekspresi Nrf2. Hal ini

serupa dengan hasil penelitian yang dilakukan Nie dkk (2018) yang membuktikan terjadinya peningkatan Nrf2 pada kelompok tikus dengan *diabetic nephropathy* yang diberikan SPM-TP.¹²⁴ Akan tetapi, pada penelitian ini peningkatan Nrf2 secara signifikan ditemukan lebih tinggi pada kelompok yang diberikan SPM-TP 1 juta dibandingkan kelompok 3 juta. Kelompok SPM-TP 3 juta justru menunjukkan adanya penurunan GSH serta peningkatan MDA. Apabila hasil dari ketiga parameter digabungkan, maka pada kelompok yang diberikan SPM-TP 3 juta menunjukkan adanya peningkatan Nrf2 yang lebih rendah dari kelompok SPM-TP 1 juta, penurunan GSH, dan peningkatan MDA. Hal ini semakin memperjelas hubungan antara ketiganya sehingga tingginya MDA yang terjadi pada kelompok SPM-TP 3 juta diduga karena penurunan GSH yang disebabkan kurangnya Nrf2 yang aktif akibat penekanannya baik melalui jalur yang bergantung pada protein p53 maupun yang tidak.^{120,121,122} Akan tetapi tidak hanya itu, dalam publikasinya, Shyh-Chang dkk (2017) menunjukkan bahwa metabolisme di dalam sel punca juga akan menghasilkan ROS.¹²⁵ Di sisi lain, Eggenhofer E dkk (2012) membuktikan bahwa SPM memiliki waktu hidup yang pendek dan pemberian SPM secara intravena tidak memungkinkan SPM tersebut bermigrasi keluar dari paru-paru. Ia menyatakan bahwa tidak ditemukan SPM yang viable pada organ selain paru-paru pada setiap waktu pemeriksaan, sehingga dapat dipastikan bahwa yang sampai ke hati adalah debris sel.¹²⁶ Dari kedua fenomena ini, dapat pula diduga bahwa selain karena ekspresi Nrf2 kelompok SPM-TP 3 juta yang lebih rendah dari kelompok SPM-TP 1 juta sehingga GSH yang diproduksi juga sedikit, peningkatan MDA dapat pula terjadi akibat semakin banyaknya sel yang menghasilkan ROS baik yang berasal dari metabolismenya sendiri, maupun dari debris sel yang merupakan hasil dari kematian SPM itu sendiri.

Sejalan dengan hal tersebut, bila dibandingkan dengan data pemeriksaan *Aspartate Transferase* (AST) dan *Alanine Transferase* (ALT) yang dilakukan pada sampel penelitian ini (Liem IK, *unpublished*), didapatkan adanya peningkatan dimana rata-rata AST kelompok sehat adalah sebesar 26,85, kelompok 2AAF/CCl4 72,58, kelompok SPM-TP 1 juta adalah sebesar 27,84, sedangkan kelompok SPM-TP 3 juta rata-rata kadar AST adalah 49,23. Sementara

itu, rata-rata kadar ALT kelompok sehat 33,17, kelompok 2AAF/CCl₄ 47,33, sedangkan kelompok SPM-TP 1 juta 29,8 dan kelompok SPM-TP 3 juta 29,92 (Liem IK, *unpublished*). Selain AST dan ALT, pada sampel juga dilakukan pemeriksaan *Gamma-Glutamyl Transferase* (GGT) yang menunjukkan adanya peningkatan kadarnya pada kelompok SPM-TP 3 juta $8,91 \pm 2,53$ dibandingkan kelompok SPM-TP 1 juta $7,23 \pm 1,11$ (Liem IK, *unpublished*). Berdasarkan kadar AST, ALT, dan GGT di atas, dapat dikatakan bahwa kelompok yang diberi SPM-TP 3 juta mengalami gangguan fungsi hati berupa peningkatan AST hingga hampir dua kali lipat kadar AST kelompok sehat, serta GGT yang juga lebih tinggi dari kelompok SPM-TP 1 juta. Sementara itu, hasil pemeriksaan ALT menunjukkan kadar yang hampir sama antara kelompok SPM-TP 1 juta dan 3 juta. Fenomena yang terjadi pada kelompok SPM-TP 3 juta ini menunjukkan bahwa pemberian SPM-TP dosis yang lebih tinggi ternyata tidak memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan pemberian SPM-TP dosis yang lebih rendah.

Dari hasil penelitian ini, dosis SPM-TP 1 juta adalah dosis terbaik yang mampu meningkatkan Nrf2, meningkatkan GSH, dan menurunkan MDA. Pemberian SPM-TP dosis 1 juta terbukti dapat menurunkan stres oksidatif melalui peningkatan aktivasi jalur Nrf2/ARE. Hal ini sejalan dengan beberapa penelitian sebelumnya yang menunjukkan bukti serupa bahwa pada pemberian SPM-TP dosis yang lebih rendah justru memberikan hasil yang lebih baik.^{113,114} Penelitian Chen dkk (2023) yang menilai efek pemberian sel punca mesenkim asal sumsum tulang dosis 1 juta, 2 juta, dan 5 juta terhadap post stroke infark juga menunjukkan bahwa dosis 1 juta adalah dosis terbaik.¹¹³

Dosis tersebut apabila dikonversikan ke dosis manusia dapat dihitung dengan rumus yang dikemukakan oleh Nair AB dkk (2016) yang turut mempertimbangkan adanya karakteristik unik anatomi, fisiologi, dan biokimia di antara spesies sebagai berikut:¹²⁷

$$\text{HED (mg/kg)} = \frac{\text{Animal Dose (mg/kg)}}{\text{Faktor koreksi}}$$

, dimana:

HED : *Human Equivalent Dose*

Faktor koreksi : (lihat kotak merah pada gambar 5.1)

Species	Reference body weight (kg)	Working weight range (kg)	Body surface area (m ²)	To convert dose in mg/kg to dose in mg/m ² , multiply by K _m	To convert animal dose in mg/kg to HED in mg/kg, either
					Divide animal dose by
Human	60	-	1.62	37	-
Mouse	0.02	0.011-0.034	0.007	3	12.3
Hamster	0.08	0.047-0.157	0.016	5	7.4
Rat	0.15	0.08-0.27	0.025	6	6.2
Ferret	0.30	0.16-0.54	0.043	7	5.3
Guinea pig	0.40	0.208-0.700	0.05	8	4.6
Rabbit	1.8	0.90-3.0	0.15	12	3.1
Dog	10	5-17	0.50	20	1.8
Monkeys (rhesus)	3	1.4-4.9	0.25	12	3.1
Marmoset	0.35	0.14-0.72	0.06	6	6.2
Squirrel monkey	0.60	0.29-0.97	0.09	7	5.3
Baboon	12	7-23	0.60	20	1.8
Micro pig	20	10-33	0.74	27	1.4
Mini pig	40	25-64	1.14	35	1.1

*Data obtained from FDA draft guidelines.⁽⁷⁾ FDA: Food and Drug Administration, HED: Human equivalent dose

Gambar 5.1. Tabel konversi dosis hewan ke manusia¹²⁷

Dosis SPM-TP 1 juta apabila dikonversikan menjadi dosis manusia akan menjadi:

$$\frac{1.000.000 \text{ sel} / 0,2 \text{ kg BB tikus}}{6,2} = 806452 \text{ sel} / \text{kgBB manusia}$$

Namun demikian, apabila evaluasi dilanjutkan untuk menilai ekspresi Nrf2 pada masing-masing zona, maka akan tampak bahwa pada kelompok sehat adanya fungsi detoksifikasi yang terjadi di hati menunjukkan gambaran ekspresi Nrf2 yang lebih tinggi di area perisentral (zona 3) yang menunjukkan perbedaan signifikan dengan ekspresinya di area intermediate (zona 2), sedangkan terhadap zona lainnya tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan secara statistik.

Sementara itu, distribusi ekspresi Nrf2 pada kelompok 2AAF/CCl4 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antar zona hati. Dengan tidak adanya perbedaan signifikan antar zona dan ekspresinya yang bahkan lebih rendah dari kelompok sehat menunjukkan bahwa kerusakan yang terjadi menekan ekspresi

Nrf2 secara hampir sama pada seluruh zona hati. Serupa dengan itu, kelompok SPM-TP 1 juta yang menunjukkan peningkatan ekspresi Nrf2 bila dibandingkan dengan kelompok sehat dan 2AAF/CCl4 juga tidak menunjukkan perbedaan distribusi ekspresi yang signifikan antar zona hati. Sementara itu, pada kelompok yang diberikan SPM-TP 3 juta terdapat perbedaan distribusi ekspresi yang signifikan yang terjadi antara zona 1 dan 2 dimana zona 1 menunjukkan ekspresi Nrf2 yang lebih banyak daripada zona 2, namun tidak ada perbedaan signifikan antara zona-zona lainnya. Secara umum, berdasarkan pola distribusi ekspresi Nrf2 di zona hati, hasil penelitian ini menunjukkan ekspresi Nrf2 tersebar secara hampir sama pada seluruh zona hati pada seluruh kelompok perlakuan.

Oleh karena peranan Nrf2 dalam proliferasi hepatosit, maka ekspresi Nrf2 mungkin dapat dikaitkan dengan terjadinya regenerasi hati.^{11,127} Pola ekspresi Nrf2 yang tergambar pada penelitian ini tampaknya sesuai dengan hasil penelitian Sun dkk (2020) yang menyatakan bahwa seluruh hepatosit turut berpartisipasi dalam regenerasi hati.⁸⁶

Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang menilai pengaruh pemberian SPM-TP terhadap penekanan jalur stres oksidatif. Akan tetapi, bagaimana jalur ROS menyebabkan fibrosis belum diteliti lewat penelitian ini. Penurunan Nrf2 yang berimbas pada penurunan GSH dan peningkatan ROS yang diperantarai oleh protein p53 juga belum diteliti. Selain itu, perubahan yang terjadi pada parameter yang diperiksa setelah pemberian SPM-TP tidak dapat dipastikan apakah hal itu disebabkan oleh SPM-TP yang memang berhasil mencapai hati yang cedera ataupun hanya efek parakrinnya saja.

BAB VI

KESIMPULAN & SARAN

6.1. Kesimpulan

- Terdapat penurunan kadar MDA pada kelompok tikus cedera hati kronis yang diberikan SPM-TP 1 juta sel dan peningkatan kadar MDA pada tikus yang diberikan SPM-TP 3 juta sel dibandingkan dengan kelompok tikus cedera hati kronis yang tidak diberikan SPM-TP.
- Terdapat peningkatan ekspresi GSH pada kelompok tikus cedera hati kronis yang diberikan SPM-TP 1 juta dan penurunan kadar GSH pada tikus yang diberikan SPM-TP 3 juta dibandingkan dengan kelompok tikus cedera hati kronis yang tidak diberikan SPM-TP.
- Terdapat peningkatan ekspresi Nrf2 pada kelompok tikus cedera hati kronis yang diberikan SPM-TP baik 1 juta maupun 3 juta sel dibandingkan dengan kelompok tikus cedera hati kronis yang tidak diberikan SPM-TP.
- Tidak terdapat perbedaan ekspresi Nrf2 antar zona pada setiap kelompok perlakuan

6.2. Saran

- Hasil penelitian ini perlu dibandingkan dengan hasil pemeriksaan yang melihat resolusi fibrosis dan proses regenerasi hati yang terjadi dengan pemberian SPM-TP
- Dapat dilakukan penelitian lanjutan berupa pemeriksaan protein p53 untuk memahami peranan protein p53 dalam jalur stress oksidatif dan fibrosis hati
- Melakukan penelitian yang bertujuan melihat jalannya SPM-TP hingga sampai ke lokasi cedera
- Penggunaan SPM-TP dengan dosis lebih rendah (1×10^6 pada tikus atau sekitar $0,8 \times 10^6$ sel/kgBB pada manusia) lebih disarankan dibanding dengan dosis lebih tinggi (3×10^6 pada tikus atau setara dengan $2,4 \times 10^6$ sel/kgBB pada manusia)

DAFTAR PUSTAKA

1. Liu YB, Chen MK. Epidemiology of liver cirrhosis and associated complications: Current knowledge and future directions. *World J Gastroenterol*. 2022;28(41):5910-30. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i41.5910>
2. Hoffmann C, Djerir NEH, Danckaert A. *et al*. Hepatic stellate cell hypertrophy is associated with metabolic liver fibrosis. *Sci Rep*. 2020;10:3850. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60615-0>
3. Sharifi-Rad M, Kumar NVA, Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, *et al*. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Front. Physiol*. 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>
4. Setiawati L, Liem IK, Husna FA. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 versus reactive oxygen species: Potential therapeutic approach on fighting liver fibrosis. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2023;11(F):115-23. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2023.11334>
5. Liu P, Dodson M, Li H, Schmidlin CJ, Sakya A, Wei YY, *et al*. Non-canonical Nrf2 activation promotes a pro-diabetic shift in hepatic glucose metabolism. *Mol Metab*. 2021;51. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101243>
6. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, *et al*. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol*. 2010;12:213–23. <https://doi.org/10.1038/ncb2021>
7. Trotter JF. Current issues in liver transplantation. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2016;12(4):214-9.
8. Shang Y, Guan H, Zhou F. Biological characteristic of umbilical cord mesenchymal stem cells and its therapeutic potential for hematological disorders. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.570179>
9. Basir HRG, Karbasi A, Ravan AP, Abbasalipourkabir R, Bahmani M. Is human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived conditioned medium effective against oxidative and inflammatory status in CCl₄-induced acute liver injury?. *Life science*. 2022;305. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120730>
10. Stavely R, Nurgali K. The emerging antioxidant paradigm of mesenchymal stem cell therapy. *Stem cells Transl Med*. 2020;9(9):985-1006. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0446>
11. Chan BKY, Elmasry M, Forootan SS, Russomanno G, Bunday TM, Zhang F, *et al*. Pharmacological activation of Nrf2 enhances functional liver regeneration. *Hepatol*. 2021;74(2):2021
12. Hermansyah D, Putra A, Muhar AM, Retnaningsih, Wirastuti K, Dirja BT. Mesenchymal stem cells suppress TGF- β release to decrease α -SMA expression in ameliorating CCl₄ induced liver fibrosis. *Medical archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)*. 2021;75(1):16 – 22
13. Zahari AP. Analisis ekspresi TGF- β 1 dan Interleukin-10 pada proses perbaikan fibrosis hati tikus yang diberi sel punca mesenkim asal tali pusat manusia. Tesis Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 2020
14. Zakiyah. Pengaruh sel punca mesenkimal asal tali pusat manusia di dalam membantu diferensiasi dan proliferasi hepatosit melalui aktivasi protein DLK1 pada regenerasi hati. Tesis Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 2020
15. Alvarabie R. Ekspresi VEGF dan Regenerasi Jaringan Hati Tikus Model Cedera Hati 2AAF/ CCL₄ yang diberi sel punca mesenkimal tali pusat manusia. Tesis Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 2020
16. Chin S, Shahrizal M, Liyana M, Then KY, Cheong SK. High dose of intravenous allogenic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (CLV-100) infusion

- displays better immunomodulatory effect among healthy volunteers: A phase 1 clinical study. *Stem Cells international*. 2020;2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8877003>
17. Florea V, Rieger AC, DiFede DL, El-Khorazaty J, Natsumeda M, Banerjee MN, et al. Dose comparison study of allogenic mesenchymal stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy (The TRIDENT Study). *Circ Res*. 2017;121(11):1279-90. <https://doi.org/10.1161%2FCIRCRESAHA.117.311827>
 18. Standring S (editor). *Gray's Anatomy: The anatomical basis of clinical practice*. 41st edition. London: Elsevier. 2016:1160-73
 19. Kalra A, Yetiskul E, Wehrle CJ, et al. Physiology, liver. [Updated 2022 May 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/>
 20. Lorente, S., Hautefeuille, M. & Sanchez-Cedillo, A. The liver, a functionalized vascular structure. *Sci Rep*. 2020;10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73208-8>
 21. Kholodenko IV, Yarygin KN. Cellular mechanisms of liver regeneration and cell-based therapies for liver diseases. *Biomed Res Int*. 2017;2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8910821>
 22. Cunningham RP, Porat-Shliom N. Liver zonation-Revisiting old question with new technologies. *Front Physiol*. 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.732929>
 23. Özkan A, Stolley D, Cressman ENK, McMillin M, DeMorrow S, Yankeelov TE, et al. The influence of chronic liver diseases on hepatic vasculature: A Liver-on-a-chip Review. *Micromachines*. 2020;11(5):487. <https://doi.org/10.3390/mi11050487>
 24. Alamri ZZ. The role of liver in metabolism: an updated review with physiological emphasis. *Int J Basic Clin Pharmacol* [Internet]. 2018 Oct. 23 [cited 2023 Apr. 10];7(11):2271-6. Available from: <https://www.ijbcp.com/index.php/ijbcp/article/view/2846>
 25. Potęga A. Glutathione-mediated conjugation of anticancer drugs: An overview of reaction mechanisms and biological significance for drug detoxification and bioactivation. *Molecules*. 2022;27:5252. <https://doi.org/10.3390/molecules27165252>
 26. Abdel-Bakky MS, Helal GK, El-Sayed EM, Saad AS. Carbon tetrachloride-induced liver injury in mice is tissue factor dependent. *Pharmacology*. 2015;39(3):1199-205. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.02.012>
 27. Delire B, Stärkel P, Leclercq I. Animal models for fibrotic liver diseases: What we have, what we need, and what is under development. *J Clin Transl Hepatol*. 2015;3(1):53-66. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2014.00035>. PMID: 26357635; PMCID: PMC4542084.
 28. Kruepunga N, Hakvoort TBM, Hikspoors JPJM, Kohler SE, Lamers WH. Anatomy of rodent and human livers: What are the differences?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2019;1865(5):869-78. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.05.019>
 29. Stan F. Comparative study of the liver anatomy in the rat, rabbit, guinea pig, dan chincilla. *Bulletin UASVM Veterinary Medicine*. 2018;75(1)
 30. Nevzorova YA, Boyer-Diaz Z, Cubero FJ, Gracia-Sancho J. Animal models for liver disease-A practical approach for translational research. *J of Hepatol*. 2020:1-18.
 31. Hubrecht RC, Carter E. The 3Rs and humane experimental technique: Implementing change. *Animals (Basel)*. 2019;9(10):754. <https://doi.org/10.3390/ani9100754>. PMID: 31575048; PMCID: PMC6826930.
 32. Warmink K, Rios JL, van Valkengoed DR, Korthagen NM, Weinans H. Sprague Dawley rats develop more joint damage compared to wistar-han rats in a high fat-high sucrose groove model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2021;29(1).s138. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2021.02.194>
 33. Wang W, Teresa M, Cay J, Zhang C, Wong S, Yan Z et al. Comparative assessment for rat strain differences in metabolic profiles of 14 drugs in Wistar Han and Sprague dawley hepatocytes. *Xenobiotica*. 2021;51(1):15-23. <https://doi.org/10.1080/00498254.2020.1795949>

34. Liu Z, Ren Z, Zhang J, Chuang C, Kandaswamy E, Zhou T et al. Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. *Front Physiol.* 2018;9:477. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00477>
35. Shields HJ, Traa A, Van Raamsdonk JM. Beneficial and detrimental effect 82 reactive oxygen species on lifespan: A comprehensive review of comparative and experimental studies. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.628157>
36. Conde de la Rosa L, Goicoechea L, Torres S, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Role of oxidative stress in liver disorders. *Livers [Internet].* 2022;2(4):283–314. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/livers2040023>
37. Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu ZB. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *Int J Mol Med.* 2019;44(1):3-15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>. PMID: 31115493; PMCID: PMC6559295.
38. Poh J, Ponsford AH, Boyd J, Woodsmith J, Stelzl U, Wanker E, et al. A functionally defined high-density NRF2 interactome reveals new conditional regulators of ARE transactivation. *Redox Biology.* 2020;37. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101686>
39. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the B-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:9926 – 30. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.9926>
40. Zhou J, Zheng Q, Chen Z. The Nrf2 pathway in liver diseases. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.826204>
41. Liu P, Anandhan A, Chen J, Shakya A, Dodson M, Ooi A, et al. Decreased autophagosome biogenesis, reduced Nrf2, and enhanced ferroptotic cell death are underlying molecular mechanisms of non-alcoholic fatty liver disease. 2023;59. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102570>
42. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 1999;13(1):76-86. <https://doi.org/10.1101/gad.13.1.76>. PMID: 9887101; PMCID: PMC316370.
43. Saha S, Buttari B, Panieri E, Profumo E, Saso L. An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation. *Molecules.* 2020;25(22):5474. <https://doi.org/10.3390/molecules25225474>. PMID: 33238435; PMCID: PMC7700122.
44. Zhou J, Zheng Q, Chen Z. The Nrf2 pathway in liver diseases. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:826204. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.826204>. PMID: 35223849; PMCID: PMC8866876.
45. Silva-Islas CA, Maldonado PD. Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. *Pharmacol Res.* 2018;134:92-9. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.06.013>. PMID: 29913224.
46. Major MB, Camp ND, Berndt JD, Yi X, Goldenberg SJ, Hubbert C, et al. Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science.* 2007;316(5827):1043-6. <https://doi.org/10.1126/science/1141515>. PMID: 17510365.
47. Rada P, Rojo AI, Chowdhry S, McMahon M, Hayes JD, Cuadrado A. SCF/{beta}-TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Mol Cell Biol.* 2011;31(6):1121-33. <https://doi.org/10.1128/MCB.01204-10>. PMID: 21245377; PMCID: PMC3067901.
48. Sun Z, Zhang S, Chan JY, Zhang DD. Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Mol Cell Biol.* 2007;27(18):6334-49. <https://doi.org/10.1128/MCB.00630-07>. PMID: 17636022; PMCID: PMC2099624.
49. Hu B, Wei H, Song Y, Chen M, Fan Z, Qiu R, et al. NF-κB and Keap1 interaction represses Nrf2-mediated antioxidant response in rabbit hemorrhagic disease virus infection. *J Virol.* 2020;94(10):e00016-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00016-20>. PMID: 32161178; PMCID: PMC7199420.

50. Eddaikra A, Eddaikra N. Endogenous Enzymatic Antioxidant Defense and Pathologies [Internet]. Antioxidants - Benefits, Sources, Mechanisms of Action. IntechOpen. 2021. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.95504>
51. Lim J, Heo J, Ju H, Shin J, Kim Y, Lee S, et al. Glutathione dynamics determine the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells for graft-versus-host disease via CREB1-Nrf2 pathway. *Science Advance*. 2020;6(16). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1334>
52. Liu J, Shi L, Wang Y, Yi M, Zhou C, Zhang L. Ruthenium-based metal-organic framework with reactive oxygen and nitrogen species scavenging activities for alleviating inflammation diseases. *Nanotoday*. 2022;47. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2022.101627>
53. Hu Q, Ren J, Li G, Wu J, Wu X, Wang G, et al. The mitochondrially targeted antioxidant MitoQ protects the intestinal barrier by ameliorating mitochondrial DNA damage via the Nrf2/ARE signaling pathway. *Cell Death Dis*. 2018;9(403). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0436-x>
54. Gumeni S, Papanagnou ED, Manola MS, Trougakos IP. Nrf2 activation induces mitophagy and reverses Parkin/Pink1 knock down-mediated neuronal and muscle degeneration phenotypes. *Cell Death Dis*. 2021;12(7):671. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03952-w>. PMID: 34218254; PMCID: PMC8254809.
55. Liu J, Zuo T, Zhao L, Li Y, Chang L, Zhang Y, et al. Serum extracellular vesicle proteome differentiate early stage liver fibrosis. 2022;482. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2022.116936>
56. Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives. *Cells* NLM (Medline). 2020;9(4):875. <https://doi.org/10.3390/cells9040875>
57. Mihm S. Danger-associated molecular patterns (DAMPs): Molecular triggers for sterile inflammation in the liver. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10):3104. <https://doi.org/10.3390/ijms19103104>
58. Yang H, Wang H, Andersson U. Targeting inflammation driven by HMGB1. *Front Immunol*. 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00484>
59. Yang J, Zhang L, Yang X, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res* 2. 2014;1. <https://doi.org/10.1186/2050-7771-2-1>
60. Dewidar B, Meyer C, Dooley S, Meindl-Beinker AN. TGF- β in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis-Updated 2019. *Cells*. 2019;8(11):1419. <https://doi.org/10.3390/cells8111419>. PMID: 31718044; PMCID: PMC6912224
61. Fujita T, Narumiya S. Roles of hepatic stellate cells in liver inflammation: a new perspective. *Inflamm Regen*. 2016;36(1). <https://doi.org/10.1186/s41232-016-0005-6>
62. Tsykrunov V, Andreev V, Kravchuk R, Kandratovich I. Ito Stellate Cells (hepatic stellate cells) in diagnosis of liver fibrosis. *Gastroenterol Hepatol: Open Access*. 2018;10(4). <https://doi.org/10.15406/ghoa.2019.10.00384>
63. Piersma B, Bank RA, Boersema M. Signaling in fibrosis: TGF- β , Wnt, and YAP/TAZ converge. *Front Med*. 2015;2. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00059>
64. Costanza B, Umelo IA, Bellier J, Castronovo V, Turtoi A. Stromal modulators of TGF- β in Cancer. *J Clin Med*. 2017;6(1):7. <https://doi.org/10.3390/jcm6010007>. PMID: 28067804; PMCID: PMC5294960.
65. Solhi R, Lotfi AS, Lotfinia M, Farzaneh Z, Piryaee A, Najimi M, et al. Hepatic stellate cell activation by TGFB induces hedgehog signaling and endoplasmic reticulum stress simultaneously. *Toxicol In Vitro*. 2022;80. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105315>
66. Ying HZ, Chen Q, Zhang WY, Zhang HH, Ma Y, Zhang SZ, et al. PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics (Review). *Mol Med Rep*. 2017;16:7879-89. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7641>
67. Wardyn JD, Ponsford AH, Sanderson CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem Soc Trans*.

- 2015;43(4):621-6. <https://doi.org/10.1042/BST20150014>. PMID: 26551702; PMCID: PMC4613495.
68. Balaji S, Ahmed M, Lorence E, Yan F, Nomie K, Wang M. NF- κ B signaling and its relevance to the treatment of mantle cell lymphoma. *J Hematol Oncol*. 2018;11. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0621-5>
 69. Xiong Y, Torsoni AS, Wu F, Shen H, Liu Y, Zhong X, et al. Hepatic NF-KB-inducing kinase (NIK) suppresses mouse liver regeneration in acute and chronic liver diseases. *Cell Biol*. 2018. <https://doi.org/10.7554/eLife.34152>
 70. Fan X, Li Q, Wang Y, Zhang D, Zhou J, Chen Q, et al. Non-canonical NF-KB contributes to endothelial pyroptosis and atherogenesis dependent on IRF-1. *Translational Research*. 2023;255:1-3. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2022.11.001>
 71. Fang Y, Zhou L, Hu X, Guo J, Liao J, Zhang Z. TLR4-MyD88-NF-KB signaling pathway contributes to the regression of secondary hepatic injury and fibrosis in hepatolithiasis. *European J Inflam*. 2021. <https://doi.org/10.1177/2058739221014762>
 72. Xiao Q, Chen Z, Jin X, Mao R, Chen Z. The many postures of noncanonical Wnt signaling in development and diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2017;93:359-69. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.061>.
 73. Wang S, Zhou L, Ling L, Meng X, Chu F, Zhang S, et al. The crosstalk between hippo-YAP pathway and innate immunity. *Front Immunol Sec. Molecular Innate Immunity*. 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00323>
 74. Ishikawa F, Kaneko E, Sugimoto T, Ishijima T, Wakamatsu M, Yuasa A, et al. A mitochondrial thioredoxin-sensitive mechanism regulates TGF- β -mediated gene expression associated with epithelial-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;443(3):821-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.050. PMID: 24342608.
 75. Krstić J, Trivanović D, Mojsilović S, Santibanez JF. Transforming growth factor-beta and oxidative stress interplay: Implications in tumorigenesis and cancer progression. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:654594. <https://doi.org/10.1155/2015/654594>. PMID: 26078812; PMCID: PMC4452864.
 76. Prestigiacomo V, Suter-Dick L. Nrf2 protects stellate cells from Smad-dependent cell activation. *PLoS One*. 2018;13(7):e0201044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201044>. PMID: 30028880; PMCID: PMC6054401.
 77. Liu H, Liu X, Zhang C, Zhu H, Xu Q, Bu Y, et al. Redox imbalance in the development of colorectal cancer. *J of Cancer*. 2017;8:1586-97. <https://doi.org/10.7150/jca.18735>
 78. Brigelius-Flohé R, Kipp AP. Selenium in the redox regulation of the Nrf2 and the Wnt pathway. *Methods Enzymol*. 2013;527:65-86. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405882-8.00004-0>. PMID: 23830626.
 79. Gilgenkrantz H, Collin de l'Hortet A. Understanding Liver Regeneration: From Mechanisms to Regenerative Medicine. *Am J Pathol*. 2018;188(6):1316 -27. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.03.008>.
 80. Huang R, Zhang X, Gracia-Sancho J, Xie W. Liver regeneration: Cellular origin and molecular mechanisms. *Liver international*. 2022;42(7):1486-95. <https://doi.org/10.1111/liv.15174>
 81. Matsumoto T, Wakefield L, Tarlow BD, Grompe M. In vivo lineage tracing of polyploid hepatocytes reveals extensive proliferation during liver regeneration. *Cell Stem Cell*. 2019;26(1):34-47.E3. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.11.014>
 82. Wei Y, Wang Y, Jia Y, Li L, Yoon J, Zhang S, et al. Liver homeostasis is maintained by midlobular zone 2 hepatocytes. *Science*. 2021;371(6532). <https://doi.org/10.1126/science.abb1625>
 83. Deng X, Zhang X, Li W, Feng R, Li L, Yi G. Chronic liver injury induces conversion of biliary epithelial cells into hepatocytes. *Cell Stem cell*. 2018;23(1):114-22.e3. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.022>
 84. Best DH, Coleman WB. Treatment with 2-AAF blocks the small hepatocyte-like progenitor cell response in retrorsine-exposed rats. *J Hepatol*. 2007;46:1055-63. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.01.040>

85. Avril A, Pichard V, Bralet M, Ferry N. Mature hepatocytes are the source of small hepatocyte-like progenitor cells in the retrorsine model of liver injury. *2017*;41(5):737-43. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.07.029>
86. Sun TL, Pikiolek M, Orsini V, Roma G, Cong F, Tchorz JS. AXIN2⁺ Perisentral Hepatocytes Have limited Contributions to Liver Homeostasis and Regeneration. *Cell Stem Cell*. 2020;26(1):97-107. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.10.011>.
87. Wang B, Zhao L, Fish M, Logan CY, Nusse R. Self-renewing diploid Axin2(+) cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature*. 2015 Aug 13;524(7564):180-5. <https://doi.org/10.1038/nature14863>. PMID: 26245375; PMCID: PMC4589224.
88. Kholodenko IV, Kurbatov LK, Kholodenko RV, Manukyan GV, Yarygin KN. Mesenchymal stem cells in the adult human liver: Hype or hope?. *Cells*. 2019;8(10):1127. <https://doi.org/10.3390/cells8101127>
89. Jadi J, Kim A, Lee S, Shin D. Liver progenitor cell-driven liver regeneration. *Exp Mol Med*. 2020;52:1230–8. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0483-0>
90. Lai J, Jiang S, Shuai L, Zhang Y, Xia R, Chen Q, Bai L. Comparison of the biological and functional characteristics of mesenchymal stem cells from intrahepatic and identical bone marrow. *Stem Cells Res*. 2021;55. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102477>
91. Menthena A, Deb N, Oertel M, Grozdanov PN, Sandhu J, Shah S, et al. Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver. *Stem Cell Journals*. 2008;22(6):1049-61. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-6-1049>
92. Bellanti F, Serviddio G, Vendemiale G. Modulation of liver regeneration by nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Advances in redox research*. 2023;7. <https://doi.org/10.1016/j.arres.2023.100066>
93. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 5943, Carbon Tetrachloride" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbon-Tetrachloride>. Accessed 27 April, 2023.
94. Bao Y, Wang L, Pan H, Zhang T, Chen Y, Xu S et al. Animal and organoid models of liver fibrosis. *Front Physiol*. 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.666138>
95. Scholten D, Trebicka J, Liedtke C, Weiskirchen R. The carbon tetrachloride model in mice. *Laboratory animals*. 2015;49(S1):4-11. <https://doi.org/10.1177/0023677215571192>
96. Endig J, Unrau L, Sprezyna P, Rading S, Karsak M, Goltz D, et al. Acute liver injury after CCl₄ administration is independent of Smad7 expression in myeloid cells. *Int J Mol Sci*. 2019;20(22):5528. doi: 10.3390/ijms20225528. PMID: 31698731; PMCID: PMC6888233.
97. Chang SN, Kim SH, Dey DK, Park SM, Nasif O, Bajpai VK, et al. 5-O-Demethylnobiletin alleviates CCl₄-induced acute liver injury by equilibrating ROS-mediated apoptosis and autophagy induction. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1083. doi: 10.3390/ijms22031083. PMID: 33499185; PMCID: PMC7865239.
98. Xu Y, Xu W, Liu W, Chen G, Jiang S, Chen J, et al. Yiguanjian decoction inhibits macrophage M1 polarization and attenuates hepatic fibrosis induced by CCl₄/2-AAF. *Pharm Biol*. 2021;59:1148-58. <https://doi.org/10.1080/13880209.2021.1961820>
99. Liem IK, Zakiyah, Oktavina R, Deraya IE, Kodariah R, Krisnuhoni E, et al. Comparison of two methods of 2AAF/CCl₄ exposure to induce rat animal model of chronic liver injury. *eJKI*. 2020;8(3):164-71. <https://doi.org/10.23886/ejki.8.11439>
100. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 5897, 2-Acetylaminofluorene; [cited 2023 May 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Acetylaminofluorene>
101. Hasan SK, Khan R, Ali N, Khan AQ, Rehman MU, Tahir M, et al. 18-B Glycyrrhetic acid alleviates 2-acetylaminofluorene-induced hepatotoxicity in Wistar rats: Role in hyperproliferation, inflammation, and oxidative stress. *Human and Experimental Toxicology*. 2014. <https://doi.org/10.1177/0960327114554045>

102. Sanchez-Meza J, Campos-Valdez M, Dominguez-Rosales JA, Rodriguez-Reyes SC, Martinez-Lopez E, Godinez-Rubi JM, et al. Diethylnitrosamine and 2-acetylaminofluorene chronic administration leads to biochemical and histologic changes related to hepatocellular carcinoma in Wistar rats. *Annals of Hepatol.* 2022;27(3). <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2022.100851>
103. Hasanin AH, Habib EK, El gayar N, Matboli M. Promotive action of 2-acetylaminofluorene on hepatic precancerous lesions initiated by diethylnitrosamine in rats: Molecular study. *World J Hepatol.* 2021;13(3):328-42. <https://doi.org/10.4254/wjh.v13.i3.328>
104. Charitos IA, Ballini A, Cantore S, Boccellino M, Di Domenico M, Borsani E, et al. Stem Cells: A Historical Review about Biological, Religious, and Ethical Issues. *Stem Cells Int.* 2021;2021:9978837. <https://doi.org/10.1155/2021/9978837> PMID: 34012469; PMCID: PMC8105090.
105. Fan X, Zhang Y, Li X, Fu Q. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(14):2771-94. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03454-6>
106. Ling M, Tang C, Yang X, Yu N, Song Y, Ding W, et al. Integrated metabolomics and phosphoproteomics reveal the protective role of exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells in naturally aging mouse livers. *Experimental Cell Research.* 2023;427(1). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2023.113566>
107. da Costa Gonçalves F, Grings M, Nunes NS, et al. Antioxidant properties of mesenchymal stem cells against oxidative stress in a murine model of colitis. *Biotechnol Lett.* 2017;39:613–22. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2272-3>
108. Jeong EM, Yoon JH, Lim J, Shin JW, Cho AY, Heo J, et al. Real-Time Monitoring of Glutathione in Living Cells Reveals that High Glutathione Levels Are Required to Maintain Stem Cell Function. *Stem Cell Reports.* 2018;10(2):600-14. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.12.007>. PMID: 29307581; PMCID: PMC50891.
109. Suh JH, Kanathezhath B, Shenvi S, Guo H, Zhou A, Tiwana A. Thiol/Redox metabolomic profiling implicates GSH dysregulation in early experimental graft versus host disease (GVHD). *Plos One.* 2014;9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088868>
110. Liu P, Xie Xr, Wu H, Li H, C Js, Liu Xm. Mesenchymal stem cells promote intestinal mucosal repair by positively regulating the Nrf2/Keap1/ARE signaling pathway in acute experimental colitis. *Dig Dis Sci.* 2023; 68:1835-46. <https://doi.org/10.1007/s10620-022-07722-2>
111. Nagamura-Inoue T, He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World J Stem Cells.* 2014;6(2):195-202. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i2.195>.
112. Sa'dyah NAC, Putra A, Dirja BT, Hidayah N, Azzahara SY, Irawan RCS. Suppression of transforming growth factor-B by mesenchymal stem-cells accelerates liver regeneration in liver fibrosis animal model. *Univ Med.* 2021;40(1). <https://doi.org/10.18051/UnivMed.2021.v40.29-35>
113. Chen Y, Peng D, Li J, Zhang L, Chen J, Wang L, et al. A comparative study of different doses of bone marrow derived mesenchymal stem cells improve post-stroke neurological outcomes via intravenous transplantation. *Brain research.* 2023;1798. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.148161>
114. Li K, Wang T, Li R, Xue F, Zeng G, Zhang J. Dose-specific efficacy of adipose-derived mesenchymal stem cells in septic mice. *Stem cell research & Therapy.* 2023;14(32). <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03253-3>
115. Fazekas B, Alagesan S, Watson L, Ng O, Conroy CM, Catala C. Comparison of single and repeated dosing of anti inflammatory human umbilical cord mesenchymal Stromal cells in a mouse model of polymicrobial sepsis. *Stem cell reviews and Reports.* 2022;18:1444-60. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10323-7>

116. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One*. 2014;9(5):e96801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096801>
117. Matsuoka Y, Yoshida R, Kawahara K, Sakata J, Arita H, Nkashima H, et al. The antioxidative stress regulator Nrf2 potentiates radioresistance of oral squamous cell carcinoma accompanied with metabolic modulation. *Lab Invest*. 2022;102(8):896-907. <https://doi.org/10.1038/s41374-022-00776-w>.
118. Yuniastuti A. Dasar molekuler glutation dan perannya sebagai antioksidan. Semarang: FMIPA Press. 2016.
119. Li H, Zhirong Z, Shibo Z, Lichen Z, Ming S, Hua J, et al. The effects of umbilical cord mesenchymal stem cells on traumatic pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci*. 2023;68:147-54. <http://doi.org/10.1007/s10620-022-07493-w>
120. Shi D, Jiang P. A Different Facet of p53 Function: Regulation of Immunity and Inflammation During Tumor Development. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.762651>
121. Chen W, Jiang T, Wang H, Tao S, Lau A, Fang D, Zhang D. Does nrf2 contribute to p53 mediated control cell survival and death. *Antioxid Redox Signal*. 2012; 17(12): 1670 – 5. <http://doi.org/10.1089/ars.2012.4674>
122. Méndez-García L, Martínez-Castillo M, Villegas-Sepúlveda N, Orozco L, Córdova E. Curcumin induces p53-independent inactivation of Nrf2 during oxidative stress–induced apoptosis. *Human & Experimental Toxicology*. 2019;38(8):951-61. <https://doi.org/10.1177/0960327119845035>
123. González-González A, García-Sánchez D, Dotta M, Rodríguez-Rey JC, Pérez-Campo FM. Mesenchymal stem cells secretome: The cornerstone of cell-free regenerative medicine. *World J Stem Cells*. 2020;12(12):1529-52. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i12.1529>.
124. Nie P, Bai X, Lou Y, Zhu Y, Jiang S, Zhang L, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce oxidative damage and apoptosis in diabetic nephropathy by activating Nrf2. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):450. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02447-x>
125. Shyh-Chang N, Ng HH. The metabolic programming of stem cells. *Genes Dev*. 2017;31(4):336-46. <https://doi.org/10.1101/gad.293167.116>
126. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol*. 2012;3:297. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00297>
127. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm*. 2016;7(2):27-31. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat lolos kaji etik



UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Nomor : KET- 559 /UN2.F1/ETIK/PPM.00.02/2022

Gedung Fakultas Kedokteran UI
Jl. Salemba Raya No.6, Jakarta 10430
PO.Box 1359
T. 62.21.3912477, 31930371, 31930373,
3602977, 36027360, 3153236,
F. 62 21 3912477, 31930372, 3157286,
E. humas@fk.ui.ac.id, office@fk.ui.ac.id
fkui.ac.id

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
EXEMPTION LETTER

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia – RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subjek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol penelitian yang berjudul:

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia – Cipto Mangunkusumo Hospital with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research entitled:

"Pengaruh Pemberian Sel Punca Mesenkim Asal Tali Pusat terhadap Status Oksidasi, Aktivitas Endotel dan Matriks Ekstraseluler Jaringan Hati Tikus yang Mengalami Cedera Kronis."

Protocol Number : 22-06-0645

Peneliti Utama : dr. Isabella Kurnia Liem, M.Biomed, PhD, PA
Principal Investigator

Nama Institusi : Anatomi FKUI
Name of the Institution

Lokasi Penelitian : 1. Departemen Anatomi FKUI
Site : 2. Departemen Patologi Anatomi FKUI
3. Laboratorium Terpadu FKUI

Tanggal Persetujuan : 13 JUN 2022
Date of Approval (valid for one year beginning from the date of approval)

Dokumen Disetujui : Proposal Penelitian, Version 0.1 tanggal 24 Mei 2022
Document Approved

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo menyatakan bahwa penelitian tersebut DAPAT DILAKSANAKAN TANPA PERSETUJUAN ETIK.

The Health Research Ethics Committee Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, Cipto Mangunkusumo Hospital states that the document(s) above do not need approval letter of the Health Research Ethics Committee.

Ditetapkan di : Jakarta
Specified in

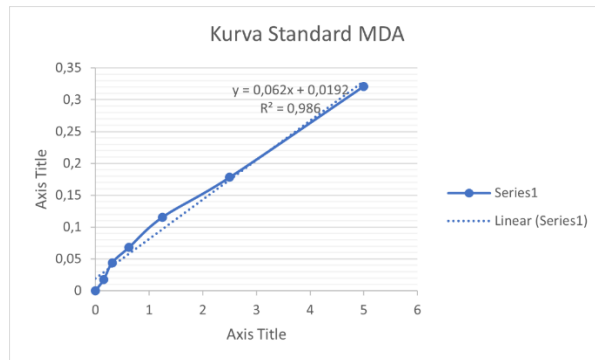


Prof. dr. Risa Sita Situmorang, Ph.D., Sp.M(K)

**** Paraf di bawah ini :**

1. Menjaga kerahasiaan identitas subjek penelitian.
2. Menentukan status penelitian apikali:
 - a. Setelah masa berlakunya ketetapan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini ethical approval harus diperpanjang.
 - b. Penelitian berhenti ditengah jalan.
3. Melakukan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse event*).
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subjek sebelum protokol penelitian mendapat lolos kaji etik dan sebelum memperoleh *informed consent* dari subjek penelitian.
5. Menyampaikan laporan akhir, bila penelitian sudah selesai.
6. Cantumkan nomor protokol ID pada setiap komunikasi dengan KEPK FKUI-RSCM.

Lampiran 2. Analisis Uji Statistik MDA



Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
Kelompok perlakuan		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Konsentrasi MDA (nmol/mg)	sehat	.287	6	.134	.856	6	.175
	2AAF/CCl4	.173	6	.200 [*]	.907	6	.418
	SPM-TP 1 juta	.245	6	.200 [*]	.905	6	.407
	SPM-TP 3 juta	.212	6	.200 [*]	.905	6	.404

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

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Konsentrasi MDA (nmol/mg)	Based on Mean	.675	3	20	.577
	Based on Median	.587	3	20	.631
	Based on Median and with adjusted df	.587	3	15.243	.633
	Based on trimmed mean	.665	3	20	.583

ANOVA

Konsentrasi MDA (nmol/mg)					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.506	3	.502	8.804	.001
Within Groups	1.141	20	.057		
Total	2.647	23			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Konsentrasi MDA (nmol/mg)

Tukey HSD

		Mean Difference			95% Confidence Interval	
(I) Kelompok perlakuan	(J) Kelompok perlakuan	(I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
sehat	2AAF/CCl4	-.37774	.13788	.056	-.7637	.0082
	SPM-TP 1 juta	.05500	.13788	.978	-.3309	.4409
	SPM-TP 3 juta	-.53671 [*]	.13788	.004	-.9256	-.1538
2AAF/CCl4	sehat	.37774	.13788	.056	-.0082	.7637
	SPM-TP 1 juta	.43274	.13788	.025	.0468	.8186
	SPM-TP 3 juta	-.16197	.13788	.649	-.5479	.2239
SPM-TP 1 juta	sehat	-.05500	.13788	.978	-.4409	.3309
	2AAF/CCl4	-.43274	.13788	.025	-.8186	-.0468
	SPM-TP 3 juta	-.59470	.13788	.002	-.9808	-.2088
SPM-TP 3 juta	sehat	.53671 [*]	.13788	.004	.1538	.9256
	2AAF/CCl4	.16197	.13788	.649	-.2239	.5479
	SPM-TP 1 juta	.59470	.13788	.002	.2088	.9808

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

Konsentrasi MDA (nmol/mg)

Tukey HSD^a

		Subset for alpha = 0.05		
Kelompok perlakuan	N	1	2	3
SPM-TP 1 juta	6	.5837		
sehat	6	.6387	.6387	
2AAF/CCl4	6		1.0164	1.0164
SPM-TP 3 juta	6			1.1784
Sig.		.978	.056	.649

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lampiran 3. Analisis Uji Statistik GSH

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
Kelompok		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar GSH (ug/mg)	Sehat	.306	6	.082	.862	6	.197
	2AAF/CCl4	.277	6	.165	.860	6	.188
	SPM-TP 1 juta	.220	6	.200 [*]	.926	6	.551
	SPM-TP 3 juta	.256	6	.200 [*]	.898	6	.360

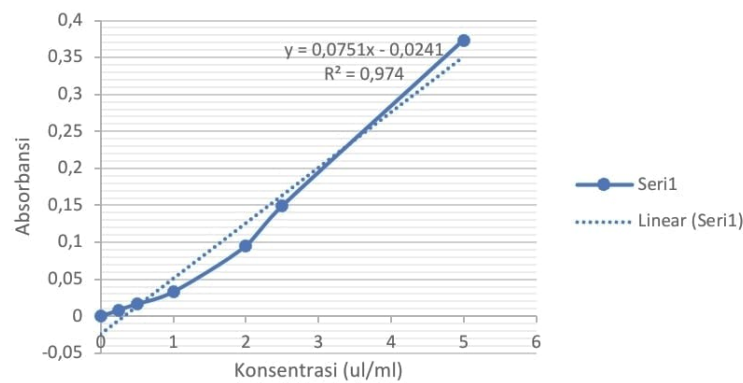
^a. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Kadar GSH (ug/mg)	Based on Mean	.917	3	20	.451
	Based on Median	.520	3	20	.673
	Based on Median and with adjusted df	.520	3	15.143	.675
	Based on trimmed mean	.853	3	20	.481

Kurva standar GSH



ANOVA

Kadar GSH (ug/mg)					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.017	3	.006	22.309	.000
Within Groups	.005	20	.000		
Total	.022	23			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar GSH (ug/mg)

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Sehat	2AAF/CCI4	.0448123 [*]	.0091994	.000	.019064	.070561
	SPM-TP 1 juta	.0087660	.0091994	.777	-.016983	.034515
	SPM-TP 3 juta	.0855241 [*]	.0091994	.000	.039775	.091273
2AAF/CCI4	Sehat	-.0448123 [*]	.0091994	.000	-.070561	-.019064
	SPM-TP 1 juta	-.0360464 [*]	.0091994	.004	-.061795	-.010298
	SPM-TP 3 juta	.0207118	.0091994	.144	-.005037	.046460
SPM-TP 1 juta	Sehat	-.0087660	.0091994	.777	-.034515	.016983
	2AAF/CCI4	.0360464 [*]	.0091994	.004	.010298	.061795
	SPM-TP 3 juta	.0567581 [*]	.0091994	.000	.031009	.082507
SPM-TP 3 juta	Sehat	-.0855241 [*]	.0091994	.000	-.091273	-.039775
	2AAF/CCI4	-.0207118	.0091994	.144	-.046460	.005037
	SPM-TP 1 juta	-.0567581 [*]	.0091994	.000	-.082507	-.031009

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

Kadar GSH (ug/mgprot)

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
SPM-TP 3 juta	6	.052206	
2AAF/CCI4	6	.072918	
SPM-TP 1 juta	6		.108964
Sehat	6		.117730
Sig.		.144	.777

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lampiran 4. Analisis Uji Statistik Nrf2

H Score antar kelompok perlakuan

Descriptives				
H_score	Kelompok		Statistic	Std. Error
H_score	sehat	Mean	116.0369	2.43991
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	111.1889
			Upper Bound	120.8850
		5% Trimmed Mean	115.8486	
		Median	114.6443	
		Variance	535.784	
		Std. Deviation	23.14702	
		Minimum	56.66	
		Maximum	192.04	
		Range	135.38	
		Interquartile Range	26.35	
		Skewness	.217	.254
		Kurtosis	1.047	.503
	2AAF/CCI4	Mean	101.1753	2.93554
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	95.3424
			Upper Bound	107.0082
		5% Trimmed Mean	102.1454	
		Median	104.5255	
		Variance	775.566	
		Std. Deviation	27.84899	
		Minimum	2.84	
		Maximum	181.99	
		Range	179.15	
		Interquartile Range	29.29	
		Skewness	-.805	.254
		Kurtosis	2.730	.503
	SPM-TP 1 jt	Mean	144.6274	4.55585
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	135.5750
			Upper Bound	153.6798
		5% Trimmed Mean	142.5141	
		Median	129.1843	
		Variance	1868.020	
		Std. Deviation	43.22059	
		Minimum	60.59	
		Maximum	245.94	
		Range	185.35	
		Interquartile Range	64.99	
		Skewness	.728	.254
		Kurtosis	-.491	.503
	SPM-TP 3 jt	Mean	122.1506	5.89676
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	110.4339
			Upper Bound	133.8673
		5% Trimmed Mean	122.4730	
		Median	118.2197	
		Variance	3129.455	
		Std. Deviation	55.94154	
		Minimum	19.01	
		Maximum	231.91	
		Range	212.90	
		Interquartile Range	62.25	
		Skewness	-.101	.254
		Kurtosis	-.708	.503

Tests of Normality							
	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
H_score	sehat	.079	90	.200 [*]	.983	90	.294
	2AAF/CCI4	.103	90	.019	.942	90	<.001
	SPM-TP 1 jt	.147	90	<.001	.908	90	<.001
	SPM-TP 3 jt	.114	90	.005	.950	90	.002
*. This is a lower bound of the true significance.							
a. Lilliefors Significance Correction							

Kruskal Wallis

Ranks				Test Statistics ^{a,b}	
H_score	Kelompok	N	Mean Rank	H_score	
				Kruskal-Wallis H	47.860
H_score	sehat	90	174.41	df	3
	2AAF/CCI4	90	125.98	Asymp. Sig.	<.001
	SPM-TP 1 jt	90	232.17	a. Kruskal Wallis Test	
	SPM-TP 3 jt	90	189.44	b. Grouping Variable: Kelompok	
Total		360			

Mann Whitney

Ranks					Test Statistics ^a	
H_score	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks	H_score	
					Mann-Whitney U	2736.000
H_score	sehat	90	105.10	9459.00	Wilcoxon W	6831.000
	2AAF/CCI4	90	75.90	6831.00	Z	-3.759
	Total	180			Asymp. Sig. (2-tailed)	<.001
					a. Grouping Variable: Kelompok	
Ranks					Test Statistics ^a	
H_score	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks	H_score	
					Mann-Whitney U	2593.000
H_score	sehat	90	74.31	6688.00	Wilcoxon W	6688.000
	SPM-TP 1 jt	90	106.69	9602.00	Z	-4.168
	Total	180			Asymp. Sig. (2-tailed)	<.001
					a. Grouping Variable: Kelompok	
Ranks					Test Statistics ^a	
H_score	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks	H_score	
					Mann-Whitney U	3645.000
H_score	sehat	90	86.00	7740.00	Wilcoxon W	7740.000
	SPM-TP 3 jt	90	95.00	8550.00	Z	-1.159
	Total	180			Asymp. Sig. (2-tailed)	.247
					a. Grouping Variable: Kelompok	

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
H_score	2AAF/CCI4	90	63.96	5756.00
	SPM-TP 1 jt	90	117.04	10534.00
	Total	180		

Test Statistics^a

	H_score
Mann-Whitney U	1661.000
Wilcoxon W	5756.000
Z	-6.835
Asymp. Sig. (2-tailed)	<.001

a. Grouping Variable:
Kelompok

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
H_score	2AAF/CCI4	90	77.12	6941.00
	SPM-TP 3 jt	90	103.88	9349.00
	Total	180		

Test Statistics^a

	H_score
Mann-Whitney U	2846.000
Wilcoxon W	6941.000
Z	-3.445
Asymp. Sig. (2-tailed)	<.001

a. Grouping Variable:
Kelompok

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
H_score	SPM-TP 1 jt	90	99.43	8949.00
	SPM-TP 3 jt	90	81.57	7341.00
	Total	180		

Test Statistics^a

	H_score
Mann-Whitney U	3246.000
Wilcoxon W	7341.000
Z	-2.300
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021

a. Grouping Variable:
Kelompok

Kelompok Sehat (Perbandingan Antar Zona)

Case Processing Summary

	Zona	Valid		Cases Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
H_Score	Zona 1	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%
	Zona 2	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%
	Zona 3	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%

Descriptives

Zona		Statistic		Std. Error
H_Score	Zona 1	Mean	113.3332	4.14567
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	104.8543
			Upper Bound	121.8120
		5% Trimmed Mean	113.4624	
		Median	114.3674	
		Variance	515.597	
		Std. Deviation	22.70676	
		Minimum	63.77	
		Maximum	167.47	
		Range	103.70	
		Interquartile Range	31.73	
		Skewness	-.190	.427
		Kurtosis	.609	.833
	Zona 2	Mean	108.9790	3.48363
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	101.8542
			Upper Bound	116.1039
		5% Trimmed Mean	109.8291	
		Median	109.4023	
		Variance	364.070	
		Std. Deviation	19.08062	
		Minimum	56.66	
		Maximum	143.16	
		Range	86.50	
		Interquartile Range	19.03	
		Skewness	-.743	.427
		Kurtosis	.855	.833
	Zona 3	Mean	125.7985	4.49803
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	116.5990
			Upper Bound	134.9980
		5% Trimmed Mean	124.9296	
		Median	126.6631	
		Variance	606.969	
		Std. Deviation	24.63674	
		Minimum	78.09	
		Maximum	192.04	
		Range	113.94	
		Interquartile Range	36.08	
		Skewness	.608	.427
		Kurtosis	.447	.833

Tests of Normality

	Zona	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
H_Score	Zona 1	.083	30	.200*	.978	30	.768
	Zona 2	.151	30	.078	.959	30	.292
	Zona 3	.138	30	.152	.964	30	.393

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

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
H_Score	Based on Mean	1.028	2	87	.362
	Based on Median	.998	2	87	.373
	Based on Median and with adjusted df	.998	2	84.580	.373
	Based on trimmed mean	1.052	2	87	.354

ANOVA

H_Score

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4572.383	2	2286.191	4.613	.012
Within Groups	43112.433	87	495.545		
Total	47684.815	89			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: H_Score

Tukey HSD

(I) Zona	(J) Zona	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Zona 1	Zona 2	4.35411	5.74773	.730	-9.3512	18.0594
	Zona 3	-12.46537	5.74773	.082	-26.1707	1.2400
Zona 2	Zona 1	-4.35411	5.74773	.730	-18.0594	9.3512
	Zona 3	-16.81947*	5.74773	.012	-30.5248	-3.1141
Zona 3	Zona 1	12.46537	5.74773	.082	-1.2400	26.1707
	Zona 2	16.81947*	5.74773	.012	3.1141	30.5248

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

H_Score

Tukey HSD^a

		Subset for alpha = 0.05	
Zona	N	1	2
Zona 2	30	108.9790	
Zona 1	30	113.3332	113.3332
Zona 3	30		125.7985
Sig.		.730	.082

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

Kelompok 2AAF/CCl4 (Perbandingan Antar Zona)

Case Processing Summary

		Valid		Cases Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
H_Score	Zona 1	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%
	Zona 2	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%
	Zona 3	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%

Descriptives					
Zona		Statistic		Std. Error	
H_Score	Zona 1	Mean		97.7236	5.24245
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	87.0016	
			Upper Bound	108.4456	
		5% Trimmed Mean		99.6392	
		Median		104.5255	
		Variance		824.497	
		Std. Deviation		28.71406	
		Minimum		2.84	
		Maximum		143.75	
		Range		140.90	
	Interquartile Range		37.22		
	Skewness		-1.288	.427	
	Kurtosis		2.888	.833	
	Zona 2	Mean		101.0734	4.25263
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	92.3757	
			Upper Bound	109.7710	
		5% Trimmed Mean		101.9473	
		Median		107.0550	
		Variance		542.547	
		Std. Deviation		23.29263	
		Minimum		50.74	
		Maximum		138.95	
		Range		88.21	
	Interquartile Range		26.46		
	Skewness		-.852	.427	
	Kurtosis		.183	.833	
	Zona 3	Mean		104.7290	5.73801
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	92.9934	
			Upper Bound	116.4645	
		5% Trimmed Mean		105.3706	
		Median		103.0858	
		Variance		987.743	
		Std. Deviation		31.42838	
		Minimum		2.88	
		Maximum		181.99	
		Range		179.12	
	Interquartile Range		27.01		
	Skewness		-.535	.427	
	Kurtosis		3.566	.833	

Tests of Normality							
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Zona	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
H_Score	Zona 1	.150	30	.081	.913	30	.018
	Zona 2	.159	30	.051	.922	30	.030
	Zona 3	.142	30	.124	.924	30	.035

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal Wallis

Ranks				Test Statistics ^{a,b}	
	Zona	N	Mean Rank	H_Score	
H_Score	Zona 1	30	43.00	Kruskal-Wallis H	.449
	Zona 2	30	46.10	df	2
	Zona 3	30	47.40	Asymp. Sig.	.799
	Total	90			

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
Zona

Kelompok SPM-TP 1 jt (Perbandingan Antar Zona)

Case Processing Summary

	Zona	Valid		Cases Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
H_Score	Zona 1	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%
	Zona 2	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%
	Zona 3	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%

Descriptives

	Zona	Statistic		Std. Error
H_Score	Zona 1	Mean	140.9573	7.90698
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	124.7857
			Upper Bound	157.1289
		5% Trimmed Mean	139.5813	
		Median	127.8750	
		Variance	1875.609	
		Std. Deviation	43.30830	
		Minimum	60.59	
		Maximum	244.01	
		Range	183.41	
		Interquartile Range	60.68	
		Skewness	.690	.427
		Kurtosis	.011	.833
	Zona 2	Mean	135.6745	7.51014
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	120.3146
			Upper Bound	151.0345
		5% Trimmed Mean	132.0357	
		Median	118.0608	
		Variance	1692.068	
		Std. Deviation	41.13475	
		Minimum	100.84	
		Maximum	245.94	
		Range	145.10	
		Interquartile Range	55.65	
		Skewness	1.309	.427
		Kurtosis	.635	.833
	Zona 3	Mean	157.2504	7.96560
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	140.9589
			Upper Bound	173.5419
		5% Trimmed Mean	155.7798	
		Median	151.8513	
		Variance	1903.524	
		Std. Deviation	43.62939	
		Minimum	100.93	
		Maximum	245.47	
		Range	144.54	
		Interquartile Range	87.60	
		Skewness	.409	.427
		Kurtosis	-1.052	.833

Tests of Normality

	Zona	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
H_Score	Zona 1	.167	30	.032	.939	30	.088
	Zona 2	.246	30	<.001	.798	30	<.001
	Zona 3	.118	30	.200 [*]	.928	30	.043

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

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal Wallis

Ranks				Test Statistics ^{a,b}	
	Zona	N	Mean Rank	H_Score	
H_Score	Zona 1	30	44.73	Kruskal-Wallis H	4.918
	Zona 2	30	38.43	df	2
	Zona 3	30	53.33	Asymp. Sig.	.086
	Total	90		a. Kruskal Wallis Test	
				b. Grouping Variable: Zona	

Kelompok SPM-TP 3 jt (Perbandingan Antar Zona):

Case Processing Summary							
		Valid		Cases Missing		Total	
	Zona	N	Percent	N	Percent	N	Percent
H_Score	Zona 1	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%
	Zona 2	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%
	Zona 3	30	100.0%	0	0.0%	30	100.0%

Descriptives

Zona		Statistic		Std. Error
H_Score	Zona 1	Mean	141.5896	9.41191
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	122.3400
			Upper Bound	160.8391
		5% Trimmed Mean	143.7347	
		Median	133.9004	
		Variance	2657.523	
		Std. Deviation	51.55117	
		Minimum	19.01	
		Maximum	231.91	
		Range	212.90	
		Interquartile Range	80.60	
		Skewness	-.429	.427
		Kurtosis	.422	.833
	Zona 2	Mean	106.9581	9.40452
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	87.7237
			Upper Bound	126.1925
		5% Trimmed Mean	106.1033	
		Median	105.9888	
		Variance	2653.348	
		Std. Deviation	51.51066	
		Minimum	25.78	
		Maximum	202.39	
		Range	176.61	
		Interquartile Range	61.68	
		Skewness	.164	.427
		Kurtosis	-.479	.833
	Zona 3	Mean	117.9041	11.02269
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	95.3602
			Upper Bound	140.4480
		5% Trimmed Mean	117.6348	
		Median	119.5978	
		Variance	3644.991	
		Std. Deviation	60.37376	
		Minimum	22.81	
		Maximum	225.47	
		Range	202.67	
		Interquartile Range	110.12	
		Skewness	-.051	.427
		Kurtosis	-1.076	.833

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Zona	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
H_Score	Zona 1	.150	30	.082	.923	30	.032
	Zona 2	.144	30	.117	.934	30	.063
	Zona 3	.160	30	.047	.936	30	.073

a. Lilliefors Significance Correction

Kruskal Wallis

Ranks				Test Statistics ^{a,b}	
		N	Mean Rank	H_Score	
H_Score	Zona 1	30	54.43	Kruskal-Wallis H	6.740
	Zona 2	30	36.93	df	2
	Zona 3	30	45.13	Asymp. Sig.	.034
	Total	90		a. Kruskal Wallis Test	
				b. Grouping Variable: Zona	

Mann Whitney

Ranks

	Zona	N	Mean Rank	Sum of Ranks
H_Score	Zona 1	30	36.63	1099.00
	Zona 2	30	24.37	731.00
	Total	60		

Test Statistics^a

	H_Score
Mann-Whitney U	266.000
Wilcoxon W	731.000
Z	-2.720
Asymp. Sig. (2-tailed)	.007

a. Grouping Variable: Zona

Ranks

	Zona	N	Mean Rank	Sum of Ranks
H_Score	Zona 1	30	33.30	999.00
	Zona 3	30	27.70	831.00
	Total	60		

Test Statistics^a

	H_Score
Mann-Whitney U	366.000
Wilcoxon W	831.000
Z	-1.242
Asymp. Sig. (2-tailed)	.214

a. Grouping Variable: Zona

Ranks

	Zona	N	Mean Rank	Sum of Ranks
H_Score	Zona 2	30	28.07	842.00
	Zona 3	30	32.93	988.00
	Total	60		

Test Statistics^a

	H_Score
Mann-Whitney U	377.000
Wilcoxon W	842.000
Z	-1.079
Asymp. Sig. (2-tailed)	.280

a. Grouping Variable: Zona

Lampiran 5. Bukti Submit Jurnal

The screenshot shows the submission interface of the Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. The header includes the journal name, a 'Back to Submissions' link, and notification icons. The breadcrumb trail indicates the article ID 11334 by Liem et al. on the topic 'Nrf2 vs ROS: Potential Therapeutic Approach on Fighting Liver Fibrosis'. The 'Publication' tab is active, showing the 'Submission' stage. The 'Submission Files' section lists a document titled 'Nrf2 vs ROS- Potential Therapeutic Approach on Fighting Liver Fibrosis.docx' with a file ID of 103796, dated November 30, 2022. A 'Download All Files' button is present. The 'Pre-Review Discussions' section is currently empty, displaying 'No Items'.

Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences

← Back to Submissions

11334 / Liem et al. / Nrf2 vs ROS: Potential Therapeutic Approach on Fighting Liver Fibrosis

Library

Workflow Publication

Submission Review Copyediting Production

Submission Files

103796 Nrf2 vs ROS- Potential Therapeutic Approach on Fighting Liver Fibrosis.docx November 30, 2022 Other

Download All Files

Pre-Review Discussions

Add discussion

Name	From	Last Reply	Replies	Closed
No Items				

Catatan : Jurnal telah terpublikasi

Nrf2 vs ROS: Potential Therapeutic Approach on Fighting Liver Fibrosis

Lenny Setiawati^{1,2,3}, Isabella Kurnia Liem^{1,*}, Firda Asmaul Husna¹

¹*Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia*

²*Master's Programme in Biomedical Sciences Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia*

³*Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Universitas Trisakti, Jakarta, Indonesia*

**Correspondence:* Isabella Kurnia Liem, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, Jl. Salemba 6, Jakarta Pusat 10430, DKI Jakarta, Indonesia. *E-mail:* bellajo04@gmail.com

Abstract

Chronic liver disease (CLD) is a progressive deterioration of the liver due to exposure to viruses, drugs, fat accumulation, and toxicity which lead to an imbalance between extracellular matrix accumulation and degradation. Accumulation of the extracellular matrix is a normal liver response at the beginning of the injury. However, increasing extracellular matrix accumulation leads to fibrosis, cirrhosis, and organ failure. Until today, liver transplant is the gold standard therapy for end-stage CLD. Unfortunately, the liver transplant itself faces difficulties such as finding a compatible donor and dealing with complications after treatment. This review provides further information about Nrf2 as an alternative approach to fight liver fibrosis. Transformation of hepatic stellate cell (HSC) to myofibroblast has been known as the main mechanism that occurs in fibrosis while epithelial-mesenchymal transition (EMT) and mitochondrial dysfunction become the mechanism followed. In these conditions, oxidative stress is the great promoter which builds a vicious cycle leading to CLD progressivity. Hence, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) as antioxidant regulator becomes the potential target to break the cycle. While ROS in oxidative stress induce HSC activation, EMT, and mitochondrial dysfunction through activation of many signaling pathways, Nrf2 acts to diminish ROS directly by regulating secreted antioxidants and its scavenging action. Nrf2 also inactivates fibrosis signaling pathways and plays a role in maintaining mitochondrial health. Therefore, Nrf2 can be a potential target for liver fibrosis therapy.

Keywords: HSC activation, liver fibrosis, mitochondrial dysfunction, Nrf2, ROS

Introduction

The utmost concern about chronic Liver Disease (CLD) is its progressivity leading to fibrosis, cirrhosis, organ failure, and death. Chronic exposure to causative agents such as viruses, drugs, fat accumulation, and toxic substances increases extracellular matrix accumulation more than its degradation, thereby resulting in damage to liver architecture, seen as fibrosis, and impaired liver function which leads to organ failure. Global Burden Disease data in 2017 showed that cirrhosis caused about 2.4% of the total causes of death globally [1]. The data also showed that there was an increase in cirrhosis cases in 2017 by 30.5 million compared to 1990 [1]. Therefore, CLD therapies become urgently needed to improve patients' quality of life. Until now, liver transplant is the gold standard therapy for end-stage CLD, but finding a compatible donor and managing immunogenicity problems still become challenging issues [2].

The question which arises is whether there will be better alternative therapies for inhibiting the progressivity of CLD or even regenerating damaged liver. Therefore, understanding liver fibrosis mechanisms is very important. Prolonged exposure to causative agents on the liver will induce damage-associated molecular patterns (DAMPs) secretion, such as high-mobility-group-box 1 (HMGB1), S100 proteins, and heat shock protein-70 (HSP70) from damaged hepatocytes [3]. In this pattern, HMGB1 is the most studied DAMPs which has a role to promote endothelial-mesenchymal transition

(EndoMT) and thereby become the other source of fibroblast besides hepatic stellate cell (HSC) activation [4]. DAMPs also activate Kupffer cells (KCs) to secrete chemotactic cytokines thus promoting the M1 proinflammatory monocytes recruitment and triggers a T-cell-mediated inflammatory process [5][6].

From causative agent exposure until fibrogenesis, reactive oxygen species (ROS) become the key mediators involved in the mechanism. Damaged hepatocytes will generate ROS which lead to oxidative stress, change the liver microenvironment, and cause mitochondrial dysfunction. Damaged mitochondria will generate more ROS, which makes the damage getting worse. The vicious cycle between ROS, mitochondria dysfunction, and fibrosis will be greater over time unless the cycle is interrupted by an antioxidant system, the anti-ROS. Many studies revealed that the activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), an antioxidant regulator, will reduce ROS, inflammation, and also inhibit the fibrosis signaling pathway. Nrf2 has been reported to have a role in inhibiting HSC activation, epithelial-mesenchymal transition – endothelial-mesenchymal transition (EMT-EndoMT), and mitochondrial dysfunction which are the important events induced by ROS in liver fibrosis (Figure 1) [7].

ROS in HSC Activation and EMT

Until today, HSC activation has been known as the major factor underlying liver fibrosis. For supporting its activation, activated HSC will secrete some other molecules such as all-trans retinoic acid (ATRA), a vitamin A metabolite, and thereby show morphological changes as reduced lipid droplets [8]. Recent studies showed that ATRA mediates crosstalk between HSC, Kupffer Cells, and activated NODD-, LRR-and pyrin domain-containing protein3 (NLRP3) by upregulating ROS levels [8]. Activated HSC also secretes collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1), a positive regulator of transforming growth factor beta (TGF- β) [9], and Kindlin-2, a TGF- β activator, which promote SMAD2/3 phosphorylation [10]. For supporting HSC migration, activated HSC have been known secreting nano-sized fibrogenic vesicles which promote HSC migration through platelet-derived growth factor (PDGF) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling activation as well as autophagy inhibition [11]. This suggests that activated HSC has autocrine effects to promote self-activation.

In normal conditions, ROS and antioxidant levels are balanced in the body. Physiologically, ROS can be generated from the electron transport chain in the mitochondria mainly by complexes I and III. The process of electron transport in mitochondria is mediated by NADPH Oxidase (NOX). Most of the NOX isoforms work by using cytoplasmic NADPH as an electron donor which will produce superoxide anions (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) [12]. In this condition, only a small amount of ROS is generated and plays a beneficial role in signaling pathways. Conversely, in oxidative stress, the increased ROS turns out to be detrimental. Increased ROS favors increased collagen and fibronectin which leads to fibrogenesis [13].

Oxidative stress also occurs in liver fibrosis (Figure.1). The TGF- β pathway has been known as the main pathway to activate HSC. TGF- β activates HSC through the canonical (SMAD2/3 dependent) and non-canonical pathways which interconnect TGF- β with other pathways such as PDGF, nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-KB), mitogen-activated protein kinase (MAPK), and phosphatidylinositol-3-kinase/Akt (PI3K/Akt) [14]. In TGF- β activation, ROS will cause conformational changes on latency-associated peptide (LAP), a protein which inactivates TGF- β , therefore inhibiting the binding between LAP and TGF- β (Figure 2). Free TGF- β will bind to its receptor and activate the TGF- β signaling pathway. Not only triggers TGF- β activation, ROS also amplifies the effect of TGF- β in triggering fibrosis [15]. Furthermore, ROS also affects the upstream gene in the TGF- β pathway. Inhibition Annexin-A2-pseudogene 2 (Anxa2P2) gene [16] and Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 (Igf2bp2) gene [17] have been reported to inhibit the TGF- β pathway and thus attenuate fibrosis. Likewise, inhibition of ROS by exogenous compounds (Daphnetin, Physalin D, and Schisantherin A) has been shown to inhibit the TGF- β pathway, decrease HSC activation, and attenuates fibrosis [18][19][20].

However, other pathways such as PDGF, NF- κ B, Yes-associated protein1 (YAP1), wingless Int (Wnt), and NLRP3 have been reported also be induced by ROS in fibrogenesis [14][17][21][22][23]. PDGF pathway is the important pathway in HSC differentiation and migration. In liver fibrosis, PDGF is highly expressed in macrophages, activated HSC, and injured endothelial cells. ROS will promote PDGF activation by stimulating Src family kinase (SFks) to phosphorylate platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR α) [24]. Increased ROS also maintains the activation of the PDGF pathway, thereby inhibiting HSC autophagy and increasing HSC migration [24].

NF- κ B pathway, which is the main pathway of inflammation, is also influenced by ROS [25]. Activated NF- κ B will mediate the immune response to infection, proliferation, and protection against UV rays. NF- κ B itself is a protein complex consisting of p50 and p65 [25] and degraded in physiologic conditions by its binding with inhibitors of nuclear factor kappa-B kinase (IKK). In oxidative stress, excessive ROS will induce tumor necrosis factor alpha (TNF- α), the strongest activator for NF- κ B activation. ROS also oxidizes the Cys residue on IKK, thus inhibiting its binding to the NF- κ B complex [25][26]. As a result, the NF- κ B complex is free to translocate to the nucleus and becomes the transcription factor (Figure 2).

ROS were also found to activate the Wnt pathway which plays a role in proliferation, regeneration, and cell fate determination, and induce EMT [27][28][29]. Activating the Wnt pathway needs undegraded-B-catenin in the nucleus. Therefore, in oxidative stress, ROS will induce the dissociation of Disheveled (Dvl) protein from Nucleoredoxin (NRX) through Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) activation and oxidized NRX. Free Dvl will be recruited by Frizzled protein to the plasma membrane, allowing Axin and glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3B) to bind and phosphorylate lipoprotein receptor-related proteins 5/6 (LRP5/6), thereby preventing B-catenin degradation. At this time B-catenin will enter the nucleus and activate the antioxidant response element (ARE) [30].

The role of ROS in the fibrosis mechanism is also seen in Hippo/YAP1 signaling pathway. The hippo/YAP1 pathway plays a role in the proliferation and determination of organ size. The hippo pathway can interact with the TGF- β pathway, Wnt/B-catenin pathway, and NF- κ B pathway through the MAPK p38 pathway [31]. Upon activation of the Hippo pathway, YAP1 protein expression is decreased and vice versa. ROS will induce YAP1 protein translocation to the nucleus. In many studies, increased YAP1 activation would lead to increased proliferation and fibrosis through the MAPK p38 pathway while YAP1 depletion would decrease fibrosis [31][32].

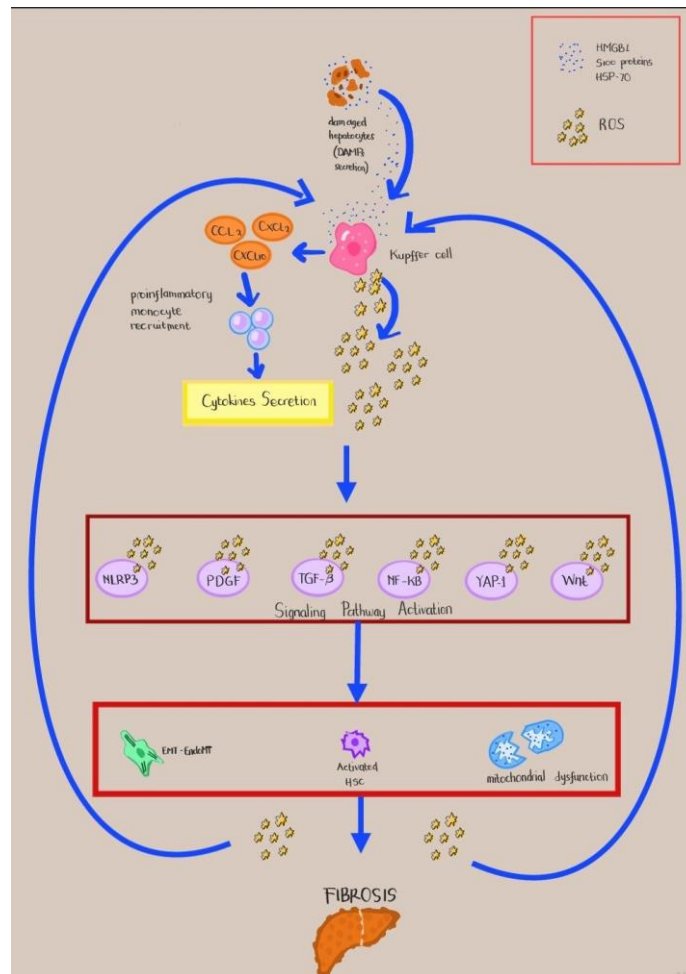


Figure 1. The role of ROS in liver fibrosis

Besides HSC activation, the epithelial or endothelial-to-mesenchymal transition is an important mechanism in fibrogenesis. It has been known that fibroblasts involved in fibrogenesis not only resulted from HSC-myofibroblast transformation but also the transition of hepatocytes and cholangiocytes into mesenchymal type. EMT can be interpreted as a cellular process that occurs when the epithelium or endothelium changes into a mesenchymal phenotype that has mesenchymal-like capacities. In general EMT and EndoMT are similar processes with different origins [33]. The occurrence of EMT and EndoMT can be triggered by hypoxia, growth factors, metabolic changes, immune responses, and cytokines. An excessive free fatty acid found in Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) has been reported to have a great role to induce EMT [29].

In this regard, TGF- β still becomes the main pathway of EMT. TGF- β is a potent inducer of EMT and EndoMT [34]. When TGF- β is activated, not only HSC but also the transition of hepatocytes and cholangiocytes are activated. A recent study confirmed that TGF- β activates EMT through its effect on promoted Y-box binding protein 1 (YB-1) binding to matrix metalloproteinase-9 (MMP9) promoter, thus increased MMP9 expression [35], while other study showed that ROS are the inducer of YB-1 secretion [36]. This relationship shows that when ROS induce TGF- β , ROS also induce YB-1 secretion, but on the other hand TGF- β promotes YB-1 binding to MMP9 promoter. Besides of it, the secretion of ROS-induced chemokine (C-C motif) ligand-1 (CCL1) and its receptor, CXC chemokine receptor-2 (CXCR2), will be increased by active TGF- β . These chemokines have been reported to induce mesenchymal markers such as N-

cadherin, vimentin, and fibronectin, as well as at the same time decrease epithelial marker, E-cadherin [29].

ROS Induce Mitochondrial Dysfunction

The relationship between ROS and mitochondria is well-established. Mitochondria as a power house machine in cells will produce ROS in its regular physiological function in adenosine triphosphate (ATP) production. But, excessive ROS can result from exogenous and endogenous sources. The exogenous sources come from injury-causing agents [37]. The endogenous sources of ROS result from damaged cells, organelles, and also processes inside the body including from mitochondria itself [30]. Increasing ROS will induce lipid peroxidation, mitochondrial damage, and induction of NADPH Oxidase to produce more ROS. Therefore, mitochondrial autophagy (mitophagy) is increased to retain homeostasis. Nevertheless, prolonged increased ROS will lead to mitophagy system failure. ROS will cause lysosomal damage thus mitophagy inhibition has occurred [38][39][40].

Inside mitochondria, excessive ROS will inhibit cytochrome c oxidase which is a transmembrane protein involved in the electron transport chain and ATP production [29]. On the other hand, it also decreases mitochondrial cristae density by decreasing Optic atrophy1 (OPA1) protein, which plays a role in regulating mitochondrial fusion and architecture of the mitochondria cristae [38]. Depletion of OPA1 has been reported to produce more ROS, decrease complex I and IV, and reduce the surface area of the mitochondria inner membrane [38]. Thereby, ATP depletion will occur and give a signal to the body to increase mitochondria biogenesis. Unfortunately, a liver injury will also suppress mitochondria biogenesis, as shown in decreased transcription factor A, mitochondrial (TFAM), the main protein involved in the replication and transcription of the mitochondrial genome expression [38][41].

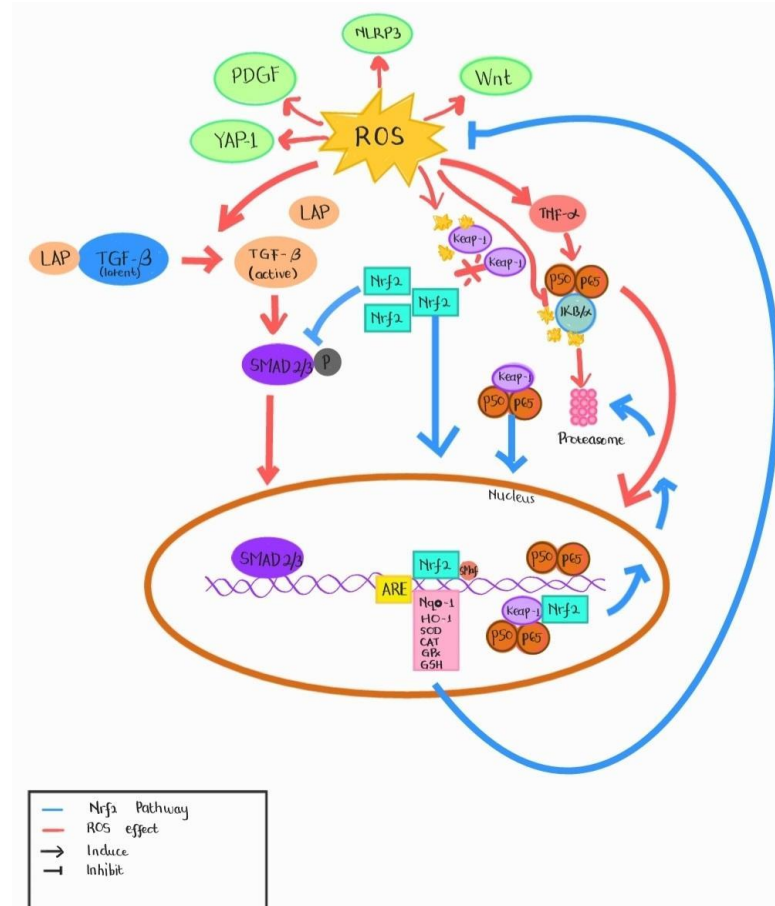


Figure 2. ROS activates TGF- β , NF- κ B, Wnt, PDGF, NLRP3, and YAP1 signaling pathways as well as the Nrf2 pathway. Nrf2 inhibits phosphorylation of SMAD2/3, thus inhibits TGF- β pathway, and acts as a transcription factor for antioxidant defense system regulation which neutralizes ROS directly. Nevertheless, activation NF- κ B also compresses Nrf2 by p50 and p65 binding with Keap1 to deliver Keap1 toward the nucleus and bind with Nrf2. From this mechanism, Nrf2 was released from ARE and was delivered to the cytoplasm toward proteasome degradation.

Nrf2 in General

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is a transcription factor of basic leucine zipper which belongs to the cap'n'collar family. It is encoded by the NFE2-like-BZIP transcription factor2 (NFE2L2) gene and plays an important role in maintaining cellular redox homeostasis, regulating antioxidant expression, anti-inflammatory, and cytoprotective genes [42]. Nrf2 under physiological conditions will be constitutively expressed in the cytoplasm and mostly bound to the Keap1 protein for degradation in the proteasome. Only a small amount of free Nrf2 compensates for physiological ROS levels [43].

Structurally, Nrf2 has 7 domains, namely Neh1 to Neh7 which have different functions. Among the 7 domains, only Neh2 and Neh6 domains are needed for Nrf2 inactivation. Neh2 domain contains the ETGE and DLG motifs used by Nrf2 to bind to the Keap1 protein in the canonical pathway. The Neh6 domain is used by Nrf2 to bind to beta transducin repeat-containing protein (B-TrCP) in a non-canonical pathway [43]. Both Keap1 and B-TrCP are proteins that are negative regulators of Nrf2. However, the Keap1-dependent canonical pathway is the main pathway [43].

Keap1 protein is encoded by the Keap1 gene and has 4 domains including BTB, IVR, CTR, and DGR domains. BTB domain needs for its dimerization, containing a Cys151 residue which is important for stress detection. IVR domain contains two cysteine

residues, Cys273 and Cys288. Both BTB and IVR domains are important in the Nrf2 ubiquitination process as a binding site for CUL3/RBX1 complex [43]. CTR and DGR domains are the two domains that bind to the DLG (low affinity) and ETGE (high affinity) motifs on the Neh2 domain of Nrf2 [43][44].

Through canonical pathways, oxidative stress induces conformational changes of cysteine residues (Cys151, Cys273, Cys288) on Keap1 and leads to inhibition of the Nrf2 binding process. ROS also induces accumulation of p62 protein, an Nrf2 competitor, to bind to Keap1, via p62/SQSTM1, a target gene of Nrf2. The sequestosome (SQSTM1) itself plays a role in directing the degradation of Keap1 [44]. Finally, free Nrf2 will translocate to the nucleus and form heterodimers with a small musculoaponeurotic fibrosarcoma (sMAF) protein and bind to ARE, then activate various antioxidants and phase II enzyme genes including HO-1, NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (Nqo1), glutathione peroxidase (GPx), and superoxide dismutase (SOD) [45][46]. The free Nrf2 has also been known to affect on apoptosis by the expression of B-cell lymphoma2 (Bcl2) and B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xl) proteins that play a role in increasing apoptotic resistance that leads to tumorigenesis [47].

Nrf2 As Regulator of ROS Scavenger

As a master regulator of antioxidants, Nrf2 has a significant role in fighting ROS. ROS will trigger Nrf2 to generate enzymatic and non-enzymatic antioxidants. Enzymatic antioxidants such as SOD, catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) are the first line antioxidants produced. They work to fight ROS by changing ROS into H₂O in multistep processes. When the reduction of one electron from O₂ molecules occurs, superoxide radical (O₂^{•-}) will be generated. SOD will convert O₂^{•-} into H₂O₂ which is the substrate for CAT and GPx. Then, CAT or GPx will turn it into H₂O and O₂.

Non-enzymatic antioxidants such as thioredoxin and glutathione (GSH) are the second line antioxidants produced to suppress the free radical chain reactions. In this case, GSH is a liver highly concentrated antioxidant. During the suppressing process, GSH will give an electron to stabilize ROS and then turn it into oxidized glutathione (GSSG). In this GSH cycle, Nrf2 has a role not only to produce GSH but also to reverse GSSG to GSH through its regulation of the glutathione reductase1 (Gsr1) enzyme. Since GSSG is the oxidized form of GSH, therefore the ratio of GSH/GSSG will determine the oxidative stress states. This is supported by evidence that the decrease in Nrf2 was also followed by a decrease in GSH/GSSG ratio [48].

Nrf2 Inhibit HSC Activation

Nevertheless, Nrf2 has a role to interfere with the TGF- β and NF-KB signaling pathways (Figure 2). Both of them are the main pathways involved in fibrogenesis and inflammation. The TGF- β pathway promotes not only HSC activation but also Nrf2 activation (Figure 2) [49]. The battle between HSC activation and Nrf2 will define the progressivity of fibrosis. When Nrf2 accumulation occurs, Nrf2 will inhibit SMAD2/3 phosphorylation, thus inhibiting the TGF- β canonical pathway [49]. Nrf2 has been reported able to increase SMAD7 expression, a negative regulator of TGF- β , by decreasing the expression of transformation growth factor beta receptor-1 (TGF- β RI). Inhibition of the TGF- β pathway through the activation of SMAD7 by Nrf2 has been shown to reduce the incidence of liver fibrosis [37][50]. However, low Nrf2 has been found in increased hepatic stellate cell activation which is characterized by an increase in alpha-smooth muscle actin (α -SMA), Collagen type I, and IV [49].

So as TGF- β , Nrf2 has been reported as interfering with the NF-KB signaling pathway. NF-KB is an inducible transcription factor which plays a significant role in inflammation and oxidative stress [46]. When ROS are increased, ROS also stimulate Nrf2 activation by changing the Keap1-Nrf2 binding site, then promote increased free Nrf2. Nrf2 has the ability to disrupt the NF-KB pathway by inhibiting phosphorylation of p65, a protein that forms NF-KB complex [23][46], thus preventing NF-KB pathway

activation. This mechanism can decrease TNF- α and stop the NF- κ B activation [46]. Interestingly, a recent study has reported the reason why in NF- κ B activation, Nrf2 is suppressed. This study has found that NF- κ B subunits (p50 and p65) also bind to Keap1 directly. This Keap1-p50/p65 binding will lead to Keap1 translocation into the nucleus and promote dissociation of Nrf2 from ARE (Figure 2). Finally, this will stop the Nrf2 effect and support its degradation [51].

Nrf2 and Mitochondrial Damage

Nrf2 has an important role in maintaining mitochondrial homeostasis. For this purpose, Nrf2 not only reduces ROS directly, but also promotes mitochondrial biogenesis and eliminates damaged-mitochondria through mitophagy. Nrf2 regulates the p62/SQSTM1 and Parkin/PINK1 expression to activate mitophagy [15][52]. Recent studies have shown that Nrf2 not only acts as a positive regulator of p62 and PTEN-induced (PINK1) gene expression but also maintains their basal expression levels. On the other side, Nrf2 also upregulates the mitochondrial biogenesis genes such as mitochondrial associated regulatory factor (Marf), dynamin-related protein 1 (Drp1), and peroxisome proliferators-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), and increases lysosome number needed for mitophagy [15], while knocked out Nrf2 has been reported followed by decrease of mitochondrial membrane potential, so does ATP production. The depletion of ATP production will give a signal to the body to start mitochondrial biogenesis. Nevertheless, the study with Nrf2-knockout-mice also reported a significant decrease in the mitochondrial DNA (mtDNA) copy number, suggesting without Nrf2, mitochondrial biogenesis will be impaired (Figure 3)[25].

Nrf2 and Aggrephagy

In line with the mitophagy in mitochondria, aggrephagy can be determined as a selective autophagy for other damaged-proteins. Aggrephagy has been reported as a protective cellular response to shuttle aggregated proteins from the cytoplasm to lysosomes [53]. In normal condition, Nrf2 degradation is performed by proteasome as a degradation machine. Proteasome is a multiprotein complex consisting of a 20S catalytic core and one or two 19S regulatory subunits which also degrades other proteins. In oxidative stress, redox alteration induce changes in proteasome function, thus proteasome failure might happen. Therefore, accumulating other damaged proteins and Nrf2 happen [54]. While the accumulation of damaged proteins acts as a cell stressor leads to cell necrosis and apoptosis, the accumulation of Nrf2 will activate aggrephagy through aggresome pathway [53]. This aggresome pathway refers to the compensation mechanism which involves the induction of p62 to assemble the polyubiquitinated proteins into micro aggregates through binding to the proteins' ubiquitin chain. As mentioned before, Nrf2 is a competitor and positive regulator of p62. Aggresome formation was found to be decreased when Nrf2 and p62 were downregulated and vice versa. Loss of Nrf2 resulted in aggrephagy failure and cell death. It is suggested that Nrf2-mediated activation p62 was required to decrease proteasomal stress-induced necrosis and apoptosis [53]. In accordance with this Nrf2 role to support autophagy especially aggrephagy, a study by Treger et al showed that decreased autophagy was found in increased NAFLD severity thus aggravating fibrosis [54]. Therefore, the role of Nrf2 in autophagy promotion will improve fibrosis.

Nrf2 in EMT Inhibition

The role of Nrf2 in EMT inhibition is related to the role of Nrf2 to inhibit TGF- β and NF- κ B pathways. The recent study indicates that Nrf2 works to inhibit EMT through

the Notch- TGF- β signaling. It was reported that Nrf2 is a regulator of Notch signaling which was activated by TGF- β in a ROS-dependent manner [34]. A study about the Notch signaling pathway in liver fibrosis shows a close relationship between Notch and fibrosis through increased Notch3 / Jagged1 [55]. This finding is in accordance with the finding from another study which concluded the overexpression of Jagged1 will increase the expression of α -SMA and collagen 1 as well as EMT through TGF- β pathway activation [56]. Furthermore, TGF- β activation will induce activation of NF- κ B through paracrine action in mesenchymal transition [57].

Nrf2 in Detoxification Process

As a vital organ, the liver has a role to neutralize toxic and turn them into undangerous molecules for the body. This function is very important to eliminate toxic or xenobiotic agents and maintain liver health. There are two phases of detoxification held by the liver. Phase I detoxification process consists of oxidation, reduction, and hydrolysis while phase II detoxification process consists of a conjugation process. Both of these phases will result in a water-soluble compound that can be easier removed from the body. For this function, Nrf2 has the role to regulate the expression of the phase II enzymes of detoxification such as Nqo1, SOD, HO-1, as well as CAT and GPx. Stimulation of Nrf2 activation such as stimulation by Physalin A, the main compound of *P. Alkekengi* which often use for the treatment of otitis media, sore throat, and renal disease, leads to the production of phase II enzymes of detoxification processes thus promoting liver detoxification function [58]. A study by et al proved that phase II enzymes of detoxification expression have a role in cytoprotective function which was induced by translocation of Nrf2 through MAPK signaling [59].

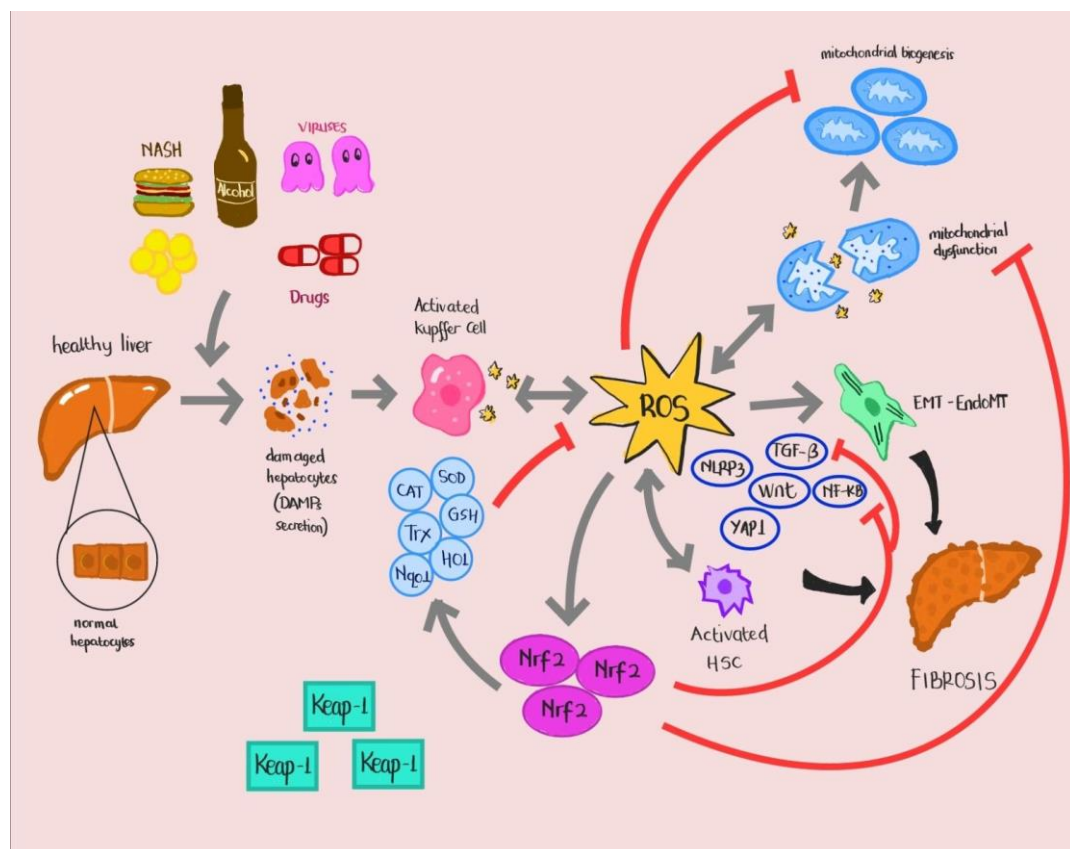


Figure 3. The interplay between ROS, Nrf2, and liver fibrosis. ROS activates HSC, promotes EMT-EndoMT and provokes mitochondrial dysfunction, but at the same time inhibits mitochondrial biogenesis.

Conclusions and Future Direction

Oxidative stress has a significant role to promote liver fibrosis. Nrf2 can promote ROS scavengers activities, interrupt fibrosis major pathways, and induce mitochondrial mitophagy, homeostasis, and biogenesis. Therefore, Nrf2 can be a potential target to fight liver fibrosis. Future studies can be carried out to challenge the Nrf2 effect on liver fibrosis or even liver regeneration.

Acknowledgments

This work was supported by financial support from *Hibah Publikasi Terindeks International (PUTI) Q3 Universitas Indonesia* (Q3 International Indexed Publication Grant of Universitas Indonesia) year 2022.

Conflicts of Interest

The authors have no conflicts to declare.

Abbreviations

Nrf2
Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
ROS
Reactive oxygen species
LAP
Latency-associated peptide
DAMPs
Damage-associated molecular patterns
HMGB1
High mobility group box 1
HSP70
Heat shock protein 70
EMT
epithelial-to-mesenchymal transition
EndoMT
Endothelial-to-mesenchymal transition
HSC
Hepatic stellate cells
PDGF
Platelet-derived growth factor
NF-KB
Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
YAP1
Yes-associated protein 1
YB-1
Y box binding protein-1
Wnt
Wingless Int
TGF- β
Transforming growth factor-beta
MAPK
Mitogen-activated protein kinase
PI3K
Phosphatidylinositol-3-kinase
CTHRC1
Collagen triple helix repeat containing 1
Anxa2P2
Annexin A2 Pseudogene 2
Igf2bp2
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2
IL-6
Interleukin-6
NLRP3
NOD-,LRR- and pyrin domain-containing protein 3
ATP
Adenosine triphosphate
OPA1
Optic atrophy 1
TFAM

Transcription factor A, mitochondrial
 NOX
 Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
 NADPH
 Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
 α -SMA
 Alpha-smooth muscle actin
 IKK
 Inhibitor-KB kinase
 LRP5/6
 Lipoprotein receptor-related proteins 5 and 6
 NFE2L2
 NFE2-like-BZIP transcription factor 2
 Keap1
 Kelch-like ECH-associated protein 1
 sMAF
 Small musculoaponeurotic fibrosarcoma
 B-TrCP
 Beta-transducin repeats-containing proteins
 BTB
 Broad-complex, tramtrack and bric-a-brac
 IVR
 Intervening region
 CTR
 C-terminal region
 DGR
 Double-glycine repeat
 SQSTM1
 Sequestosome1
 PHAR
 (1S,3R,3aR,6aS)-5'-chloro-5-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-1-(1H-indol-3-ylmethyl)spiro[1,2,3a,6a-tetrahydropyrrolo [3,4-c]pyrrole-3,3'-1H-indole]-2',4,6-trione
 HO-1
 Heme-oxygenase 1
 CUL3
 Cullin3-ubiquitin ligase
 RBX1
 Ring box protein 1
 ARE
 Antioxidant response element
 Nqo1
 NAD(P)H quinone dehydrogenase 1
 GPx
 Glutathione peroxidase
 SOD
 Superoxide dismutase
 GSH
 Reduced glutathione
 Bcl2
 B-cell lymphoma 2
 Bcl-xl
 B-cell lymphoma-extra large
 CAT
 Catalase
 Gsr1
 Glutathione reductase 1
 GSSG
 Glutathione disulfide
 PINK1
 PTEN induced kinase 1
 mtDNA
 mitochondrial DNA
 MMP9
 Matrix metalloproteinase-9

References

1. GBD 2017 Cirrhosis Collaborators. The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease

- Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020;5(3):245-66. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30349-8](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30349-8)
2. Craig EV, Heller MT. Complications of liver transplant. *Abdom Radiol (NY)*. 2021;46(1):43-67. <https://doi.org/10.1007/s00261-019-02340-5>
 3. Kuramochi M, Izawa T, Pervin M, Bondoc A, Kuwamura M, Yamate J. The kinetics of damage-associated molecular patterns (DAMPs) and toll-like receptors during thioacetamide-induced acute liver injury in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2016;68(8):471-7. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2016.06.005>
 4. Wei M, Zhang Y, Zhang H, Huang Z, Miao H, Zhang T, et al. HMGB1 induced endothelial to mesenchymal transition in liver fibrosis: The key regulation of early growth response factor 1. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2022;1866(10). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2022.130202>
 5. Han YH, Choi H, Kim HJ, Lee MO. Chemotactic cytokines secreted from kupffer cells contribute to the sex-dependent susceptibility to non-alcoholic fatty liver diseases in mice. *Life Sciences*. 2022;306. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120846>
 6. Dai S, Liu F, Qin Z, Zhang J, Chen J, Ding WX, et al. Kupffer cells promote T-cell hepatitis by producing CXCL10 and limiting liver sinusoidal endothelial cell permeability. *Theranostics*. 2020;10(16):7163-77. <https://doi.org/10.7150/thno.44960>
 7. Shu G, Dai C, Yusuf A, Sun H, Deng X. Limonin relieves TGF- β -induced hepatocyte EMT and hepatic stellate cell activation in vitro and CCl₄-induced liver fibrosis in mice via upregulating Smad7 and subsequent suppression of TGF- β /Smad cascade. *J Nutrition Biochem*. 2022;107. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109039>
 8. Yu Z, Xie X, Su X, Lu H, Song S, Liu C, et al. ATRA-mediated-crosstalk between stellate cells and Kupffer cells inhibits autophagy and promotes NLRP3 activation in acute liver injury. *J Cell Signal*. 2022;93. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110304>
 9. Li J, Wang Y, Ma M, Jiang S, Zhang X, Zhang Y, et al. Autocrine CTHRC1 activates hepatic stellate cells and promotes liver fibrosis by activating TGF- β signaling. *EBioMedicine*. 2019;40:43-55. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.01.009>
 10. Yu J, Hu Y, Gao Y, et al. Kindlin-2 regulates hepatic stellate cells activation and liver fibrogenesis. *Cell Death Discov*. 2018;4(34). <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0095-9>
 11. Gao J, Wei B, de Assuncao TM, Liu Z, Hu X, Ibrahim S, et al. Hepatic stellate cell autophagy inhibits extracellular vesicle release to attenuate liver fibrosis. *J Hepatol*. 2020;73(5):1144-54. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.044>
 12. Burtenshaw D, Hakimjavadi R, Redmond EM, Cahill PA. Nox, Reactive Oxygen Species and Regulation of Vascular Cell Fate. *Antioxidants (Basel)*. 2017;6(4):90. <https://doi.org/10.3390/antiox6040090>
 13. Thannickal VJ, Zhou Y, Gaggari A, Duncan SR. Fibrosis: ultimate and proximate causes. *J Clin Invest*. 2014;124(11):4673-7. <https://doi.org/10.1172/JCI74368>
 14. Han M, Liu X, Liu S, Su G, Fan X, Chen J, et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces hepatic stellate cell (HSC) activation and liver fibrosis in C57BL6 mouse via activating Akt and NF-KB signaling pathways. *Toxicol Lett*. 2017;273:10-9. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.03.013>
 15. Gumeni S, Papanagnou ED, Manola MS, Trougakos IP. Nrf2 activation induces mitophagy and reverses Parkin/Pink1 knock down-mediated neuronal and muscle degeneration phenotypes. *Cell Death Dis*. 2021;12(7):671. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03952-w>
 16. Liao J, Zhang Z, Yuan Q, Luo L, Hu X. The mouse Anxa6/miR-9-5p/Anxa2 axis modulates TGF- β 1-induced mouse hepatic stellate cell (mHSC) activation and CCl₄-caused liver fibrosis. *Toxicol Lett*. 2022;362:38-49. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2022.04.004>
 17. Xu Z, He B, Jiang Y, Zhang M, Tian Y, Zhou N, et al. Igf2bp2 knockdown improves CCl₄-induced liver fibrosis and TGF- β -activated mouse hepatic stellate cells by regulating Tgfr1. *Int Immunopharmacol*. 2022;110. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108987>
 18. Wang H, Che J, Cui K, Zhuang W, Li H, Sun J, et al. Schisantherin A ameliorates liver fibrosis through TGF- β 1 mediated activation of TAK1/MAPK and NF-KB pathways in vitro and in vivo. *Phytomedicine*. 2021;88:23. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153609>
 19. Xiang D, Zou J, Zhu X, Chen X, Luo J, Kong L, et al. Physalin D attenuates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by blocking TGF- β /Smad and YAP signaling. *Phytomedicine*. 2020;78. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153294>
 20. Syed AM, Kundu S, Ram C, Kulhari U, Kumar K, Mugale MN, et al. Up-regulation of Nrf2/HO-1 and inhibition of TGF- β 1/Smad2/3 signaling axis by daphnetin alleviates transverse aortic constriction-induced cardiac remodeling in mice. *Free Radic Biol Med*. 2022;186:17-30. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153294>
 21. Wang Y, Sun Y, Zuo L, Wang Y, Huang Y. ASIC1a promotes high glucose and PDGF-induced hepatic stellate cell activation by inducing autophagy through CaMKK β /ERK signaling pathway. *Toxicol Lett*. 2019;300:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.10.003>
 22. Swiderska-Syn M, Xie G, Michelotti GA, Jewell ML, Premont RT, Syn WK, et al. Hedgehog regulates yes-associated protein 1 in regenerating mouse liver. *Hepatol*. 2016;64: 232-44. <https://doi.org/10.1002/hep.28542>
 23. Accora BZ, Storm G, Bansal R. Inhibition of canonical WNT signaling pathway by B-catenin/CBP inhibitor ICG-001 ameliorates liver fibrosis in vivo through suppression of stromal CXCL12. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864(3):804-18. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.12.001>
 24. Kazlauskas A. PDGFs and their receptors. *Gene*. 2017;614:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.03.003>
 25. Pang Y, Zhang L, Liu Q, Peng H, He J, Jin H et al. NRF2/PGC-1-mediated mitochondrial biogenesis contributes to T-2 toxin-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol and Applied Pharmacology*. 2022;451. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.116167>

26. Arellanes-Robledo J, Reyes-Gordillo K, Ibrahim J, Leckey L, Shah R, Lakshman MR. Ethanol targets nucleoredoxin/dishevelled interactions and stimulates phosphatidylinositol 4-phosphate production in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol.* 2018 Oct;156:135-146. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.021>
27. Qin Q, Yang B, Liu Z, Xu L, Song E, Song Y. Polychlorinated biphenyl quinone induced the acquisition of cancer stem cells properties and epithelial-mesenchymal transition through Wnt/ β -catenin. *Chemosphere.* 2021;263. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128125>
28. Staehlke S, Haack F, Waldner AC, Koczan D, Moerke C, Mueller P, et al. ROS dependent Wnt/ β -catenin pathway and its regulation on defined micro-pillars-A combined in vitro and in silico study. *Cells.* 2020;9(8):1784. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128125>
29. Kwapisz O, Górka J, Korlatowicz A, Kotlinowski J, Waligórska A, Marona P, et al. Fatty Acids and a High-Fat Diet Induce Epithelial-Mesenchymal Transition by Activating TGF β and β -Catenin in Liver Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):1272. <https://doi.org/10.3390/ijms22031272>
30. Rharass T, Lemcke H, Lantow M, Kuznetsov SA, Weiss DG, Panáková D. Ca²⁺-mediated mitochondrial reactive oxygen species metabolism augments Wnt/ β -catenin pathway activation to facilitate cell differentiation. *J Biol Chem.* 2014;289(40):27937-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.573519>
31. Salloum S, Jeyarajan AJ, Kruger AJ, Holmes JA, Shao T, Sojoodi M, et al. Fatty acids activate the transcriptional coactivator YAP1 to promote liver fibrosis via p38 mitogen-activated protein kinase. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2021;12(4):1297-310. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.06.003>
32. Yu H, Yao Y, Bu F, Chen Y, Wu Y, Yang Y, et al. Blockade of YAP alleviates hepatic fibrosis through accelerating apoptosis and reversion of activated hepatic stellate cells. *Mol Immunol.* 2019;107:29-40. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.01.004>
33. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1429-37. <https://doi.org/10.1172/JCI36183>
34. Yazaki K, Matsuno Y, Yoshida K, et al. ROS-Nrf2 pathway mediates the development of TGF β -1-induced epithelial-mesenchymal transition through the activation of Notch signaling. *Eur J Cell Biol.* 2021;100(7). <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2021.151181>
35. Guo Y, Xu X, Dong H, Shen B, Zhu J, Shen Z, et al. Loss of YB-1 alleviates liver fibrosis by suppressing epithelial-mesenchymal transition in hepatic progenitor cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2022;1868(11). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166510>
36. Guarino AM, Troiano A, Pizzo E, Bosso A, Vivo M, Pinto G, et al. Oxidative Stress Causes Enhanced Secretion of YB-1 Protein that Restrains Proliferation of Receiving Cells. *Genes (Basel).* 2018;9(10):513. <https://doi.org/10.3390/genes9100513>
37. Chi Q, Xu T, He Y, Li Z, Tang X, Fan X, et al. Polystyrene nanoparticle exposure supports ROS-NLRP3 axis-dependent DNA-NET to promote liver inflammation. *J Hazard Mater.* 2022;439. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129502>
38. Franquesa AG, Perez PG, Kulis M, Szczepanowska K, Dahdah N, Gomez SM, et al. Remission of obesity and insulin resistance is not sufficient to restore mitochondrial homeostasis in visceral adipose tissue. *Redox Biol.* 2022;54. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102353>
39. Xiao B, Cui Y, Li B, Zhang J, Zhang X, Song M, et al. ROS antagonizes the protection of Parkin-mediated mitophagy against aluminum-induced liver inflammatory injury in mice. *Food Chem Toxicol.* 2022;165. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113126>
40. Yang B, Wang Y, Fang C, Song E, Song Y. Polybrominated diphenyl ether quinone exposure leads to ROS-driven lysosomal damage, mitochondrial dysfunction and NLRP inflammasome activation. *Environ Pollut.* 2022;311. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119846>
41. Chung KW, Dhillon P, Huang S, Sheng X, Shrestha R, Qiu C, et al. Mitochondrial damage and activation of the STING pathway lead to renal inflammation and fibrosis. *Cell Metabolism.* 2019;30(4):784-99.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.003>
42. Meng Q, Chen R, Chen C, Su K, Li W, Tang L, et al. Transcription factors Nrf2 and NF- κ B contribute to inflammation and apoptosis induced by intestinal ischemia-reperfusion in mice. *Int J Mol Med.* 2017;40:1731-40. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3170>
43. Zhou J, Zheng Q, Chen Z. The Nrf2 Pathway in Liver Diseases. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.826204>
44. Poon A, Saini H, Sethi S, O'Sullivan GA, Plun-Favreau H, Wray S, et al. The role of SQSTM1 (p62) in mitochondrial function and clearance in human cortical neurons. *Stem Cell Rep.* 2021;16(5):1276-89. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.03.030>
45. Hao H, Xie F, Xu F, Wang Q, Wu Y, Zhang D. LipoxinA4 analog BML-111 protects podocytes cultured in high-glucose medium against oxidative injury via activating Nrf2 pathway. *Int Immunopharmacol.* 2022;111. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109170>
46. Rubio V, García-Pérez AI, Herráez A, & Díez JC. Different roles of Nrf2 and NF κ B in the antioxidant imbalance produced by esculetin or quercetin on NB4 leukemia cells. *Chem Biol Interact.* 2018;294:158-66. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.08.015>
47. Zhang Q, Zhang ZY, Du H, et al. DUB3 deubiquitinates and stabilizes NRF2 in chemotherapy resistance of colorectal cancer. *Cell Death Differ.* 2019;26:2300-13. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0303-z>
48. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants and Redox Signaling.* 2018;29:1727-45. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>
49. Prestigiacomo V, Suter-Dick L. Nrf2 protects stellate cells from Smad-dependent cell activation. *PLoS One.* 2018;13(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201044>
50. Sa'dyah NAC, Putra A, Dirja BT, Hidayah N, Azzahara SY, Irawan RCS. Suppression of transforming growth factor- β by mesenchymal stem-cells accelerates liver regeneration in liver

- fibrosis animal model. Univ Med. 2021;40(1):29-35. <https://univmed.org/ejurnal/index.php/medicina/article/view/1079> 57
51. Hu B, Wei H, Song Y, Chen M, Fan Z, Qiu R, et al. NF-KB and Keap1 Interaction Represses Nrf2-Mediated Antioxidant Response in Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Infection. *Journal of Virology: Pathogenesis and Immunity*. 2020;94(10). <https://doi.org/10.1128/JVI.00016-20>
 52. Fernandez-Gines R, Encinar JA, Hayes JD, Oliva B, Rodriguez-Franco MI, Rojo AI, et al. An inhibitor of interaction between the transcription factor NRF2 and the E3 ubiquitin ligase adapter B-TrCP delivers anti-inflammatory responses in mouse liver. *Redox Biol*. 2022;55. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102396>
 53. Qin S, Jiang C, Gao J. Transcriptional factor Nrf2 is essential for aggresome formation during proteasome inhibition. *Biomed Rep*. 2019;11(6):241-52. <https://doi.org/10.3892/br.2019.1247>
 54. Galle-Treger L, Helou DG, Quach C. et al. Autophagy impairment in liver CD11c+ cells promotes non-alcoholic fatty liver disease through production of IL-23. *Nat Commun*. 2022;13(1):1440. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29174-y>
 55. Yue Z, Jiang Z, Ruan B, Duan J, Song P, Liu J, et al. Disruption of myofibroblastic Notch signaling attenuates liver fibrosis by modulating fibrosis progression and regression. *Int J Biol Sci*. 2021;17(9):2135-46. <https://doi.org/10.7150/ijbs.60056>
 56. Tang G, Weng Z, Song J, Chen Y. Reversal effect of Jagged1 signaling inhibition on CCl4-induced hepatic fibrosis in rats. *Oncotarget*. 2017;8:60778-88. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18484>
 57. Tian B, Zhao Y, Sun H, Zhang Y, Yang J, Brasier A. BRD4 mediates NF-kB-dependent epithelial-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis via transcriptional elongation. *American Journal of Physiology*. 2016;311(6):L1183-201. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00224.2016>
 58. Shin JM, Lee KM, Lee HJ, Yun JH, Nho CW. Physalin A regulates the Nrf2 pathway through ERK and p38 for induction of detoxifying enzymes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2019;19:101. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2511-y>
 59. Ahn CB, Je JY, Kim YS. et al. Induction of Nrf2-mediated phase II detoxifying/antioxidant enzymes in vitro by chitosan-caffeic acid against hydrogen peroxide-induced hepatotoxicity through JNK/ERK pathway. *Mol Cell Biochem*. 2017;424:79–86. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2845-4>

RIWAYAT HIDUP



1. Nama lengkap : dr. Lenny Setiawati
2. NPM : 2106770574
3. Alamat : Jl. Bedugul NJ/25, Kalideres, Jakarta Barat
4. Umur/kelamin/agama : 39 th/perempuan/katolik
5. Tempat tanggal lahir : Surabaya, 18 Juli 1983
6. Asal instansi : FK Trisakti
7. Alamat instansi : Jl. Kyai Tapa No. 1, Grogol, Jakarta Barat
8. Riwayat Pendidikan :
 - a. SD Sanjaya, Banjarbaru Lulus tahun 1995
 - b. SMP Santa Maria, Banjarmasin Lulus tahun 1998
 - c. SMUK Kolese Santo Yusup Lulus tahun 2001
 - d. S1 Fakultas Kedokteran Trisakti Lulus tahun 2005
 - e. Program Profesi Dokter Lulus tahun 2008
9. Pengalaman kerja :
 - a. Dokter PTT di Puskesmas Sungai Alang 2009 – 2010
 - b. Dokter jaga klinik dan puskesmas 2010 – 2011
 - c. Dokter umum RS Grha Kedoya 2012 – 2015
 - d. Praktek pribadi 2015 – 2021
 - e. Dosen Ikatan Khusus FK Trisakti 2021 – sekarang
10. Biaya penelitian : Hibah PUTI Q3 FK Universitas Indonesia

Jakarta, 19 Juni 2023

dr. Lenny Setiawati

