



UNIVERSITAS INDONESIA

**EFEK FIBROPREVENTIF DAN FIBROLISIS PEMBERIAN
GAMBIR (*Uncaria gambir*) PADA FIBROSIS PARU
TIKUS MODEL**

DISERTASI

**DESDIANI
NPM 1606840424**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
JAKARTA
JULI 2020**



UNIVERSITAS INDONESIA

**EFEK FIBROPREVENTIF DAN FIBROLISIS PEMBERIAN
GAMBIR (*Uncaria gambir*) PADA FIBROSIS PARU
TIKUS MODEL**

DISERTASI

Untuk memperoleh gelar Doktor dalam bidang Ilmu Kedokteran
pada Universitas Indonesia di Jakarta di bawah pimpinan
Rektor Universitas Indonesia Prof. Ari Kuncoro, S.E., M.A., Ph.D.
untuk dipertahankan di hadapan Dewan Penguji
pada Hari Selasa, 28 Juli 2020 pada pukul 10.00–12.00 WIB

DESDIANI

NPM 1606840424

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
JAKARTA
JULI 2020**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Desdiani

NPM : 1606840424

Tanda tangan :

Tanggal : 28 Juli 2020

HALAMAN PENGESAHAN

Disertasi ini diajukan oleh :
Nama : Desdiani
NPM : 1606840424
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Judul Disertasi : Efek Fibropreventif dan Fibrolisis Pemberian Gambir
(*Uncaria Gambir*) pada Fibrosis Paru Tikus Model


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

Dewan Penguji

Promotor : Prof. Dr. dr. Iris Rengganis, Sp.PD-KAI (.....)

Kopromotor :

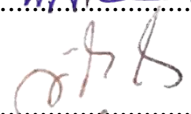
Prof. Dr. dr. Samsuridjal Djauzi, Sp.PD-KAI (.....)


Prof. drh. Agus Setiyono, Ph.D., APVet. (.....)

Tim Penguji:


Prof. Dr. dr. Suhendro, Sp.PD-KPTI (Ketua) (.....)

Prof. dr. Mohammad Sadikin, D.Sc. (Anggota) (.....)

Prof. Dr. dr. Sri Widia A. Jusman, M.S. (Anggota) (.....)

dr. Nurjati Chairani Siregar, M.S., Sp.PA(K), Ph.D. (Anggota) (.....)

Prof. Dr. dr. Suradi, M.A.R.S., Sp.P(K) (Anggota) (.....)

dr. Putri C Eyanoer, M.Epid., Ph.D. (Anggota) (.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 28 Juli 2020

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT sehingga saya dapat menyelesaikan Pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan pada hari ini saya sampai pada tahap ujian promosi. Saya menyadari bahwa apa yang telah saya capai saat ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan banyak pihak, karena itu perkenankan saya mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah berkontribusi.

Kepada Rektor Universitas Indonesia Prof. Ari Kuncoro, S.E., M.A., Ph.D., dan Rektor Universitas Indonesia terdahulu Prof. Dr. dr. Muhammad Anis, M.Met., saya mengucapkan terima kasih atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melanjutkan pendidikan Doktor Ilmu kedokteran di FKUI.

Kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia terdahulu, Prof. Dr. dr. Ratna Sitompul, Sp.M.(K), saya mengucapkan terima kasih kepada beliau yang telah menerima saya sebagai peserta pendidikan Doktor Ilmu Kedokteran FKUI.

Kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Prof. Dr. dr. Ari Fahrial Syam, Sp.PD-KGEH., MMB., FINASIM., FACP., beserta jajaran Dekanat, saya mengucapkan terima kasih atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk dapat menjalani Program Pendidikan S3 Ilmu Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang beliau pimpin.

Kepada Institusi Beasiswa Unggulan Dosen Indonesia (BUDI) yang merupakan sinergi antara Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi (Kemristekdikti) bersama Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP), saya mengucapkan terima kasih atas bantuan biaya Pendidikan Program Studi S3 yang diberikan kepada saya.

Kepada Rektor Universitas Sultan Ageng Tirtayasa Prof. Dr. Soleh Hidayat, M.Pd. (2015–2019) dan Prof. Dr. Fatah Sulaiman, ST, MT., (2019–sekarang), saya mengucapkan terima kasih atas ijin belajar dan dukungan yang diberikan bagi saya sehingga saya dapat menjalani Program Pendidikan S3 Ilmu Kedokteran.

Kepada Prof. Dr. dr. Suhendro, Sp.PD-KPTI selaku Ketua Program Studi Doktor (S3) Ilmu Kedokteran dan Ketua Dewan Penguji, serta dr. Harrina E. Rahardjo,

Sp.U, Ph.D., selaku Sekretaris Program Studi Doktor saya mengucapkan terima kasih karena telah memberikan kesempatan dan waktu agar saya dapat mencari topik riset dan menyusun proposal penelitian sebelum masuk perkuliahan, melakukan fasilitasi, bimbingan hasil penelitian dan mencari solusi setiap kendala yang saya hadapi saat menempuh Program Pendidikan S3 Ilmu Kedokteran. Semoga Allah SWT memberikan berkah dan rahmatNya.

Kepada Prof. Dr. dr. Sarwono Waspadji, Sp.PD-KEMD., selaku Ketua Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran FKUI terdahulu, saya mengucapkan terima kasih atas dedikasinya yang tinggi dan cermat memberikan masukan dalam kaidah penulisan tata Bahasa Indonesia, sehingga disertasi ini dapat ditulis dengan baik. Semoga Allah SWT memberikan berkah dan rahmatNya.

Kepada dr. Alida Roswita Harahap, Sp.PK (K), Ph.D., selaku Penguji Program Studi Doktor FKUI, saya mengucapkan terima kasih atas bimbingan dan masukan beliau dalam penelitian serta membimbing penulisan disertasi. Tidak hanya dalam bidang keilmuan, beliau juga selalu mengikuti, membantu dan mendorong supaya saya bisa selesai tepat waktu. Semoga Allah SWT memberikan berkah dan rahmatNya.

Kepada Prof. Dr. dr. Iris Rengganis, Sp.PD-KAI, saya mengucapkan terima kasih selaku Promotor saya yang dengan sabar selalu membimbing saya mulai dari awal pendidikan saya di Program Studi Doktor FKUI. Di tengah kesibukannya beliau selalu meluangkan waktu untuk mendengarkan keluhan dan mencari solusi atas masalah yang saya hadapi saat menempuh Pendidikan S3. Rasa hormat, kagum dan terima kasih yang tidak terhingga saya ucapkan kepada beliau karena beliau tidak hanya mentransfer ilmu pengetahuan tetapi beliau juga memberikan semangat dan kemudahan kepada saya dalam melaksanakan penelitian S3 saya. Semoga Allah SWT memberikan berkah dan rahmatNya.

Kepada Kopromotor saya Prof. Dr. dr. Samsuridjal Djauzi, Sp.PD-KAI, saya mengucapkan terima kasih atas kesediaan beliau menjadi pembimbing/promotor awal saya, senantiasa mendukung dan memberikan bimbingan serta semangat kepada saya selama menjalani pendidikan doktoral. Beliau juga membimbing saya dalam memahami peran imunologi yang digunakan pada penelitian S3 saya. Semoga Allah SWT memberikan berkah dan rahmatNya.

Kepada Kopromotor Prof. drh. Agus Setiyono, Ph.D., ApVet., wakil dekan 1 Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, saya sampaikan rasa hormat dan terima kasih atas kesediaan beliau membimbing dan mengajarkan saya mengenai penelitian dengan menggunakan hewan coba dan membimbing dalam interpretasi pemeriksaan histopatologi, serta memberikan semangat sejak awal pendidikan S3, senantiasa memberikan waktu untuk bimbingan hingga saya dapat menyelesaikan pendidikan doktoral ini. Semoga Allah SWT memberikan berkah dan rahmatNya.

Ucapan terima kasih sebesar-besarnya saya sampaikan kepada dr. Nurjati Chairani Siregar, M.S., Sp.PA (K), Ph.D., saya sampaikan rasa hormat dan terima kasih atas kesediaan beliau membimbing saya di tengah kesibukan beliau. Beliau membimbing secara menyeluruh dalam penyelesaian analisis hasil penelitian, tidak hanya mentransfer ilmu pengetahuan bidang patologi anatomi namun beliau juga memberikan semangat untuk menyelesaikan pendidikan doktoral ini. Semoga Allah SWT memberikan berkah dan rahmatNya.

Kepada Prof. Dr. dr. Sri Widia A Jusman, M.S. saya sampaikan terima kasih yang telah banyak memberikan bimbingan dalam bidang biokimia dan mendorong untuk mengembangkan bioinformatika bahan yang saya teliti. Beliau selalu menyediakan waktu di antara kesibukannya untuk berdiskusi dan memberikan masukan yang sangat penting dalam penelitian ini. Semoga Allah SWT memberikan berkah dan rahmatNya.

Kepada Prof. dr. Mohamad Sadikin. D.Sc., saya sampaikan terima kasih yang telah memberikan ide penelitian S3 saya, membimbing setiap tahap pelaksanaan penelitian, senantiasa mendukung dan memberikan bimbingan dan ide-ide baru yang membantu dalam proses analisis hasil penelitian. Bahkan beliau mendorong saya untuk melanjutkan penelitian ini sampai tahap uji klinis. Semoga Allah SWT memberikan berkah dan rahmatNya.

Kepada Prof. Dr. dr. Suradi, Sp.P(K), M.A.R.S. dari Fakultas Kedokteran Universitas Negeri Sebelas Maret Surakarta, saya haturkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas bimbingan beliau dalam bidang pulmonologi dan patofisiologi fibrosis paru, selalu memberikan dukungan dan bimbingan selama

saya melakukan penelitian sampai menyelesaikan disertasi ini. Semoga Allah SWT memberikan berkah dan rahmatNya.

Kepada dr. Putri C Eyanoe, M.Epid., Ph.D. dari Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. Rasa terima kasih sebesar besarnya kepada beliau yang sudah memberikan bimbingan di bidang statistik penelitian doktor saya, memberikan solusi terhadap kendala yang saya hadapi selama menjalani pendidikan S3. Semoga Allah SWT memberikan berkah dan rahmatNya.

Kepada Prof. dr. Faisal Yunus, Sp.P (K), Ph.D. guru besar Departemen Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi FKUI, saya mengucapkan terima kasih karena sudah membimbing saya selama pendidikan spesialisasi di FKUI dan memberikan rekomendasi kepada saya untuk melanjutkan pendidikan S3 di FKUI. Semoga Allah SWT memberikan berkah dan rahmatNya.

Kepada Prof. Dr. dr. H. Idris Idham, Sp. JP(K), saya mengucapkan terima kasih karena telah banyak membantu saya dalam menyelesaikan pendidikan spesialis serta memberikan rekomendasi untuk melanjutkan pendidikan S3 di FKUI. Semoga Allah SWT memberikan beliau sekeluarga berkah dan rahmatNya.

Kepada dr. Dianiati Kusumo Sutoyo, Sp.P(K) dan Dr. dr. Mukhtar Ikhsan, Sp.P(K), M.A.R.S., saya mengucapkan terima kasih karena sudah membimbing saya selama pendidikan spesialisasi di FKUI. Semoga Allah SWT memberikan berkah dan rahmatNya.

Kepada Prof. dr. Tamsil Syafiuddin, Sp. P(K) dari FK USU, saya mengucapkan terima kasih yang tak terhingga atas dukungan dan perjuangan beliau sehingga saya bisa menyelesaikan pendidikan spesialis paru. Semoga beliau sekeluarga selalu dalam limpahan berkah dan rahmat dari Allah SWT.

Kepada Dr. dr. Amira Permatasari Tarigan Sp.P (K), dari FK USU, saya mengucapkan terima kasih yang tak terhingga atas dukungan dan perjuangan beliau sehingga saya bisa menyelesaikan pendidikan spesialis paru. Rasa sayang dan dorongan yang beliau berikan kepada saya, membuat semangat saya semakin tinggi untuk melanjutkan pendidikan sampai jenjang S3. Semoga beliau sekeluarga selalu dalam limpahan berkah dan rahmat dari Allah SWT.

Kepada Dr. Sri Ningsih, M.Si., Apt saya mengucapkan terima kasih atas kontribusi beliau dalam penelitian S3 saya, membantu ketersediaan bahan ekstrak gambir, dan membantu penyiapan suspensi gambir di laboratorium PUSPIPTEK Serpong. Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada Dr. Drs. Kusmardi, M.Sc. yang telah membantu interpretasi dalam analisis program *image J*. Saya mengucapkan terima kasih kepada asisten penelitian yang telah banyak membantu saya, drh. Dedi Nur Aripin, S.M. Leluala, S.K.H. dari UPHL FKH IPB dan dr. Chairul Nurdin mulai dari awal penelitian, pelaksanaan hingga penyampaian disertasi saya saat ini semoga kalian semua memperoleh kemudahan dalam melanjutkan pendidikan dan karir dimasa yang akan datang.

Kepada Prof. Dr. dr. Saptawati Bardosono, M.Sc., Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Ageng Tirtayasa Banten, saya mengucapkan terima kasih karena selalu memberi dukungan dan semangat kepada saya untuk menyelesaikan penelitian S3 di sela-sela bertugas sebagai wakil dekan bidang akademik dan kemahasiswaan.

Kepada teman-teman sejawat dari Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Ageng Tirtayasa Banten terutama dr. Siti Darifah, M.K.K., teman dan sahabat yang membantu perjuangan saya dalam mendirikan FK Untirta, dan selalu mendukung serta memberi semangat kepada saya selama bekerja dan menyelesaikan penelitian S3 ini. Ucapan terimakasih saya sampaikan ke seluruh teman-teman seangkatan S3 Kedokteran FKUI (Sunshiners), semoga kita semua berhasil.

Kepada guru-guru saya yang telah mendidik saya mulai dari SD, MTs Darunnajah, SMA Vidatra, para dosen di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Program Magister Kedokteran Okupasi FKUI, Program Spesialisasi Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran FKUI dan FK USU, saya ucapkan terimakasih sebesar-besarnya.

Kepada yang tercinta kedua orang tua saya, ayahanda (papa) Ir. Muchlis Anis, BcM dan almarhumah ibunda (mama) Nurleili, BA. Pencapaian pendidikan saya ini saya persembahkan untuk almarhumah ibunda saya tercinta karena kasih sayang dan pengorbanan beliau. Tidak ada ungkapan yang cukup dan sepadan dengan semua yang sudah diberikan kepada Ananda selama ini. Kasih sayang dan semua ajaran serta nasihat dari papa mama sejak kecil akan menjadi semangat dan motivasi dalam

hidup ananda. Semangat untuk menimba ilmu sampai ketinggian pendidikan tertinggi, mandiri, kerja keras, tidak pernah meninggalkan ibadah, selalu berserah diri kepada Allah SWT, pandai bersyukur atas segala pemberian-Nya dan banyak lagi hal baik yang mama dan papa ajarkan sehingga ananda bisa menjadi seperti sekarang ini. Hanya rasa syukur dan terima kasih yang tidak terhingga serta doa yang mampu ananda berikan, semoga papa senantiasa diberikan kesehatan dan kebahagiaan dan almarhumah mama diberikan tempat terbaik oleh Allah SWT. Ananda senantiasa mengharapkan doa dan restu agar mampu menjaga amanah dari Allah SWT.

Kepada yang tercinta almarhum bapak mertua Sjahbunan dan ibu mertua Zuraida, saya mengucapkan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya atas segala bentuk bantuan, dukungan dan kasih sayang yang selalu diberikan kepada saya sehingga memberikan kekuatan untuk menjalani pendidikan ini. Semoga almarhum bapak mendapatkan tempat terbaik di sisi Allah SWT.

Terima kasih juga saya ucapkan kepada saudara sekandung saya Rini Viatri, S.E., Ichwan, S.T., Istin, S.Ked., atas segala dukungan semangat dan bantuan serta doa yang diberikan selama ini. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan berkah dan karunia-Nya kepada kakak dan adik-adikku beserta keluarganya.

Kepada suami saya tercinta, Ir. Chandra Syahbunan, M.S.M., saya mengucapkan rasa syukur yang mendalam pada Allah SWT karena sudah diberikan seorang suami yang selalu mendukung, memberikan perhatian, kasih sayang, kesabaran dan merelakan berkurangnya waktu bersama. Terima kasih dan penghargaan yang tinggi saya sampaikan untuk semua kebaikan dan toleransi selama ini. Semoga Allah SWT senantiasa melindungi keluarga kita.

Untuk anak-anakku tercinta, Ananda Khansa Kiasati Chandra Syahbunan, Afra Ghaisani Chandra Syahbunan, Rousan Chandra Syahbunan yang selalu membantu dan memberi semangat bunda, tidak terhitung ungkapan maaf, karena sering mengorbankan waktu kebersamaan selama menyelesaikan pendidikan ini. Semoga ananda semua menjadi anak yang sholeh, solehah dan cerdas, selalu diberikan kemudahan dan perlindungan Allah SWT dalam menggapai cita-cita dan menjalani kehidupan ini.

Kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah membantu dan mendukung saya selama pendidikan dan penelitian hingga penyampaian disertasi ini, saya ucapkan terima kasih atas semua bentuk bantuan yang telah diberikan. Semoga semua kebaikan mendapat balasan yang berlipat ganda dari Allah SWT.

Akhir kata, segala puji bagi Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang. Semoga Allah SWT senantiasa menjaga iman kita dan melimpahkan rahmat dan hidayahNya kepada kita semua. Aamiin Yaa Rabbalaalamiin.

Wassalamualaikum Wr Wb

28 Juli 2020

Desdiani

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

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

Nama : Desdiani
NPM : 1606840424
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas : Kedokteran
Jenis karya : Disertasi

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 Fibropreventif dan Fibrolisis Pemberian Gambir (*Uncaria gambir*) pada Fibrosis Paru Tikus Model

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 memublikasikan 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 : 28 Juli 2020

Yang menyatakan

(Desdiani)

ABSTRAK

Nama : Desdiani
Program Studi : Program Doktor Ilmu Kedokteran
Judul Disertasi : Efek Fibropreventif dan Fibrolisis Pemberian Gambir
(*Uncaria gambir*) pada Fibrosis Paru Tikus Model

Fibrosis paru adalah terbentuknya jaringan parut yang melibatkan infiltrasi sel inflamasi, proliferasi fibroblas, *reactive oxygen species* (ROS) serta penumpukan matriks ekstraselular berlebihan di jaringan parenkim paru dan mengganggu fungsi paru. Prevalensi penyakit fibrosis paru di Indonesia mencapai 6,26–7,73 per 1.000.000 penduduk namun hanya 700–1500 penderita yang terdeteksi karena penatalaksanaan belum maksimal. *Uncaria gambir* adalah tanaman lokal Indonesia mengandung flavonoid (+)-katekin yang memiliki aktivitas antioksidan kuat. Sangat mungkin gambir dapat dimanfaatkan sebagai antifibrosis paru.

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental analitik acak pada 10 kelompok hewan coba tikus dilakukan di UPHL FKH IPB, Patologi FKH IPB pada bulan September 2018–Maret 2019. Subjek penelitian adalah 10 kelompok tikus jantan model dengan berat badan sekitar 200–250 g dan berusia 10 minggu. Dosis bleomisin 4 mg/kg BB secara intratrakeal dan dosis gambir 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB peroral, dan dosis teh hijau sebagai pembanding positif adalah 125 mg/kg BB peroral.

Seluruh hewan coba diterminasi pada akhir minggu ke-7 atau hari ke-50. Organ paru yang telah bersih diambil sebagian untuk analisis sel inflamasi, kadar TGF- β 1 dalam cairan BAL dengan metode ELISA, kolagen tipe I dan TIMP-1 secara imunohistokimia (IHK) dan aktivasi NF- κ B secara ELISA dan *western blott*. Gambaran histopatologi terberat berdasarkan skor modifikasi Ashcroft terlihat pada kelompok bleomisin dan terendah terlihat pada kelompok fibrolisis gambir dosis 262. Terdapat perbedaan bermakna hitung sel radang BAL (uji kruskal wallis, $p = 0,017$). Tidak didapatkan perbedaan bermakna kadar TGF- β 1 (uji kruskal wallis, $p = 0,117$), kadar NF- κ B (uji kruskal wallis, $p = 0,134$), ekspresi TIMP-1 (uji kruskal wallis, $p = 0,31$) dan kolagen I (uji kruskal wallis, $p = 0,168$). Pemeriksaan *western blot* menunjukkan kelompok fibropreventif dan fibrolisis gambir terlihat di band spesifik ukuran p65.

Disimpulkan kelompok fibrolisis gambir dosis 262 mengalami perbaikan gambaran histopatologi modifikasi skor Ashcroft derajat 3, penurunan jumlah sel radang, kadar TGF- β 1, TIMP-1 dan NF- κ B yang berperan dalam terbentuknya fibrosis. Pemberian gambir dosis 262 mg/kg BB dapat mengurangi fibrosis dengan melisiskan ECM pada paru hewan coba.

Kata Kunci : fibrolisis, fibropreventif, gambir, modifikasi skor aschroft, sel inflamasi

ABSTRACT

Nama : Desdiani
Program Studi : Medical Science Doctoral Program
Judul Disertasi : Effects of Fibropreventive and Fibrolysis of Gambir
(*Uncaria gambir*) in Rat Model of Lung Fibrosis

Pulmonary fibrosis is a condition of scar tissue formation involving inflammatory cells infiltration, fibroblasts proliferation, reactive oxygen species (ROS), and excessive extracellular matrix accumulation in the pulmonary parenchymal tissue which can inhibit pulmonary function. The prevalence of pulmonary fibrosis in Indonesia reached 6.26–7.73 per 1,000,000 population and was predicted to increase. Only around 700–1500 patients were detected due to a lack of treatment. *Uncaria gambir* is Indonesian local plants contains flavonoid (+)-catechin, known for its strong antioxidant activity and gambir is expected to prevent pulmonary fibrosis.

Random *in vivo* analytical study with an experimental design was performed on ten groups of rats in the Laboratory of Surgery Section of the Faculty of Veterinary Medicine, Bogor Agricultural University from September 2018–2019 analyzed the effect of anti-fibrosis from gambir on rats with bleomycin-induced fibrosis. The subjects were 10 groups of male rats, each consisted of three 10-week-old rats, weighing around 200–250 g. The dose of bleomycin used was 4 mg/kg body weight, given intratracheally. The doses of gambir given were 65 mg, 131 mg, and 262 mg/kg body weight orally.

All animal models were terminated at the end of week 7 or day 50 clean pulmonary organ, was taken for analysis of inflammatory cells, TGF- β 1 level in BAL using the ELISA method, type I collagen, TIMP-1 using immunohistochemistry (IHC), and NF- κ B activation using the ELISA and western blot methods. The most severe histopathological characteristic based on modified Ashcroft score was seen in Bleomycin group, while the lowest was in fibrolysis gambir 262 mg. Statistical test results showed a significantly different BAL inflammatory cell count ($p = 0.017$; $p < 0.05$). There was insignificant difference in TGF- β 1 level ($p = 0.117$; $p > 0.05$), NF- κ B ($p = 0.134$; $p > 0.05$), expression of TIMP-1 ($p = 0.31$; $p > 0.05$), and collagen I ($p = 0.168$; $p > 0.05$). Western blot assay showed that the fibropreventive and fibrolysis of gambir was found in p65 specific band.

Fibrolysis gambir 262 mg/kg body weight showed improvement of histopathological characteristic based on the modified Ashcroft (3rd degree), reduction in the number of BAL inflammatory cells, levels of TGF- β 1, TIMP-1 and NF- κ B that played a role in the formation of fibrosis, causing degradation of ECM in lung animal models.

Keywords: fibrolysis, fibropreventive, gambir, inflammatory cells, modified Ashcroft

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
DAFTAR ISI	xvii
DAFTAR GAMBAR	xx
DAFTAR TABEL	xxiii
DAFTAR LAMPIRAN	xxiv
DAFTAR SINGKATAN	xxv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Pertanyaan Penelitian	4
1.4 Hipotesis.....	5
1.5 Tujuan Penelitian	5
1.5.1 Tujuan Umum.....	5
1.5.2 Tujuan Khusus	6
1.6 Manfaat Penelitian	6
1.6.1 Akademik	6
1.6.2 Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Mekanisme Fibrosis pada Paru	7
2.1.1 Peran Mediator Inflamasi pada Fibrosis Paru	10
2.1.2 Faktor-faktor yang Memengaruhi Sel Epitel, Diferensiasi dan Proliferasi Fibroblas	12
2.2 Peran TGF- β 1 dalam Fibrosis	15
2.2.1 Mekanisme Aktivasi TGF- β 1	16
2.2.2 Sinyal TGF- β 1: Jalur <i>Smad-dependent</i> dan <i>Smad-independent</i>	18
2.2.3 Efek TGF- β 1 pada Fungsi dan Fenotip Fibroblas.....	20
2.3 Mekanisme Matriks Ekstraselular pada Fibrosis	20
2.3.1 Komposisi Matriks Ekstraselular pada Fibrosis	21
2.3.2 Jalur Ekstraselular dan Intraselular Degradasi Matriks Ekstraselular	22
2.3.3 Degradasi Miofibroblas.....	23
2.3.4 Peran <i>Dedifferentiation</i> dalam Degradasi Miofibroblas	24
2.4 Pengaruh Anti TGF- β 1 pada Paru yang Mengalami Fibrosis serta Pencegahannya.....	26
2.5 Peran NF- κ B dalam Sistem Regulator Sistem Imunitas dan Respons Inflamasi	26
2.6 Gambir sebagai Antioksidan dan Anti Inflamasi	29

2.7	Bleomisin sebagai Induksi Fibrosis Paru.....	34
2.8	Model Hewan pada Fibrosis Paru.....	37
2.9	Kerangka Teori.....	40
2.10	Kerangka Konsep.....	41
BAB 3 METODE PENELITIAN.....		43
3.1	Desain Penelitian.....	43
3.2	Perkiraan Besar Sampel.....	44
3.3	Lokasi dan Waktu Penelitian.....	44
3.4	Bahan dan Cara Kerja.....	44
3.5	Alur Penelitian.....	53
3.5.1	Tahap I.....	53
3.5.2	Tahap II.....	54
3.6	Etika Penelitian.....	55
3.7	Variabel Penelitian.....	55
3.8	Definisi Operasional.....	55
3.9	Analisis Data.....	56
BAB 4 HASIL PENELITIAN.....		57
4.1	Perbandingan Pemberian Bleomisin Secara Intratrakeal dan Intrapleural terhadap Kejadian Fibrosis.....	57
4.2	Karakteristik Subjek Penelitian.....	58
4.3	Analisis Hitung Jenis Sel Radang antara Kelompok Kontrol, Pembanding Positif dan Gambir Fibropreventif /Fibrolisis.....	61
4.3.1	Hitung Hitung Jenis Sel Radang Pembanding Positif dan Kontrol.....	61
4.3.2	Hitung Jenis Sel Radang Gambir dan Kontrol.....	62
4.3.3	Hitung Jenis Sel Radang Gambir dan Pembanding Positif.....	63
4.4	Analisis kadar TGF- β 1 antara Kelompok Kontrol, Pembanding Positif dan Gambir Fibropreventif /Fibrolisis.....	64
4.4.1	Kadar TGF- β 1 antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif.....	64
4.4.2	Kadar TGF- β 1 antara Kelompok Kontrol dan Gambir.....	64
4.4.3	Kadar TGF- β 1 antara Pembanding Positif dan Gambir.....	65
4.5	Analisis kadar NF- κ B antara Kelompok Kontrol, Pembanding Positif dan Gambir Fibropreventif /Fibrolisis.....	66
4.5.1	Kadar NF- κ B antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif.....	66
4.5.2	Kadar NF- κ B antara Kelompok Kontrol dan Gambir.....	67
4.5.3	Kadar NF- κ B antara Kelompok Pembanding Positif dan Gambir.....	67
4.6	Analisis Ekspresi TIMP-1 dengan <i>Image J</i> dalam Persentase Area Fibrosis Paru antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif.....	68
4.6.1	Ekspresi TIMP-1 antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif ..	68
4.6.2	Ekspresi TIMP-1 antara Kelompok Kontrol dan Gambir.....	69
4.6.3	Ekspresi TIMP-1 antara Kelompok Pembanding Positif dan Gambir ..	70
4.7	Analisis Ekspresi Kolagen I dengan <i>Image J</i> dalam Persentase Area Fibrosis Paru antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif.....	71
4.7.1	Ekspresi Kolagen I antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif.....	71
4.7.2	Ekspresi Kolagen I antara Kelompok Kontrol dan Gambir.....	71
4.7.3	Ekspresi Kolagen I antara Kelompok Pembanding Positif dan Gambir.....	72

4.8	Delta Nilai Hitung Jenis Sel Radang, Kadar TGF- β 1 BAL, NF- κ B Jaringan Paru, Ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I.....	73
4.9	Gambaran Histopatologi Jaringan Paru dengan Pewarnaan Hematoksilin-Eosin dan Masson-Trichome	75
4.10	Ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I dengan Pemeriksaan Imunohistokimia	80
4.11	Analisis NF- κ B dengan Pemeriksaan <i>Western Blott</i>	84
4.12	Rangkuman Hasil Penelitian	84
BAB 5 PEMBAHASAN		87
5.1	Gambaran Histopatologi Pemberian Bleomisin Secara Intratrakeal dan Intrapleural terhadap Kejadian Fibrosis	87
5.2	Karakteristik Subjek Penelitian.....	87
5.3	Jumlah Sel Radang Kelompok Kontrol, Perbandingan Positif dan Gambir	89
5.4	Kadar TGF- β 1 Kelompok Kontrol, Perbandingan Positif dan Gambir	90
5.5	Kadar NF- κ B Kelompok Kontrol, Perbandingan Positif dan Gambir	92
5.6	Ekspresi TIMP-1 Kelompok Perbandingan Positif dan Gambir.....	94
5.7	Ekspresi Kolagen I Kelompok Perbandingan Positif dan Gambir.....	96
5.8	Gambaran Histopatologi Jaringan Paru dengan Pewarnaan Hematoksilin-Eosin dan Masson-Trichome berdasarkan Skor Modifikasi Ashcroft.....	97
5.9	Interaksi Gambir dan NF- κ B dengan Metode <i>Western Blott</i>	98
BAB 6 SIMPULAN DAN SARAN.....		101
6.1	Simpulan	101
6.2	Saran.....	101
RINGKASAN		103
SUMMARY.....		112
DAFTAR PUSTAKA		119
DAFTAR LAMPIRAN		130
DRAFT MANUSCRIPT.....		
DAFTAR RIWAYAT HIDUP		175

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Gangguan Proses Penyembuhan Luka Normal dan Perkembangan Fibrosis Paru	8
Gambar 2.2.	Stimulasi Mediator Proinflamasi dan Profibrotik pada Proses Fibrosis.....	10
Gambar 2.3.	Peran Subset Khusus Sel T Helper dan Makrofag pada Fibrosis Paru	12
Gambar 2.4.	Perubahan Intrinsik Aktivasi Sel Epitel dan Fibroblas pada Fibrosis.....	13
Gambar 2.5.	Interaksi Fibroblas dan Epitelial pada IPF.....	14
Gambar 2.6.	Mekanisme Aktivasi <i>Latent</i> TGF- β 1 (TGF- β 1 -LAP)	16
Gambar 2.7.	Mekanisme Aktivasi TGF- β 1	17
Gambar 2.8.	Jalur Sinyal TGF- β 1	19
Gambar 2.10.	Internalisasi Kolagen Jalur Makropinositik, Fagositik, dan Endositik Fragmen	23
Gambar 2.11.	Struktur NF- κ B	27
Gambar 2.12.	Jalur Kanonik dan Non-kanonik NF- κ B.....	28
Gambar 2.13.	Struktur Gambir-Katekin	31
Gambar 2.14.	Peran Utama Antioksidan pada Patogenesis IPF.....	33
Gambar 2.15.	Gambaran Histopatologi Perubahan Fibrosis pada Paru Tikus Usia 2,5 bulan setelah Pemberian Bleomisin.....	36
Gambar 2.16.	Perubahan Histopatologi Paru Pasca Pemberian Bleomisin 5 mg/kg BB	36
Gambar 2.17.	Gambaran Fibrosis Paru dengan Modifikasi Skala Ashcroft.	39
Gambar 2.18.	Kerangka Teori Peran Gambir pada Fibrosis Paru Hewan Model Diakibatkan Bleomisin.....	40
Gambar 2.19.	Kerangka Konsep Peran Gambir Fibropreventif dan Fibrolisis pada Fibrosis Paru Hewan Model Diakibatkan Bleomisin	41
Gambar 3.1.	Skema Pengujian Antifibrosis <i>In Vivo</i> pada Kelompok Penelitian.....	49
Gambar 3.2.	Alur Penelitian Tahap I.....	53
Gambar 3.3.	Alur Penelitian Tahap II	54
Gambar 4.1.	Perubahan Histopatologi Jaringan Paru akibat Pemberian Bleomisin Intratrakeal.....	57
Gambar 4.2.	Perubahan Histopatologi Jaringan Paru akibat Pemberian Bleomisin Intrapleural	58

Gambar 4.3.	Gambaran Makroskopis Jaringan Paru pada Subjek Penelitian....	60
Gambar 4.4.	Perbandingan Jumlah Sel Radang antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif.....	61
Gambar 4.5.	Perbandingan Jumlah Sel Radang antara Kelompok dan Gambir	62
Gambar 4.6.	Perbandingan Jumlah Sel Radang antara Pembanding Positif dan Gambir	63
Gambar 4.7.	Perbandingan Kadar TGF- β 1 antara Kontrol dan Pembanding Positif.....	64
Gambar 4.8.	Perbandingan Kadar TGF- β 1 antara Kontrol dan Gambir	65
Gambar 4.9.	Perbandingan Kadar TGF- β 1 antara Pembanding Positif dan Gambir	66
Gambar 4.10.	Perbandingan Kadar NF- κ B Jaringan Paru antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif	66
Gambar 4.11.	Perbandingan Kadar NF- κ B Jaringan Paru antara Kelompok Pembanding Positif dan Gambir.....	67
Gambar 4.12.	Perbandingan Kadar NF- κ B Jaringan Paru antara Kelompok Pembanding Positif dan Gambir.....	68
Gambar 4.13.	Ekspresi TIMP-1 dengan <i>Image J</i> dalam Persentase Area Fibrosis Paru antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif.....	69
Gambar 4.14.	Ekspresi TIMP-1 dengan <i>Image J</i> dalam Persentase Area Fibrosis Paru antara Kelompok Kontrol dan Gambir	69
Gambar 4.15.	Ekspresi TIMP-1 dengan <i>Image J</i> dalam Persentase Area Fibrosis Paru antara Kelompok Pembanding Positif dan Gambir	70
Gambar 4.16.	Ekspresi Kolagen I dengan <i>Image J</i> dalam Persentase Area Fibrosis Paru antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif.....	71
Gambar 4.17.	Ekspresi Kolagen I dengan <i>Image J</i> dalam Persentase Area Fibrosis Paru antara Kelompok Kontrol dan Gambir.....	72
Gambar 4.17.	Ekspresi Kolagen I dengan <i>Image J</i> dalam Persentase Area Fibrosis Paru antara Kelompok Pembanding Positif dan Gambir .	73
Gambar 4.18.	Perubahan Gambaran Histopatologi Jaringan Paru pada Kelompok Kontrol Negatif dan Bleomisin.....	76
Gambar 4.19.	Gambaran Perubahan Histopatologi Jaringan Paru pada Pembanding Positif Fibropreventif dan Fibrolisis.....	77
Gambar 4.20.	Perubahan Gambaran Histopatologi Jaringan Paru pada Kelompok Fibropreventif Gambir dengan berbagai Dosis	78
Gambar 4.21.	Gambaran Histopatologi Perubahan Jaringan Paru pada Kelompok Fibrolisis Gambir dengan berbagai Dosis	79
Gambar 4.22.	Ekspresi TIMP-1 pada kelompok KN dan KB	80

Gambar 4.23. Ekspresi TIMP-1 (A) dan Kolagen I (B) pada Kelompok Fibropreventif dan Fibrolisis Pembanding Positif	81
Gambar 4.24. Ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I pada Kelompok Fibropreventif dengan Gambir berbagai Dosis	82
Gambar 4.25. Ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I pada Kelompok Fibrolisis Gambir berbagai Dosis	83
Gambar 4.26. Hasil Pemeriksaan NF- κ B menggunakan Metode <i>Western Blott</i> pada Kelompok Gambir	84
Gambar 4.19. Perbedaan Median Nilai Uji antara Seluruh Kelompok Hewan Coba.	85
Gambar 5.1. Mekanisme Kerja Fibropreventif dan Fibrolisis Gambir.....	98

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Faktor-faktor dan Mekanisme yang Memengaruhi Diferensiasi, Apoptosis dan Penuaan Miofibroblas	25
Tabel 2.2 Karakterisasi Skala Modifikasi <i>Ashcroft</i>	38
Tabel 4.1. Karakteristik dan Gambaran Makroskopis Paru Subjek Penelitian ...	59
Tabel 4.2. Derajat Fibrosis Berdasarkan Skor Modifikasi Ascroft	75
Tabel 4.3. Delta Kelompok Uji Coba.....	74

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Surat Persetujuan Komisi Etik FKH IPB	130
Lampiran 2.	Surat Persetujuan Komisi Etik FK Universitas Indonesia	131
Lampiran 3.	Lembar Izin Penelitian	132
Lampiran 4.	Lembar Izin Penelitian Hewan.....	133
Lampiran 5.	Penyiapan Ekstrak Gambir	134
Lampiran 6.	Metode Penyiapan Suspensi Sediaan Uji Ekstrak Gambir	135
Lampiran 7.	Analisis Sel Inflamasi pada Cairan BAL	136
Lampiran 8.	Analisis Kadar TGF- β 1 dalam BAL dengan Metode ELISA	137
Lampiran 9.	Analisis Kuantitatif dengan Teknik <i>Image J</i> pada Pemeriksaan Jaringan Paru dengan Imunohistokimia.....	140
Lampiran 10.	Pemeriksaan Kadar NF- κ B dengan Metode ELISA	142
Lampiran 11.	Pemeriksaan Ekspresi Protein NF- κ B dengan Metode <i>Western Blott</i>	145

DAFTAR SINGKATAN

Abl	: <i>Abelson murine leukemia</i>
AFM	: <i>Atomic force microscope</i>
Akt	: <i>Acutely transforming retrovirus</i>
ALI	: <i>Acute lung injury</i>
ALK	: <i>Activin receptor like kinases</i>
ANG II	: <i>Angiotensin II</i>
ATII	: <i>Alveolar type II</i>
BALF	: <i>Bronchoalveolar lavage fluid</i>
Bcr	: <i>The breakpoint cluster region protein</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
CTGF	: <i>Connective Tissue growth factor</i>
ECM	: <i>Extracellular matrix</i>
EG	: Ekstrak gambir
ELISA	: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	: <i>Epithelial mesenchymal transition</i>
ERK	: <i>Extracellular signal regulated kinase</i>
FKH IPB	: Fakultas kedokteran hewan institut pertanian bogor
FL G131	: Fibrosis gambir dosis 131 mg/kg BB
FL G262	: Fibrosis gambir dosis 262 mg/kg BB
FL G65	: Fibrosis gambir dosis 65 mg/kg BB
FL PP	: Fibrosis pembanding positif
FP G131	: Fibropreventif gambir dosis 131 mg/kg BB
FP G262	: Fibropreventif gambir dosis 262 mg/kg BB
FP G65	: Fibropreventif gambir dosis 65 mg/kg BB
FP PP	: Fibropreventif pembanding positif
HDAC	: Hasona deasetilase
HE	: Hematoxylin eosin
HRCT	: <i>High resolution computed tomography</i>
IFN γ	: Interferon γ
IL	: Interleukin
IPF	: <i>Idiopathic pulmonary fibrosis</i>
JNK	: C jun-N terminal kinase
KB	: Kontrol bleomisin
KN	: Kontrol negatif
LAP	: <i>Latent associated peptide</i>

LOX	: <i>Lysyl oxidase</i>
LOXL	: <i>Lisyl oxidase-like</i>
LPA	: <i>Lysophosphatidic acid</i>
MAPK	: <i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCP-1	: <i>Monocytes chemoattractant protein-1</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
MIP	: <i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
MMP	: <i>Matriks metaloproteinase</i>
MT	: <i>Masson-Trichome</i>
NAC	: <i>N-acetylcysteine</i>
NFA	: <i>Nitrated fatty acid</i>
NFκβ	: <i>Nuclear factor kappa beta</i>
NOX	: <i>NADPH oxidase</i>
PAI	: <i>Plasminogen activator inhibitor</i>
PDGF	: <i>Platelet derived growth factor</i>
PGE2	: <i>Prostaglandin 2</i>
PGE-2	: <i>Prostaglandin E2</i>
PI3K	: <i>Phosphatidylinositol 3 kinase</i>
PLF	: <i>Pleural lavage fluid</i>
PPARγ	: <i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
PTEN	: <i>Tumor suppressor phosphatase and tensin homologue</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
SARA	: <i>Smad anchor for receptor activation</i>
SB	: <i>Simpang baku</i>
SBE	: <i>Smad binding DNA element</i>
SMA	: <i>Smooth muscle actin</i>
Smad	: <i>Small mothers against decantaplegic</i>
SOD	: <i>Superoxide dismutase</i>
TGF-β1	: <i>Transforming growth factor β1</i>
TIMPs	: <i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TSLP	: <i>Thymic stromal lymphopietin</i>
TSP1	: <i>The inducible matricellular protein thrombospondin 1</i>
TβR	: <i>TGF-β reseptor</i>
UPHL	: <i>Unil pengelola hewan laboratorium</i>
WISP-1	: <i>WNT1-inducible signaling protein-1</i>
α-SMA	: <i>α-smooth muscle actin</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Fibrosis paru adalah kelainan berupa terbentuknya jaringan parut (*scar*) yang melibatkan infiltrasi sel inflamasi, proliferasi fibroblas, *reactive oxygen species* (ROS) serta penumpukan matriks ekstraselular yang berlebihan di jaringan parenkim paru dan dapat mengganggu fungsi paru.¹ Fibrosis juga dapat terjadi di pleura. Pleura adalah membran aktif yang terlibat dalam homeostasis dinamis cairan pleura di rongga toraks. Keseimbangan cairan pleura yang terganggu dapat menimbulkan efusi pleura dan bila tidak segera diatasi akan menyebabkan fibrosis atau penebalan pleura. Fibrosis paru dan pleura dapat menyebabkan penyakit paru restriktif yang berat dan gagal napas. Sebagian besar fibrosis paru dan pleura disebabkan oleh inflamasi, trauma, pneumonia, efusi pleura, empiema, tuberkulosis, asbestosis, *interstitial lung disease/idiopathic pulmonary fibrosis*, obat golongan ergot, sitotoksik, radiasi, dan pasca kemoterapi. Selain itu penyakit jaringan ikat sistemik, hemotoraks dan pasca torakotomi juga sering menjadi penyebab fibrosis. Fibrosis paru lebih banyak pada laki-laki lansia dan dewasa, terkait genetik dan kebiasaan merokok. Tergantung luas area fibrosis, kondisi tersebut dapat menurunkan fungsi pernapasan, kualitas hidup, menyebabkan morbiditas serta mortalitas.²

Angka kejadian fibrosis paru secara pasti tidak diketahui, namun sering berhubungan dengan penyakit infeksi paru serta paparan zat kimia di lingkungan kerja. *Idiopathic pulmonary fibrosis* (IPF) adalah penyakit paru interstitial yang kronik, progresif dan tidak diketahui penyebabnya. Kasus baru IPF bertambah 5000 kasus setiap tahunnya dan angka ketahanan hidup 5 tahun kurang dari 43%. Studi epidemiologi IPF yang dipublikasikan pada bulan Januari 1990–Agustus 2011 oleh *Excerpta Medica Database* (EMBASE) menyatakan insidens dan prevalens IPF dengan perhitungan data secara kuantitatif. Prevalens IPF di Amerika Serikat bervariasi 14 sampai 27,9 kasus per 100.000 populasi, di Eropa antara 1,25–23,4 kasus per 100.000 populasi, dan di Taiwan 0,7–6,4 per 100.000 populasi. Insidens IPF pertahun di Amerika Serikat 6,8–8,8 per 100.000 populasi, sedangkan di Eropa 0,22–7,4 per 100.000 populasi.

Prevalens dan insidens fibrosis paru yang disebabkan oleh penyakit paru lain sulit diketahui, karena penyakit dasar penyebab fibrosis paru sangat banyak. Prevalens dan insidens IPF dipengaruhi oleh usia dan jenis kelamin, meningkat pada usia tua dan laki-laki. Usia pasien IPF berkisar 69,8–71,3 tahun.³⁻⁵

Pemeriksaan biopsi paru yang mengalami fibrosis, menunjukkan gambaran jaringan parut yang bercampur dengan jaringan paru normal, perubahan struktur epitel seperti hiperplasia dan metaplasia, banyaknya sel fibroblas dan miofibroblas dengan keterlibatan berbagai jalur sinyal, mediator inflamasi, faktor pertumbuhan, sitokin termasuk *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor β* (TGF- β), *tumor necrosis factor α* (TNF- α), endotelin dan *connective tissue growth factor* (CTGF), sudah diketahui.⁶

Polutan eksogen dapat meningkatkan produksi oksidan dan mengaktifkan sel-sel inflamasi untuk menghasilkan radikal bebas. Agen hiperoksia, asap rokok, serat asbes, obat-obatan, dan radiasi dapat menyebabkan IPF.^{7,8} Stres oksidatif adalah suatu ketidakseimbangan antara senyawa oksidan dan senyawa antioksidan dalam tubuh yang memicu kerusakan sel paru dan timbulnya proses fibrogenesis paru. Reversibilitas fibrosis paru tidak sebaik pada hati, tergantung penyebab spesifik, usia, jenis kelamin, dan kondisi pasien. Fibrosis yang ditandai dengan degradasi *Extracellular matrix* (ECM) dilakukan oleh enzim famili MMP. Aktivitas enzim ini dihambat oleh protein *tissue inhibitors of metalloproteinase* (TIMP) terutama TIMP-1. Proses fibrosis dipengaruhi oleh rasio MMP dan TIMP. Upaya meningkatkan aktivitas MMP atau menurunkan kadar TIMP-1 akan menuju perbaikan kondisi fibrosis.^{9,10}

Belum ada terapi yang efektif untuk fibrosis paru. Penatalaksanaan sesuai pedoman PDPI, yaitu terapi simptomatis untuk mengatasi keluhan pasien dan antifibrosis yang tersedia adalah pirfenidon yang mempunyai aktivitas sebagai anti-TGF- β . Pirfenidon disetujui FDA pada 2017 dan nintedanib disetujui FDA tahun 2014, sebagai salah satu antifibrosis paru walaupun efektivitasnya belum maksimal. Sebagian pasien menghentikan pengobatan karena efek samping, oleh karena itu perlu dikembangkan pengobatan lain sebagai alternatif antifibrosis.^{10,11}

Uncaria gambir (selanjutnya disebut gambir) termasuk famili Rubiaceae, banyak ditemukan di Asia Tenggara khususnya kawasan Sumatera, Indonesia dengan

produksi yang mampu memenuhi 80% kebutuhan dunia.¹² Ningsih¹³ melaporkan bahwa tanaman gambir dapat memperbaiki kondisi fibrosis pada hati hewan tikus model melalui efek antioksidan. Flavonoid (+)-katekin merupakan senyawa kimia utama gambir, mencapai 40–80% getah kering dan memiliki aktivitas antioksidan kuat.¹² Katekin mampu memperbaiki kerusakan hati akibat induksi alkohol melalui mekanisme antiinflamasi jalur NF- κ B secara *in vivo*.¹⁴ Berdasarkan hasil penelitian tersebut diduga gambir juga dapat dimanfaatkan sebagai antifibrosis paru. Untuk itu perlu dilakukan penelitian *in vivo* yang membuktikan mekanisme kerja gambir sebagai fibrolisis dan/atau fibropreventif. Selain gambir, teh hijau sudah banyak diteliti pengaruhnya terhadap fibropreventif dan fibrolisis jaringan paru karena itu dapat digunakan sebagai pembanding positif untuk gambir.

Penelitian eksperimental fibrosis paru sering menggunakan hewan model yang diinduksi dengan bleomisin. Bleomisin dapat menginduksi stres oksidatif di jaringan paru yang akan mencetuskan reaksi inflamasi serta terbentuknya jaringan fibrosis. Tikus merupakan hewan yang sering digunakan dalam model eksperimental fibrosis paru. Pemberian bleomisin secara intratrakeal merupakan uji preklinik model hewan coba yang terbaik.¹⁵ Studi pendahuluan menunjukkan pemberian bleomisin intratrakeal dan intrapleura menimbulkan fibrosis paru dan pleura pada tikus serta gambaran fibrosis yang lebih jelas dibandingkan intrapleura.

Patogenesis fibrosis yang kompleks melibatkan faktor pertumbuhan (TGF- β) sebagai mediator fibrosis yang penting, dan oleh karena itu merupakan target potensial untuk terapi antifibrosis. Sitokin pleiotropik tersebut menginduksi fibrosis paru secara progresif, mengatur proliferasi sel, migrasi sel radang, adhesi, diferensiasi, sintesis kolagen, penyembuhan luka, angiogenesis, metastasis, yang jalur sinyalnya sebagian dipengaruhi faktor genetik. Studi *in vivo* menunjukkan bahwa TGF- β 1 mengaktifasi ekspresi gen dan sintesis protein kolagen serta menurunkan aktivitas enzim matriks metaloproteinase (MMP). MMP atau elastase merupakan enzim proteinase yang mampu melisiskan protein, berakibat luluhnya ECM di interstitial dan alveoli paru. Sejumlah sel dalam tubuh dapat menyintesis dan menyekresikan TGF- β 1, termasuk makrofag, limfosit dan trombosit.¹⁵⁻¹⁷ Intervensi terhadap aktivasi dan jalur sinyal TGF- β 1 merupakan strategi

pengobatan kelainan fibrosis pada organ tubuh. Ada tiga strategi utama yang digunakan untuk terapi fibrosis yaitu menghalangi ligan TGF- β , menghalangi aktivasi reseptor TGF- β (TBR) dan menghambat selektif transduksi sinyal intraselular dengan menekan aktivitas *small mothers against decapentaplegic* (Smads) serta koaktivator.⁹

Dalam menemukan terapi baru untuk mengatasi fibrosis paru yang selama ini bersifat menetap, pemberian gambir diharapkan dapat mencegah luas area paru yang mengalami fibrosis pada tikus model. Sebagai pembanding positif digunakan teh hijau yang sudah diketahui bersifat fibropreventif.

1.2 Rumusan Masalah

Fibrosis paru merupakan penyakit paru restriktif berat dan dapat menyebabkan gagal napas. Prevalensi penderita penyakit fibrosis paru di Indonesia lebih tinggi dibandingkan negara lain di Asia dan diprediksi akan terus meningkat. Secara *in vitro* antiinflamasi dapat bermanfaat sebagai fibropreventif. Terapi efektif fibrosis paru hingga saat ini belum diketahui, sehingga perlu dikembangkan terapi fibrolisis sebagai alternatif. Gambir merupakan tanaman yang mengandung antioksidan dan mempunyai efek fibrolisis pada hati tikus, sedangkan mekanisme fibrosis paru dapat melalui jalur inflamasi NF- κ B dan TGF- β 1. TGF- β 1 mengaktifasi ekspresi kolagen 1 serta menurunkan aktivitas enzim MMP. Aktivitas enzim MMP dihambat oleh TIMP-1. Hingga saat ini belum diketahui kemampuan gambir dalam menghambat fibrosis paru, perbedaan kadar parameter inflamasi/fibrosis dan dosis optimal gambir kelompok fibropreventif/fibrolisis paru dibandingkan kelompok teh hijau pada hewan coba. Pemahaman parameter inflamasi/fibrosis kelompok gambir diharapkan menjadi dasar terapi alternatif antifibrosis.

1.3 Pertanyaan Penelitian

1. Apakah terdapat perbedaan jumlah sel radang BAL pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
2. Apakah terdapat perbedaan kadar TGF- β 1 BAL pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.

3. Apakah terdapat perbedaan kadar NF- κ B jaringan paru pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
4. Apakah terdapat perbedaan ekspresi TIMP-1 jaringan paru pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB antara kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
5. Apakah terdapat perbedaan ekspresi kolagen I jaringan paru pada pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB antara kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
6. Bagaimana gambaran histopatologi jaringan paru pada kelompok gambir fibropreventif/fibrolisis, dengan pembanding positif dan kontrol

1.4 Hipotesis

1. Terdapat perbedaan jumlah sel radang BAL pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
2. Terdapat perbedaan kadar TGF- β 1 BAL pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
3. Terdapat perbedaan kadar NF- κ B jaringan paru pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
4. Terdapat perbedaan ekspresi TIMP-1 jaringan paru pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB antara kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
5. Terdapat perbedaan ekspresi kolagen I jaringan paru pada pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB antara kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.

1.5 Tujuan Penelitian

1.5.1 Tujuan Umum

Menganalisis parameter inflamasi/fibrosis, dan dosis gambir sebagai efek fibropreventif/fibrolisis pada fibrosis paru hewan coba.

1.5.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis perbedaan jumlah sel radang BAL pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
2. Menganalisis perbedaan kadar TGF- β 1 BAL pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
3. Menganalisis perbedaan kadar NF- κ B jaringan paru pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
4. Menganalisis perbedaan ekspresi TIMP-1 jaringan paru pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB antara kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
5. Menganalisis perbedaan ekspresi kolagen I jaringan paru pada pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB antara kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
6. Gambaran histopatologi jaringan paru pada kelompok gambir fibropreventif/fibrolisis, dengan pembanding positif dan kontrol

1.6 Manfaat Penelitian

1.6.1 Akademik

Melengkapi pemahaman patofisiologi fibrosis paru melalui jalur inflamasi dan fibrosis

1.6.2 Penelitian

Apabila hasil studi ini membuktikan gambir dapat menghambat dan mengurangi fibrosis paru, diharapkan hasil studi ini dapat digunakan sebagai terapi alternatif antifibrosis dan menjadi dasar untuk studi lanjutan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

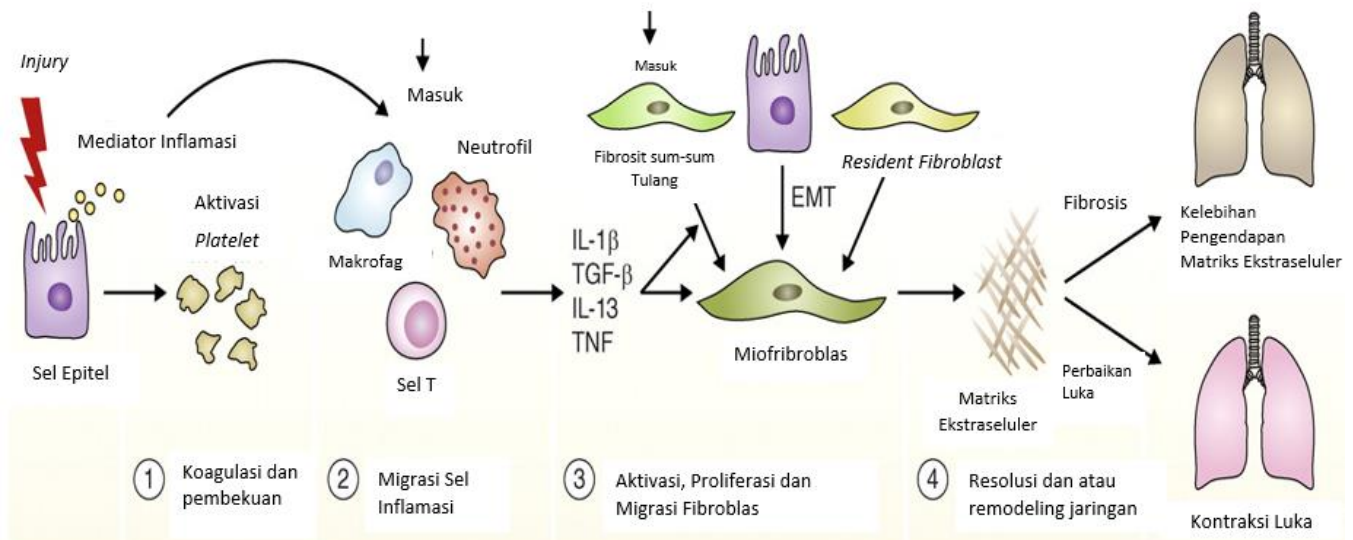
2.1 Mekanisme Fibrosis pada Paru

Fibrosis paru merupakan kelainan paru yang ditandai dengan pembentukan jaringan parut, sehingga menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi paru. *Idiopathic pulmonary fibrosis* (IPF) adalah bentuk fibrosis paru yang paling banyak ditemukan, tidak diketahui penyebab jelasnya, dengan angka harapan hidup 2–6 tahun.¹⁸ Fibrosis paru juga dapat terjadi setelah pajanan infeksi virus, radioterapi, obat kemoterapi, toksin dan zat kimia dari lingkungan. Selain itu fibrosis dapat ditemukan setelah transplantasi sumsum tulang, penyakit inflamasi kronik seperti skleroderma dan artritis reumatoid.¹⁹ Fibrosis tidak memberikan respons terhadap pengobatan dan memiliki angka mortalitas yang tinggi. Satu-satunya pengobatan efektif yang tersedia untuk fibrosis paru yang progresif adalah transplantasi paru.^{18,20}

Perbaikan jaringan rusak merupakan mekanisme biologik dasar yang melibatkan penggantian sel dan jaringan rusak setelah jejas, dan merupakan proses penting untuk kelangsungan hidup.²¹ Jika proses ini terhambat maka akan berkembang menjadi jaringan parut yang menetap, ditandai dengan akumulasi komponen matriks ekstraselular seperti asam hialuronat, fibronectin, proteoglikan dan kolagen interstitial pada jaringan paru yang luka.

Pada tahap awal setelah kerusakan jaringan paru, sel epitel paru dan endotel melepaskan mediator inflamasi yang memulai kaskade koagulasi antifibrinolitik, memicu aktivasi *platelet* dan penggumpalan darah. Agregasi trombosit dan degranulasi menyebabkan peningkatan permeabilitas pembuluh darah, masuknya neutrofil, makrofag, limfosit, dan eosinofil ke lokasi luka. Neutrofil adalah sel inflamasi yang paling banyak pada tahap awal penyembuhan luka, namun dengan cepat digantikan oleh makrofag. Selama tahap migrasi, leukosit, makrofag dan neutrofil aktif membersihkan sel mati dan organisme yang masuk. Sel tersebut memproduksi berbagai sitokin dan kemokin seperti IL-1 β , TNF, IL-13 dan TGF- β , yang memperkuat respons inflamasi dan memicu proliferasi fibroblas. Miofibroblas direkrut dari berbagai sumber termasuk sel mesenkim lokal, fibroblast sumsum tulang,

dan melalui proses yang disebut *Epithelial Mesenchymal Transition* (EMT). Fibrosit sumsum tulang dan fibroblas mengalami proliferasi dan diferensiasi menjadi miofibroblas yang mengeluarkan komponen matriks ekstraselular. Begitu fibroblas menjadi aktif, akan berubah menjadi α -smooth muscle actin (α -SMA) yang mengekspresikan miofibroblas, untuk mengeluarkan komponen matriks ekstraselular. Pada tahap remodeling akhir dan resolusi, miofibroblas dapat meningkatkan perbaikan luka dengan cara kontraksi luka, untuk regenerasi jaringan yang rusak. Fibrosis terjadi bila luka parah, iritasi yang merusak jaringan menetap, atau proses perbaikan yang tidak teratur. Proses perbaikan luka yang tidak sistematis, dapat menyebabkan terbentuknya jaringan parut, yang menandai kompleksnya proses fibrosis yang terjadi (Gambar 2.1.).²²



Gambar 2.1. Gangguan Proses Penyembuhan Luka Normal dan Perkembangan Fibrosis Paru²²

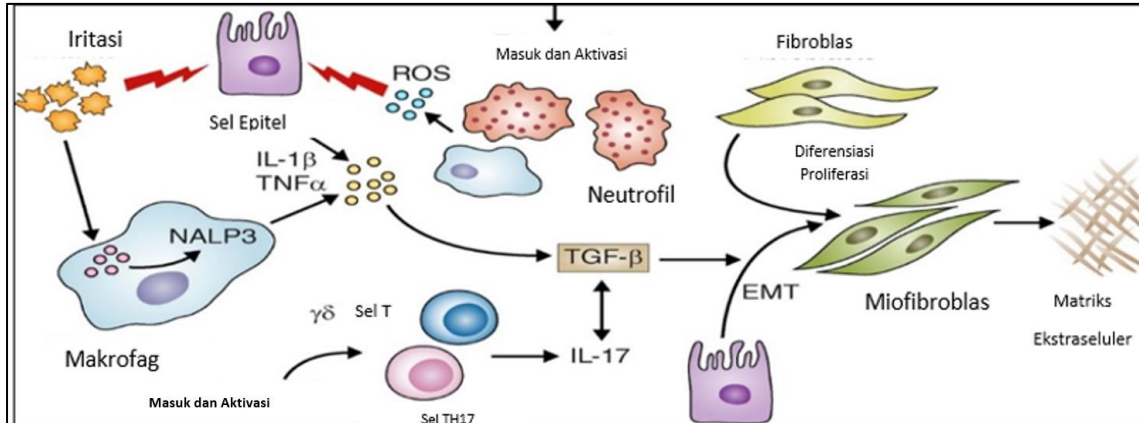
Fibrogenesis melibatkan interaksi dinamis antara faktor-faktor yang mendorong biosintesis dan pengendapan matriks ekstraselular bersama dengan jalur yang menurunkan matriks ekstraselular serta menghilangkan sel efektor primer. Jaringan fibrotik selama ini diketahui bersifat menetap, namun penelitian pada hewan coba menunjukkan bahwa dapat terjadi kondisi fibrolisis. Tinjauan ini menggambarkan bahwa mekanisme fibrosis paru saat ini fokus pada degradasi matriks ekstraselular, pengangkatan miofibroblas dan peran sel inflamasi. Meskipun ada kesenjangan yang bermakna dalam memahami resolusi fibrosis paru, perbaikan akselerasi

bioteknologi dan bioinformatika diharapkan dapat memperbaiki pemahaman mekanisme ini dan memiliki potensi tinggi untuk menghasilkan terapi restoratif baru dan efektif dalam pengobatan, tidak hanya fibrosis paru, tetapi juga pada spektrum gangguan kronik yang luas.²³

Fibrosis dianggap sebagai proses progresif ireversibel yang heterogen dan kompleks, merupakan tahap akhir penyembuhan luka yang tidak teratur, sehingga tidak memberikan respons terhadap pengobatan. Namun, data terakhir menunjukkan bahwa fibrosis yang terbentuk dapat berlangsung reversibel seperti pada glomerulosklerosis ginjal. Studi pada hewan pengerat menunjukkan fibrosis hati pada model eksperimental menggunakan karbon tetraklorida dapat berkurang, walaupun tidak sepenuhnya membaik pada stadium lanjut. Hampir sama dengan fibrosis hati, tingkat reversibilitas fibrosis paru tampaknya berkaitan dengan durasi atau intensitas pemicu fibrogenik. Bila ekspresi TGF- α dihilangkan setelah empat minggu, akan terjadi resolusi fibrosis secara histologis. Penelitian hewan ini mendukung konsep bahwa gangguan fungsi akibat fibrosis paru dapat dipulihkan.²³

Gambaran klinis, radiografi, dan histopatologis berbagai bentuk dan tahap fibrosis paru serta pemahaman mendalam tentang mekanisme molekular fibrogenesis perlu mendapat perhatian agar terapi dapat tepat sasaran. Cukup banyak model fibrosis paru pada hewan pengerat, antara lain dengan pemberian bleomisin, partikulat asbes, silika, radiasi, bronkiolitis obliterans dan transplantasi. Masih belum jelas apakah satu model eksperimental dapat menyerupai kondisi fibrosis yang terjadi pada manusia.¹⁵

Selama hampir 20 tahun penelitian menunjukkan bahwa TGF- β memainkan peran utama dalam patogenesis fibrosis paru melalui peningkatan aktivasi, proliferasi, diferensiasi sel epitel dan miofibroblas yang memproduksi kolagen. Sampai saat ini belum ada obat yang disetujui sebagai terapi utama fibrosis. Hasil penelitian terbaru menunjukkan bahwa beberapa obat antifibrosis tidak melibatkan jalur sinyal TGF- β secara langsung, karena ada beberapa jalur dan mekanisme lain yang berperan dalam patogenesis fibrosis paru.²²



Gambar 2.2. Stimulasi Mediator Proinflamasi dan Profibrotik pada Proses Fibrosis²²

Iritan seperti silika, asbes, dan bleomisin yang melukai sel epitel paru, dapat dideteksi dengan Nalp3 pada makrofag. Iritasi ini merangsang produksi ROS, kemokin, dan sitokin. Mediator inflamasi ini meningkatkan penarikan dan aktivasi leukosit di lokasi jejas jaringan. Sebagai contoh, IL-1 β menginduksi aktivasi neutrofil, mengekspresikan ROS yang dapat merusak sel epitel paru. IL-1 β juga mendorong produksi TGF- β 1, sitokin profibrotik yang memicu aktivasi dan proliferasi fibroblas. TGF- β memengaruhi sel epitel paru, mendorong EMT dan pembentukan miofibroblas yang menghasilkan ECM. TGF- β 1 memperburuk respons inflamasi dengan merangsang diferensiasi sel T-helper 17 (Gambar 2.2.).²²

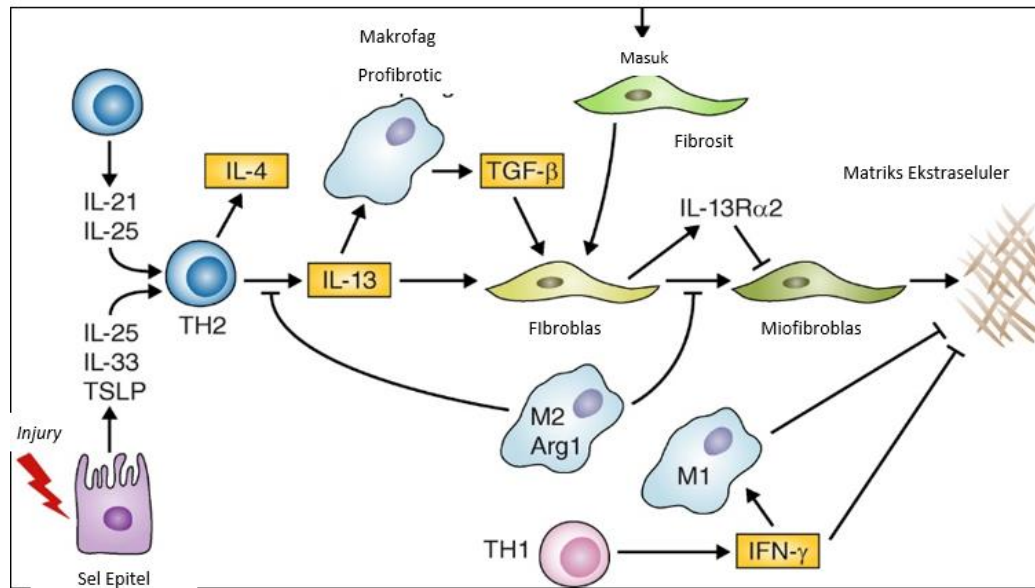
2.1.1 Peran Mediator Inflamasi pada Fibrosis Paru

Mediator inflamasi berperan dalam perkembangan fibrosis paru. Hasil biopsi paru tikus menunjukkan peningkatan kadar TNF, setelah terpajan silika, asbes, dan bleomisin. Walaupun inhibitor TNF dapat menghambat sintesis kolagen dan miofibroblas, antagonis TNF memiliki efek yang dapat memperburuk fibrosis paru pada pasien artritis reumatoid yang menggunakan metotreksat. IL-1 β dapat memengaruhi proses fibrosis paru, dengan cara meningkatkan jumlah neutrofil yang menarik kemokin dan *Macrophage Inflammatory Protein 2* (MIP-2). Antagonis reseptor IL-1 menghambat efek profibrotik IL-1 β . IL-17A juga terlibat dalam patogenesis fibrosis paru dan meningkat kadarnya pada cairan BAL pasien IPF. Interleukin-23 dan IL-12 juga berperan dalam menginduksi terjadinya fibrosis akibat pajanan bleomisin. Interleukin-22 yang diproduksi oleh sel T, melindungi paru tikus dari fibrosis akibat *Bacillus substilis*.²²

Stres oksidatif dapat merangsang proses inflamasi profibrotik. Aktivasi Nalp3 dan sekresi IL-1 β dipicu oleh ROS dan NADPH oxidase (NOX), diekspresikan dalam makrofag dan neutrofil, meningkat pada pasien IPF serta dibutuhkan untuk diferensiasi fibroblas, sintesis matriks ekstraselular dan kontraktilitas fibroblas. Amara et al.²⁴ menemukan peningkatan ekspresi NOX4 mRNA, protein pasien IPF yang berhubungan dengan ekspresi mRNA α -SMA dan *procollagen I* mRNA. ROS, IL-1 β , dan TNF juga dapat merangsang fibrosis dengan peningkatan ekspresi *plasminogen activator inhibitor1* (PAI-1) yang berfungsi menghambat fibrosis. Sistem aktivasi plasmin/plasminogen dapat meningkatkan produksi prostaglandin E2 (PGE-2) dan *cyclooxygenase-2* (COX-2) yang mempunyai efek antifibrotik paru.¹⁴ Hasil penelitian mengungkapkan sel CD4⁺ Th1, Th2 dan interferon γ (IFN γ) berperan penting dalam proses inflamasi dan fibrosis. IFN- γ menghambat fibrosis, sedangkan IL-4 atau IL-13 mediator profibrotik baik secara langsung maupun tidak langsung dengan cara memengaruhi aktivasi miofibroblas. IL-5 merangsang fibrosis paru dengan menarik eosinofil yang menghasilkan TGF- β 1, PDGF, dan IL-13.²²

Setelah terjadi jejas, sel epitel paru melepaskan IL-25, IL-33 dan TSLP, yang dapat memengaruhi respons Th2 profibrotik. Sel T juga melepaskan IL-21 dan IL-25, yang meningkatkan diferensiasi Th2. Sel Th2 melepaskan IL-4 dan IL-13, yang merangsang makrofag profibrotik untuk mengeluarkan TGF- β 1. IL-13 juga dapat secara langsung mengaktifkan fibroblas (Gambar 2.3.).¹¹ Sitokin Th2 juga memicu kemokin spesifik, merangsang penarikan fibrosit sumsum tulang dan memperkuat respons fibrotik. Sitokin Th2 juga dapat memicu mekanisme umpan balik antifibrotik. Sebagai contoh, sitokin Th2 mengaktifkan aktivitas arginase-1 pada makrofag M2, yang menghambat diferensiasi IL-13 dan miofibroblas lebih lanjut. IL-13 juga dapat mengatur reseptor IL-13 pada fibroblas, yang menghambat produksi matriks ekstraselular melalui umpan balik negatif. IFN- γ yang dihasilkan oleh sel Th1, menunjukkan aktivitas antifibrotik dengan menekan sintesis kolagen dan meningkatkan aktivasi makrofag M1 yang membantu degradasi matriks ekstraselular. IL-21 yang diproduksi oleh sel T, IL-33, dan *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) yang dilepaskan dari sel epitel rusak, serta IL-25 yang diproduksi oleh sel T dan sel epitel, merupakan target potensial untuk terapi antifibrotik, karena sitokin-sitokin tersebut berperan dalam imunitas tipe 2. Sitokin

IL-1, TGF- β 1, adenosine, enzim kitinase, kemokin, matriks metaloproteinase dan fibroblas merupakan target penting IL-13 profibrotik, sehingga penelitian peran IL-13 dalam proses fibrosis, membantu antagonis IL-13 sebagai terapi potensial untuk fibrosis pada IPF dan penyakit paru kronik lainnya.¹¹ Li et al.²⁵ menemukan peningkatan ekspresi IL-33 pada pasien IPF, dapat dicegah dan menjadi target terapi fibrosis paru yang baru.



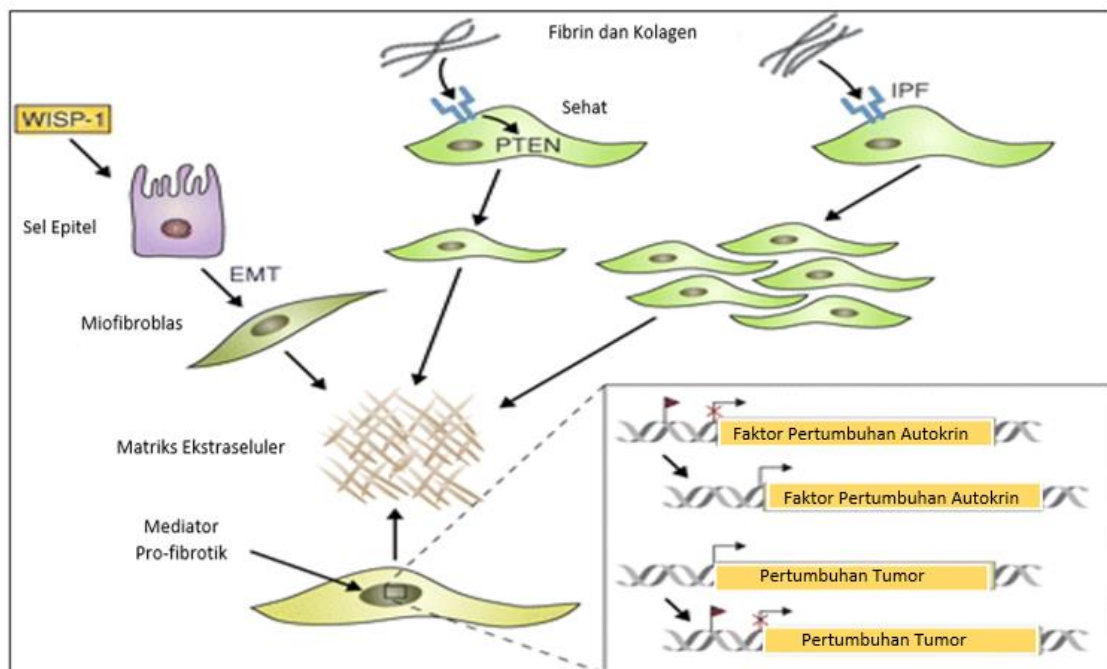
Gambar 2.3. Peran Subset Khusus Sel T Helper dan Makrofag pada Fibrosis Paru²²

2.1.2 Faktor-faktor yang Memengaruhi Sel Epitel, Diferensiasi dan Proliferasi Fibroblas

Jalur penyembuhan luka memengaruhi patogenesis fibrosis paru terutama pada IPF. Jalur sinyal Wnt- β -catenin protein yang berfungsi dalam transkripsi gen dan adhesi sel berperan aktif dalam Alveolar tipe II (ATII) pada fibrosis paru tikus percobaan dan IPF. Pengobatan dengan *WNT1-inducible signaling protein-1* (WISP-1) meningkatkan proliferasi dan EMT sel ATII tikus dan dapat meningkatkan sintesis komponen matriks ekstraselular pada paru tikus dan manusia. Integrin α 3 β 1, yang diekspresikan pada sel epitel, juga dapat memengaruhi EMT.²²

Sinyal Wnt- β -catenin yang diaktifkan oleh WISP-1, aktif pada sel epitel ATII pasien IPF dan paru tikus yang mengalami fibrosis akibat induksi bleomisin. Sinyal ini memicu EMT dan sintesis komponen matriks ekstraselular oleh fibroblas. Pada fibroblas sehat, stimulasi kolagen yang diperantarai β 1 integrin (biru) mengatur

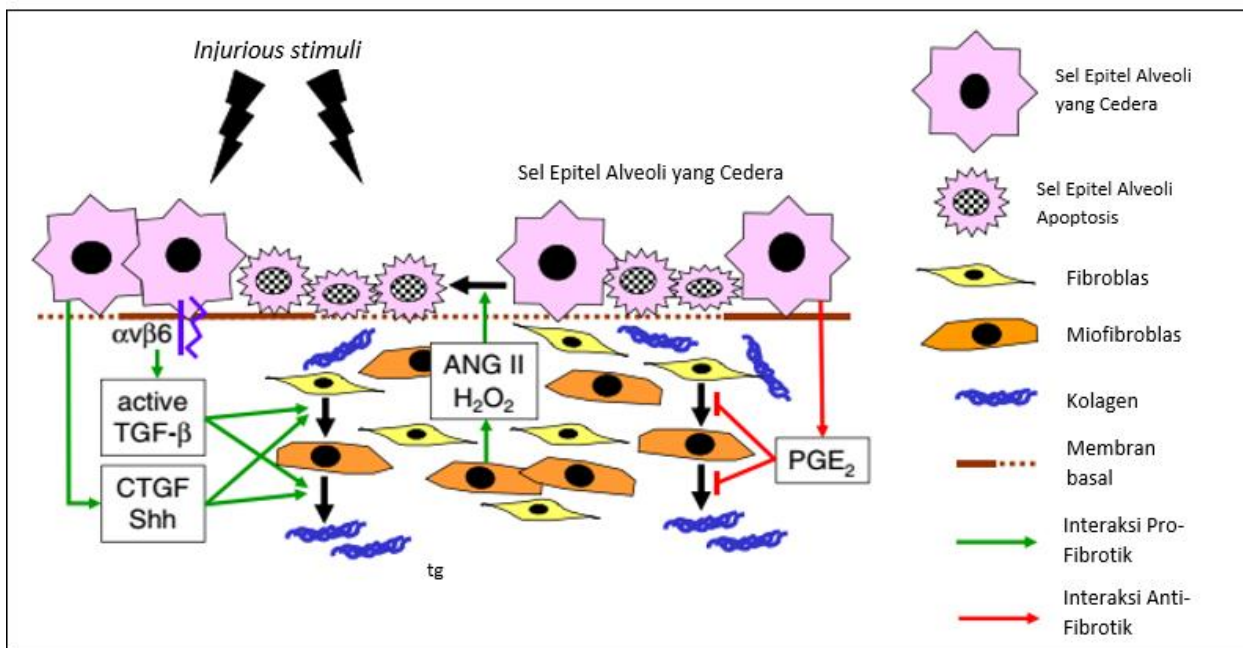
aktivitas *tumor suppressor phosphatase and tensin homologue* (PTEN) dan menghambat proliferasi. (Gambar 2.4.) Wnt5A dapat meningkatkan proliferasi fibroblas dan mencegah apoptosis fibroblas pada pasien IPF.²⁶ Mediator profibrotik memengaruhi perubahan epigenetik fibroblas yang berperan pada patogenesis fibrosis. Lokasi berbagai gen yang memberi kode *autocrine growth* dan faktor diferensiasi dapat didemetilasi, menyebabkan aktivasi berkelanjutan dan dapat diwariskan. Selain itu gen supresor tumor dapat tidak aktif, menyebabkan aktivasi onkogen terus berlanjut sehingga mendorong pertumbuhan faktor fibroblas. Faktor miRNA (misalnya, miR-21) mungkin bekerja dengan cara menghalangi translasi atau meningkatkan degradasi gen supresor tumor pada fibroblas.²²



Gambar 2.4. Perubahan Intrinsik Aktivasi Sel Epitel dan Fibroblas pada Fibrosis²²

Integrin $\beta 1$ menghambat proliferasi fibroblas bila terikat pada kolagen tipe 1 yang terpolimerisasi dengan memfasilitasi aktivasi PTEN, yang biasanya menekan jalur sinyal *Phosphatidylinositol 3 kinase-acutely transforming retrovirus-S6K1* (PI3K-Akt-S6K1). Fibroblas IPF menghindari mekanisme penghambatan dengan menampilkan pola patologis ekspresi integrin $\beta 1$ yang menyebabkan aktivitas PTEN rendah dan aktivasi jalur PI3K-AKT-S6K1 yang tidak terkontrol (**Gambar 2.4.**)

Untuk mendukung teori tersebut, tikus yang kekurangan PTEN menunjukkan respons fibroproliferatif yang berkepanjangan setelah jejas jaringan. Hilangnya β -arrestin1 atau β -arrestin2 tampaknya dapat menahan invasi fibroblas ke ECM dan untuk melindungi tikus dari fibrosis yang disebabkan oleh bleomisin.²² Penelitian Lovgren et al.²⁷ membuktikan bahwa defisiensi β -arrestin dapat mencegah invasi fibroblas ke matriks ekstraselular. Sebaliknya, tikus yang mengalami defisiensi *cationic amino acid transporter Slc7a2* menunjukkan peningkatan respons fibroproliferatif dan sitokin Th2. Dengan demikian, defek intrinsik pada jalur proliferasi fibroblas memiliki dampak bermakna pada perkembangan fibrosis paru. Hipotesis perubahan epigenetik fibroblas dalam patogenesis fibrosis adalah dengan cara mencegah proliferasi fibroblas. Beberapa modifikasi metilasi DNA miofibroblas sekresi kolagen, diperoleh dari ginjal yang mengalami fibrosis. Modifikasi epigenetik bersifat reversibel, sehingga merupakan alternatif terapi antifibrosis yang baru.²²



Gambar 2.5. Interaksi Fibroblas dan Epitelial pada IPF²⁸

Panah hijau menunjukkan interaksi fibroblas dan sel epitel. Panah merah menunjukkan interaksi antifibrosis. TGF- β , *transforming growth factor- β* ; CTGF, *connective tissue growth factor*; Shh, *sonic hedgehog*; ANG II, *angiotensin II*; H₂O₂, *hydrogen peroxide*; PGE₂, *prostaglandin E2*.

Pajanan toksin/zat kimia melukai sel epitel alveoli, menginduksi apoptosis dan aktivasi mediator profibrotik termasuk TGF- β , CTGF, dan Shh. Mediator tersebut memengaruhi migrasi fibroblas, proliferasi, diferensiasi, aktivasi miofibroblas,

akumulasi miofibroblas dan matriks ekstraselular dalam paru. Miofibroblas memperkuat jejas epitel dan apoptosis, termasuk ANGII dan ROS seperti H₂O₂, yang mendorong perkembangan IPF. PGE₂ menghambat interaksi fibroblas dan epitel, namun jumlahnya berkurang pada IPF (**Gambar 2.5.**)²⁸

Beberapa studi menunjukkan bahwa banyak sekali penyebab fibrosis paru. Penelitian Dong et al.¹⁷ pada paru tikus memperlihatkan fibrosis akibat radiasi sebesar 15 Gy. Studi Denis et al.²⁹ pada paru tikus menunjukkan fibrosis akibat pemberian *heat killed bacillus Calmete-Guerin* (BCG) secara intranasal. Penelitian Tsukioka et al.¹ pada paru tikus memperlihatkan fibrosis akibat pemberian bleomisin 2,5 mg/kg berat badan secara intratrakeal, dan studi Maden et al.³⁰ melihat efek fibrosis akibat pajanan asap rokok dan bleomisin pada paru tikus.

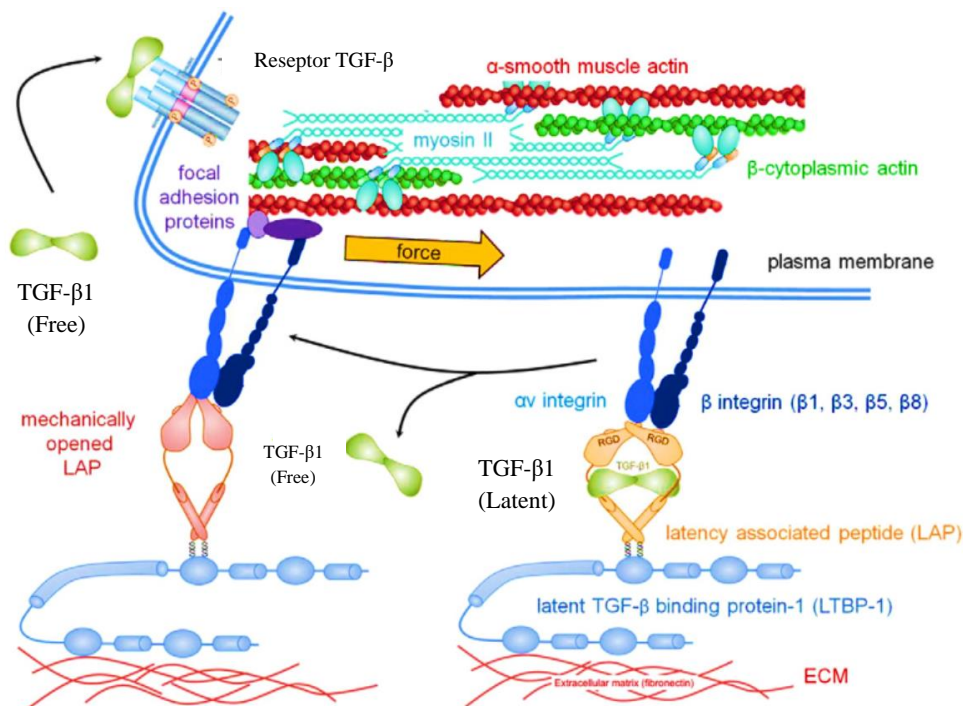
2.2 Peran TGF- β 1 dalam Fibrosis

Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) adalah salah satu jenis sitokin dan kemokin yang berperan terhadap terjadinya fibrosis. TGF- β memicu proliferasi miofibroblas, menginduksi sintesis protein matriks ekstraselular dan menekan degradasi ECM dengan cara induksi antiproteinase atau reduksi metaloprotease. Penelitian Bonniaud³¹ menyatakan bahwa ekspresi berlebihan TGF- β 1 aktif dalam 7–10 hari dengan *adenoviral vector gene transfection* di paru tikus, menginduksi fibrosis berat dan progresif selama 60 hari. Pemberian bleomisin pada paru tikus model, akan meningkatkan kadar sitokin dan kemokin pada hari ke-7 dan ke-14 dibandingkan kelompok kontrol.²⁵

TGF- β merupakan sitokin pleiotropik yang mempunyai tiga isoform yaitu TGF- β 1, TGF- β 2 dan TGF- β 3 yang berperan terhadap kontrol apoptosis, angiogenesis, penyembuhan luka, regulasi imunitas dan biologi tumor. Meskipun fungsi *in vitro* ketiga jenis TGF- β serupa, efek *in vivo* mereka berbeda. Penelitian pada tikus telah menunjukkan bahwa setiap jenis TGF- β berperan dalam perkembangan embrio dan perkembangan fibrosis jaringan terutama disebabkan oleh TGF- β 1.³² Sistem imunitas sel terutama menghasilkan TGF- β 1 yang secara normal ditemukan dalam plasma dan terikat dengan protein ECM di seluruh tubuh.²⁵ TGF- β disekresi dalam bentuk tidak aktif, aktivasinya diperantarai oleh *matrix metaloproteinases* yaitu MMP9 dan MMP2 dengan perubahan pH (kondisi asam), ROS, trombospodin-1,

kekakuan jaringan, integrin $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 6$ dan $\alpha V\beta 8$, yang keseluruhannya berperan penting terhadap gangguan fibrosis (**Gambar 2.6.**).³³

Smad2 dan smad3 adalah mediator penting dalam proses fibrogenesis dan EMT.³³ Bentuk aktif TGF- β berinteraksi dengan sejumlah reseptor treonin/serin yang berhubungan dengan molekul reseptor *activin receptor like kinases* (ALK). TGF- β receptor 1 (ALK5) berinteraksi dengan smad yang merupakan *cytoplasmic transducer protein* dan memfosforilasi smad2 serta smad3. Smad3 merupakan elemen penting dalam TGF- β *signal transduction pathway* yang terlibat dalam proses fibrosis.³¹ TGF- β adalah faktor profibrotik mayor, menginduksi endotelin 1 yang berperan dalam perkembangan fibrosis pada skeloderma. Selain itu TGF- β juga menginduksi CTGF yang terlibat proses penyembuhan luka. Bila produksi TGF- β berlebihan, akan timbul kolagen dan penumpukan matriks pada organ target. Inflamasi, iskemia, radiasi dan toksin adalah faktor pemicu fibrogenesis yang dapat terjadi pada organ paru, hati, jantung, ginjal dan organ-organ lain.³⁴

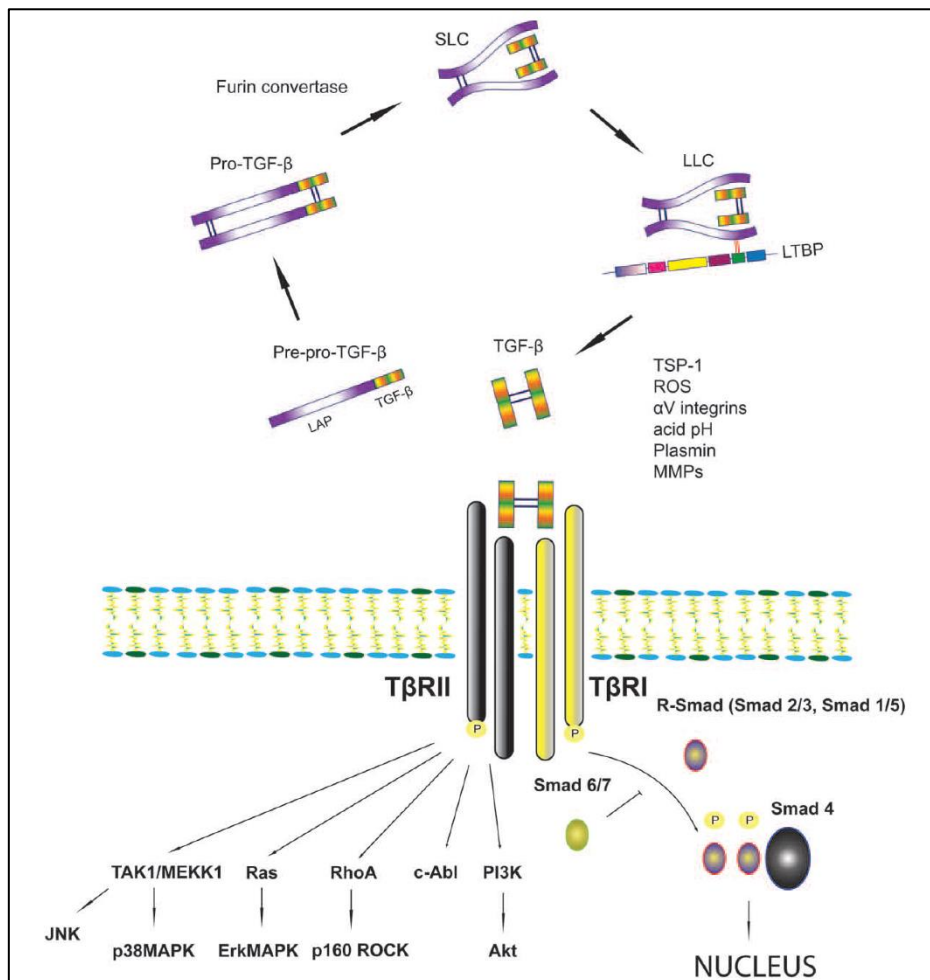


Gambar 2.6. Mekanisme Aktivasi Latent TGF- β 1 (TGF- β 1-LAP)³³

2.2.1 Mekanisme Aktivasi TGF- β 1

TGF- β diproduksi oleh banyak jenis sel sebagai kompleks laten yang tidak aktif. Pengaktifan sinyal TGF- β diatur dengan konversi TGF- β laten menjadi TGF- β

aktif. Afinitas tinggi antara TGF- β dan reseptornya, pengaktifan sebagian kecil TGF- β laten ini, menghasilkan respons selular maksimal. *The inducible matricellular protein thrombospondin* (TSP)-1 memengaruhi TGF- β , mengubah bentuk, sehingga dapat diakses oleh reseptornya. Modifikasi struktur TGF- β 1 dapat dilakukan oleh radikal hidroksil ROS dan integrin reaktif. Integrin α V β 6 adalah integrin pertama yang dapat mengaktifkan TGF- β 1 tanpa pembelahan proteolitik. Protease termasuk plasmin, matriks metaloproteinase (MMP)-2 dan MMP-9, diketahui dapat mengubah TGF- β laten, degradasi matriks dengan aktivasi molekul yang memiliki peran utama dalam menjaga integritas dan stabilitas matriks. Selain itu lingkungan yang agak asam juga dapat menginduksi aktivasi TGF- β , seperti yang terlihat di Gambar 2.7.³²



Gambar 2.7. Mekanisme Aktivasi TGF- β 1³²

Aktivasi TGF- β 1 membutuhkan pembebasan dimer TGF- β 1 dari kompleks laten yang tidak aktif dengan LAP. Sinyal TGF- β melalui jalur *smad-dependent* dan *smad-independent*. Aktivasi jalur ALK5 /Smad3 memiliki peran utama dalam proses fibrosis.

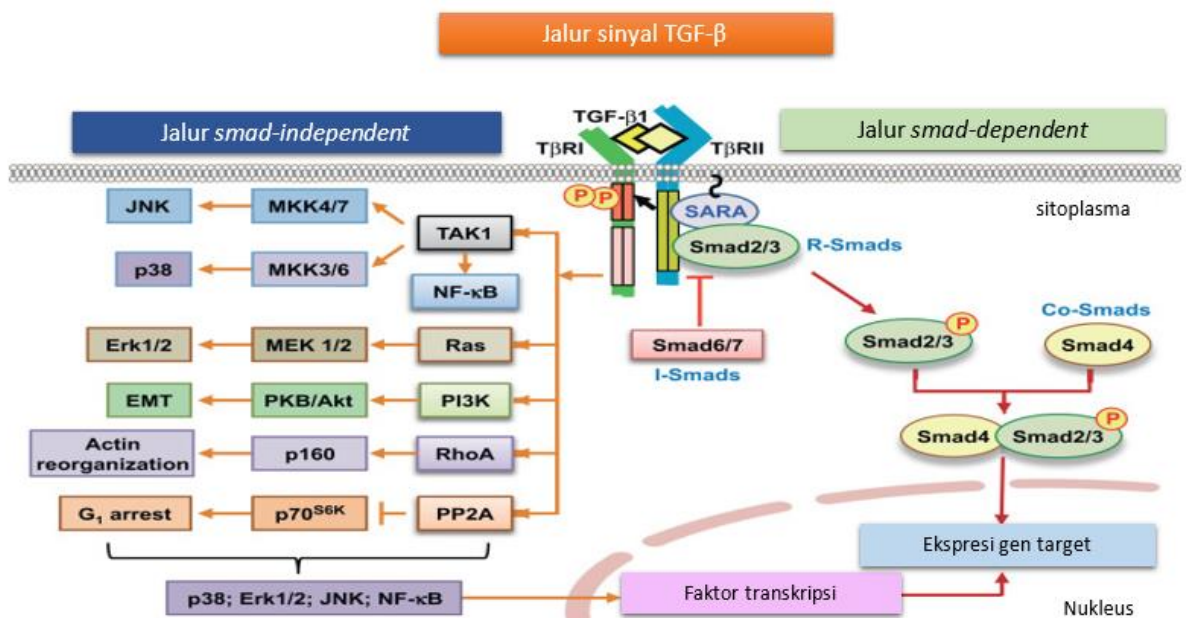
2.2.2 Sinyal TGF- β 1: Jalur Smad-*dependent* dan Smad-*independent*

Kelompok TGF- β mendapatkan sinyal melalui kode yang berbeda dari reseptor transmembran tipe I (T β RI) dan tipe II (T β RII). Reseptor tipe I dan tipe II adalah serin/treonin kinase yang membentuk kompleks heteromer. Sebagai respons terhadap ikatan ligan pada reseptor tipe II, kompleks yang stabil dengan reseptor tipe I terbentuk sehingga memungkinkan transfosforilasi, yang dapat mengaktifkan kinase reseptor tipe I. Di antara tujuh jenis reseptor mamalia, ALK5 diekspresikan pada banyak jenis sel yang berbeda dan digunakan oleh TGF- β 1 untuk pemberian sinyal. Sinyal TGF- β 1 yang berperan pada sel endotel dan melalui reseptor TGF- β tipe II adalah ALK1. Ada reseptor tambahan untuk TGF- β , seperti reseptor β -glycan tipe III dan endoglin yang dapat membantu modulasi sinyal melalui reseptor tipe I dan II.³²

Jalur sinyal TGF- β melibatkan aktivator transkripsi dari kelompok smad. Smad adalah suatu protein pengubah sinyal TGF- β ligan yang mengatur proliferasi sel, diferensiasi dan kematian sel melalui aktivasi reseptor serine kinase. Fosforilasi R-Smads menuju pembentukan kompleks Co-Smad dalam inti sel. Kompleks Smad yang mengikat DNA berperan sebagai faktor transkripsi untuk mengatur ekspresi gen target. *Inhibitory Smads* (I-Smads) menghalangi fosforilasi R-Smads dan degradasi kompleks reseptor, sehingga sinyal terhambat.³⁵ Delapan Smads mamalia dapat dikelompokkan menjadi tiga kelas fungsional yaitu Smads yang mengaktifkan reseptor (R-Smads, Smad1, 2, 3, 5 dan 8), Smad sebagai mediator (Co-Smad, Smad4) dan Smads penghambat (I-Smads, Smad6 dan 7). R-Smads, Smad2, dan Smad3 difosforilasi langsung oleh ALK5, sedangkan Smad1, Smad5 dan Smad8 diaktifkan oleh ALK1. R-Smads membentuk kompleks dengan Co-Smad, Smad4 yang translokasi ke nukleus, kemudian mengaktifkan dan menekan proses transkripsi gen. I-Smads seperti Smad6 dan Smad7 berfungsi sebagai penghambat sinyal TGF- β dengan mengikat reseptor tipe I (Smad7) atau dengan berkompetisi dengan R-Smads yang diaktifkan untuk mengikat Co-Smad dan Smad4 (Smad6). Ekspresi Smad6 diinduksi oleh Smads1 dan 5, sedangkan ekspresi Smad7 dipicu oleh Smad3 sehingga menghasilkan *loop* umpan balik yang menekan efek TGF- β (Gambar 2.8.).³²

Awal kaskade sinyal TGF- β terjadi saat ikatan ligan dengan reseptor TGF- β tipe II (T β RII) dan kemudian membentuk formasi dengan T β RI. T β RII adalah reseptor kinase aktif yang memfosforilasi serin/treonin. Aktivasi T β RI mengirimkan sinyal ke

beberapa jalur sinyal Smad dan Smad-independen intraselular. Jalur utama Smad melibatkan aktivasi Smad2/3 dan fosforilasi dengan mengaktifkan T β RI dan membutuhkan aktivitas kinase T β RI. Penarikan Smad 2/3 ke kompleks reseptor difasilitasi protein SARA. Perekrutan Smad2/3 untuk reseptor kompleks diperantarai oleh protein bantu, seperti SARA. Smad2/3 kemudian dilepaskan dari kompleks reseptor untuk berinteraksi dengan Smad4, mengirimkan sinyal TGF- β 1. Penelitian Li Gu menyatakan bahwa ekspresi Smad3 berlebihan dapat meningkatkan aktivitas TGF- β 1 dan ekspresi protein α -SMA secara *in vitro*.³⁶ TGF- β 1 juga mengaktifkan beberapa jalur sinyal Smad-independent, termasuk TAK1, Ras, PI3K/AKT, RhoA, and PP2A, yang memicu aktivasi beberapa sinyal antara (Gambar 2.8).³⁷



Gambar 2.8. Jalur Sinyal TGF- β 1³⁷

Selain aktivasi kaskade melalui jalur Smad, TGF- β juga dapat memberi sinyal melalui jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). MAPK adalah protein kinase serin / kinase spesifik yang respons terhadap rangsangan mitogenik dan stres ekstraselular, mengatur diferensiasi, proliferasi, kelangsungan hidup sel dan apoptosis. TGF- β dapat mengaktifkan ketiga jalur MAPK yaitu *extracellular signal regulated kinase* (ERK), *p38 mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan *c-Jun-N-terminal kinase* (JNK). Sinyal melalui jalur tersebut dapat mengatur protein Smad, dan memfasilitasi

respons TGF- β melalui jalur *Smad-independent*. Aktivasi ERK akan meningkatkan atau menurunkan sinyal Smad sedangkan p38 MAPK dan JNK sangat respons terhadap Smad dan TGF- β . Selain Smad dan MAPK, TGF- β dapat mengaktifkan PI3 kinase/Akt, *abelson nonreceptor tyrosin kinase* (c-Abl), dan jalur Rho GTPase.³²

2.2.3 Efek TGF- β 1 pada Fungsi dan Fenotip Fibroblas

Setelah stimulasi TGF- β , fibroblas diaktifkan dan menjalani transisi fenotip ke miofibroblas. Fenotip miofibroblas ditandai dengan pembentukan sel yang berhubungan dengan protein kontraktil seperti α -SMA dan *non-muscle* miosin, memiliki kemampuan sintesis dan sekresi matriks ekstraselular serta resisten terhadap apoptosis.³⁸ TGF- β menginduksi sintesis α -SMA membutuhkan Smad3, yang juga melibatkan FAK, JNK, TAK dan PI3 kinase/Akt *pathway*. Dalam penyembuhan luka, miofibroblas diperlukan untuk perbaikan jaringan, sedangkan dalam kondisi patologis, miofibroblas aktif menjadi efektor selular proses fibrosis. Miofibroblas yang diaktifkan berasal dari *resident fibroblast*. Fibroblas dapat berasal dari *pericytes* dan sel progenitor sumsum tulang. Selain sel mesenkim, miofibroblas dapat berasal dari EMT. TGF- β mempunyai peran penting dalam EMT melalui efek yang melibatkan sinyal Smad. Selain itu, aktivasi jalur MAPK Ras-Erk, M38 dan MAPK, Rho GTPase serta jalur PI3 kinase / Akt mungkin terlibat dalam EMT yang diinduksi oleh TGF- β (**Gambar 2.7.**). Hasil penelitian membuktikan bahwa EMT memiliki peran penting pada fibrosis ginjal, paru dan hati. Selain perannya dalam diferensiasi miofibroblas, TGF- β merangsang transkripsi gen kolagen tipe I melalui jalur Smad3. TGF- β juga menekan aktivitas MMP dan menginduksi sintesis *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (PAI-1) dan *Tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMPs).¹⁷ Studi Kenyon et al.³⁹ pada paru tikus model menunjukkan peningkatan mRNA kolagen I dan III 7 hari setelah pemberian TGF- β 1 secara intratrakeal dan kolagen total setelah 4 minggu kemudian.³⁹ Warshamana et al.⁴⁰ menemukan bahwa pemberian 10^8 dan 10^9 pfu adenovirus TGF- β 1 menyebabkan terjadinya IPF derajat berat setelah 4 hari diberikan, dibandingkan bila diberikan sebanyak 10^6 pfu.

2.3 Mekanisme Matriks Ekstraselular pada Fibrosis

Perbaikan jaringan bertujuan mengembalikan sifat pelindung matriks ekstraselular. Mekanisme berlebihan remodeling jaringan yang melibatkan aktifnya sel stroma

akan menyebabkan terjadinya kekakuan jaringan akibat penumpukan matriks dan berkembangnya fibrosis. Hipotesis yang berkembang saat ini adalah terjadinya kerjasama antara matriks ekstraselular dan TGF- β 1 untuk mengatur aktivitas remodeling sel stroma. TGF- β 1 disimpan dalam matriks sebagai kompleks laten besar dan dapat diaktifkan dengan kekuatan kontraktif sel yang ditransmisikan oleh integrin. Matriks yang kaku menurunkan ambang batas aktivasi TGF- β 1 dengan meningkatkan ketahanan mekanis penarikan sel. Unsur yang berbeda dari mekanisme tersebut secara farmakologis dapat mengganggu umpan balik positif mekanisme fibrosis, termasuk integrin spesifik dan interaksi protein matriks.³³

Penyembuhan luka dan proses perbaikan jaringan sebagai respons terhadap cedera organ, bertujuan mengembalikan fungsi proteksi matriks ekstraselular. Pembekuan darah yang melibatkan fibrinogen adalah salah satu respons pertama terhadap kerusakan pembuluh darah. Peran utama sel inflamasi selain melawan mikroorganisme dan membersihkan kotoran, juga merangsang ECM utk membentuk jaringan parut kolagen. Perbaikan jaringan berkembang cepat, namun fungsi organ yang luka tidak sepenuhnya pulih pada manusia dewasa. Contohnya, bekas luka kulit tidak mengandung kelenjar dan folikel rambut, jaringan parut akan terbentuk setelah infark miokard, jejas paru akan mengganggu pertukaran gas, ginjal sklerotik akan mengganggu proses filtrasi dan kolagen di hati mengganggu fungsi hepatosit. Aktivitas ECM dari sel fibroblas yang bersifat fibroproliferatif akan membentuk jaringan parut kaku yang tidak berfungsi serta mengganggu fungsi organ normal. Bekas luka yang kaku mengganggu kontraksi jantung normal dan respirasi. Untuk mengukur kekakuan organ dengan mengidentifikasi permukaan jaringan melalui pemeriksaan *atomic force microscope* (AFM). AFM menilai sifat jaringan pada tingkat persepsi sel. Organ yang sangat lunak diukur dengan AFM adalah sumsum tulang, otak, jaringan kelenjar susu dan lemak. Organ lunak adalah kulit, hati dan parenkim paru. Jaringan otot, tulang dan gigi adalah organ kaku.³³

2.3.1 Komposisi Matriks Ekstraselular pada Fibrosis

Matriks ekstraselular adalah jaringan tiga dimensi yang heterogen, sangat dinamis, memberikan dukungan struktur sel selama perkembangan embrio, perbaikan luka, dan homeostasis jaringan. Pada paru manusia, ECM terutama terdiri atas kolagen

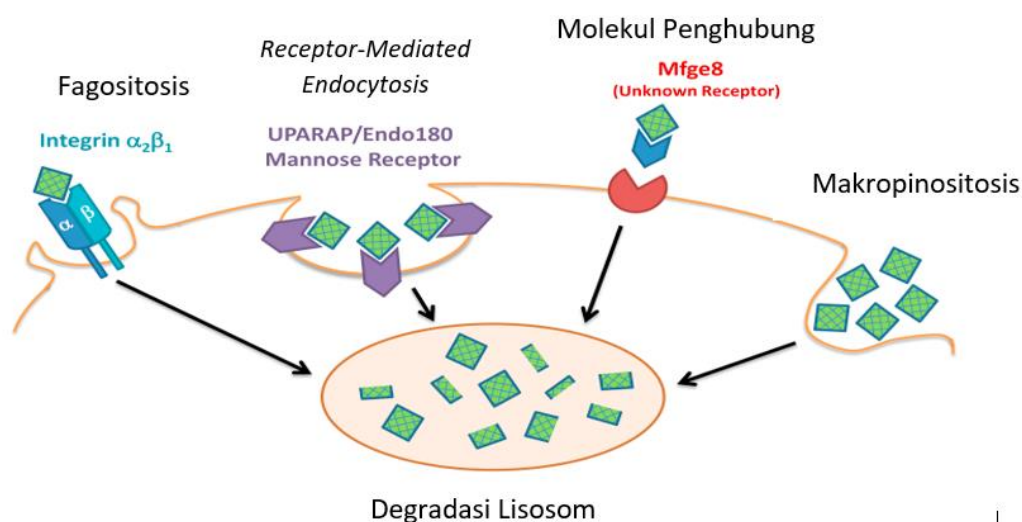
tipe I dan III dengan rasio sekitar 2 : 1, mengandung elastin, membentuk kerangka struktural dan elastisitas dinding alveoli. Laminin dan kolagen IV ditemukan pada membran basal alveoli dan saluran napas serta ditemukan pada paru pasien asma yang ditandai dengan penebalan membran basal dan penurunan fungsi paru.⁴¹ Studi komposisi ECM pada pasien dengan penyakit fibrosis menunjukkan peningkatan kolagen tipe I dan III total pada tahap awal fibrosis paru, dengan kolagen tipe III yang dominan pada septum alveoli dan interstitium. Pada lokasi jaringan parut yang sudah lama (IPF), 80% kolagen yang ditemukan adalah kolagen tipe I. Kandungan ECM lainnya meliputi jenis kolagen V, VI, dan VII, fibronektin, elastin, *tenascin C*, hialuronan, serta *glycosaminoglycans*.^{23,42} Pada keadaan fibrosis, selain akumulasi ECM juga terjadi perubahan komposisi protein penyusun jaringan ikat. Dalam kondisi normal, ECM tersusun dari protein membran dengan kandungan utama kolagen tipe IV. Sebaliknya, dalam keadaan fibrosis lebih didominasi oleh kolagen fibrilar (tipe I > tipe III > tipe IV) dan juga ditemukan material protein non kolagen yaitu glikoprotein dan proteoglikan.⁹

2.3.2 Jalur Ekstraselular dan Intraselular Degradasi Matriks Ekstraselular

Jalur ekstraselular degradasi matriks ekstraselular terjadi melalui proses bertahap yang melibatkan enzim protease, pengenalan fibril oleh membran reseptor dan degradasi matriks oleh lisosom intraselular. MMPs adalah enzim endopeptidase yang mengandung seng dan kalsium, diproduksi oleh jaringan ikat dan sel inflamasi. MMPs menurunkan kadar ECM, termasuk kolagen dan elastin. Penelitian *in vitro* kolagenase, yang meliputi MMP-1, MMP-8, dan MMP-13, dapat mengurangi jaringan fibrosis akibat tingginya kolagen tipe 1. Fragmen kolagen yang pecah dihidrolisis menjadi gelatin, terdegradasi oleh gelatinase, khususnya MMP-2 dan MMP-9. Metalloelastase (MMP-12) memiliki aktivitas menurunkan kadar elastin. Kim et al.⁴³ menemukan peningkatan kadar MMPs dalam cairan BAL yang diperiksa secara *zymography* dari hari ke-1 sampai 28 setelah pemberian bleomisin intratrakeal. Enzim *lysyl oxidase* 1-4 dapat berikatan dengan kolagen atau elastin. Penghambatan *lysyl oxidase* dapat mengurangi fibrosis miokard dan mencegah fibrosis paru yang diinduksi oleh bleomisin (uji fase 2 pada IPF). *Lysyl oxidase* (LOX) adalah suatu enzim *copper dependent amine oxidase* yang membentuk kelompok aldehid reaktif dari *peptidyllysines* dengan cara

deaminasi oksidatif. LOX berperan penting dalam meningkatkan aktivasi fibroblas menjadi miofibroblas pada kulit, jantung, hati, ginjal dan paru.⁴⁴ Jalur intraselular masih kurang diteliti dibandingkan dengan jalur ekstraselular. Proses degradasi kolagen intraselular meliputi pengenalan dan internalisasi fragmen kolagen, didegradasi oleh proteinase sistein dalam lisosom (**Gambar 2.10.**)²³

Dibandingkan dengan kontrol, tikus yang kekurangan reseptor *urokinase plasminogen activator* menunjukkan peningkatan kadar hidroksi prolin paru total 28 hari setelah induksi bleomisin tanpa mengganggu proses peradangan atau sintesis kolagen. Internalisasi kolagen difasilitasi oleh jalur makropinositik, fagositik, dan endositik dimana fragmen akhirnya terdegradasi oleh lisosom.²³



Gambar 2.10. Internalisasi Kolagen Jalur Makropinositik, Fagositik, dan Endositik Fragmen²³

2.3.3 Degradasi Miofibroblas

Miofibroblas adalah sel yang terdiferensiasi dari fibroblas dan sel otot polos, ditandai oleh morfologi *spindle*, stellata dengan serat stres intrasitoplasmik, fenotip kontraktil, dan ekspresi α -smooth muscle actin (α -SMA). Miofibroblas sangat penting dalam penyembuhan luka normal dengan terlibat dalam penutupan luka dan sintesis protein ECM. Respons berlebihan miofibroblas pada jaringan luka menyebabkan fibrosis paru yang progresif. Miofibroblas merupakan pemicu utama fibrosis, pemulihan akan berhasil tergantung pada penghambatan diferensiasi

miofibroblas aktif. Diferensiasi miofibroblas dipicu oleh beberapa mediator, termasuk sitokinin, faktor pertumbuhan, dan komposisi ECM. Walaupun diferensiasi dapat dihambat, miofibroblas yang persisten dapat menginduksi menetapnya fenotip miofibroblas dan menginduksi sel tetangga menjadi sel fibrotik dan disfungsi melalui mekanisme *up-regulation* gen profibrotik. Ada tiga mekanisme molekular utama dalam eliminasi miofibroblas yaitu *dedifferentiation*, apoptosis, dan penuaan yang diharapkan dapat membantu pengembangan terapi antifibrosis baru.²³

2.3.4 Peran *Dedifferentiation* dalam Degradasi Miofibroblas

Sel yang mengalami *dedifferentiation* adalah regresi sel kembali ke tahap perkembangan sebelumnya, sebuah proses yang dalam kasus ekstrem menganut *pluripotency*. Mekanisme yang mendasari *dedifferentiation* spesifik sel telah ditunjukkan dalam perkembangan biologi, obat degeneratif dan tumorigenesis. Diferensiasi miofibroblas sebelumnya dianggap ireversibel, namun penelitian pada model hati tikus yang mengandung karbon tetraklorida atau alkohol menunjukkan bahwa fenotip miofibroblas dapat reversibel/pulih spontan. Faktor dan mekanisme yang memengaruhi *dedifferentiation* miofibroblas paru *secara in vitro* dapat dilihat pada Tabel 2.1. MyoD menginduksi miofibroblas melalui TGF- β 1 pada fibroblas paru manusia.²³

Dedifferentiation miofibroblas oleh FGF-1, dikaitkan dengan penurunan fosforilasi Smad2. Efek *dedifferentiation* langsung dari FGF-1 dengan menghambat kerja TGF- β , pada studi miofibroblas kornea. Prostaglandin E2 (PGE2) adalah mediator lipid yang diproduksi secara endogen yang menghambat beberapa fungsi fibroblas, termasuk proliferasi, produksi kolagen, dan diferensiasi. PGE2 yang diberikan pada tikus 14 hari setelah diinjeksi dengan bleomisin, gagal memberikan efek terapeutik bermakna pada fungsi paru atau fibrosis. *Nitrated fatty acid* (NFA) adalah agonis kuat *peroxisome proliferator-activated receptor γ* , telah terbukti menunjukkan aktivitas antifibrotik pada paru melalui penghambatan Smad. Pemberian intratrakeal asam 10-nitro-oleat selama 7 hari berturut-turut dimulai 21 hari setelah injeksi bleomisin pada tikus mengurangi kadar kolagen paru dan protein α -SMA.²³

Tabel 2.1. Faktor-faktor dan Mekanisme yang Memengaruhi Diferensiasi, Apoptosis dan Penuaan Miofibroblas²³

Faktor	Mekanisme potensial	Model eksperimental	Referensi
c-FLIP	Menghambat apoptosis melalui penghambat apoptosis langsung	Tikus dan miofibroblas IPF	Golan-Gersti et al. ⁴⁵
FGF-1	Menghambat diferensiasi via <i>blocking</i> Smad2	Fibroblas manusia primer	Ramos et al. ⁴⁶
MyoD	Menginduksi diferensiasi melalui TGF- β 1	Fibroblas manusia normal	Hecker et al. ⁴⁷
NFA	Menghambat diferensiasi melalui PPAR- γ up-regulation	IPF/fibroblas manusia normal, murine <i>in vivo</i>	Reddy et al. ⁴⁸
Nox4-Nrf2	Menghambat apoptosis pada sel-sel tua melalui ketidakseimbangan oksidan	Mouse dan IPF miofibroblas, murine <i>in vivo</i>	Hecker et al. ⁴⁹
Nrf2	Menghambat diferensiasi melalui stres antioksidan	IPF/fibroblas manusia normal	Artaud-Macari et al. ⁵⁰
PAI-1	Menghambat apoptosis pada sel-sel tua melalui sensitivitas TGF- β 1	Fibroblas murine dan <i>in vivo</i>	Huang et al. ⁵¹
PGE2	Menghambat diferensiasi via aktivasi FAK	Fibroblas manusia normal	Garrison et al. ⁵²
Rho/ROCK	Menginduksi diferensiasi dan kelangsungan hidup melalui MKL1	IPF/fibroblas manusia normal, murine <i>in vivo</i>	Zhou et al. ⁵³
SRF/MRTF	Menginduksi diferensiasi dan kelangsungan hidup melalui XIAP dan PAI-1	Fibroblas normal, murine <i>in vivo</i>	Sisson et al. ⁵⁴
Survivin	Menghambat apoptosis melalui inhibitor apoptosis langsung	Fibroblas manusia normal	Horowitz et al. ⁵⁵
TGF- β 1	Menghambat apoptosis melalui pensinyalan PI3K	IPF/fibroblas manusia normal	Kulasekaran et al. ⁵⁶
Mu-1	Menginduksi diferensiasi jika dibungkam secara epigenetik	Tikus dan miofibroblas manusia	Sanders et al. ⁵⁷
XIAP	Menghambat apoptosis melalui inhibitor apoptosis langsung	IPF/fibroblas manusia normal	Ajayi et al. ⁵⁸

c-FLIP, protein penghambat enzim pengubah IL-beta seperti C1-Fas; FGF, faktor pertumbuhan fibroblas; IPF, fibrosis paru idiopatik; MRTF, faktor transkripsi myocardin; MyoD, protein penentuan myoblast 1; NFA, asam lemak nitrat; Nrf2, faktor terkait eritroid 2; PAI, penghambat aktivator plasminogen; PGE, prostaglandin E; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PPAR, peroksisom proliferasi-activated receptor; ROCK, kinase terkait Rho; SRF, faktor respons serum; TGF, transforming growth factor; XIAP, X-linked inhibitor apoptosis.

2.4 Pengaruh Anti TGF- β 1 pada Paru yang Mengalami Fibrosis serta Pencegahannya

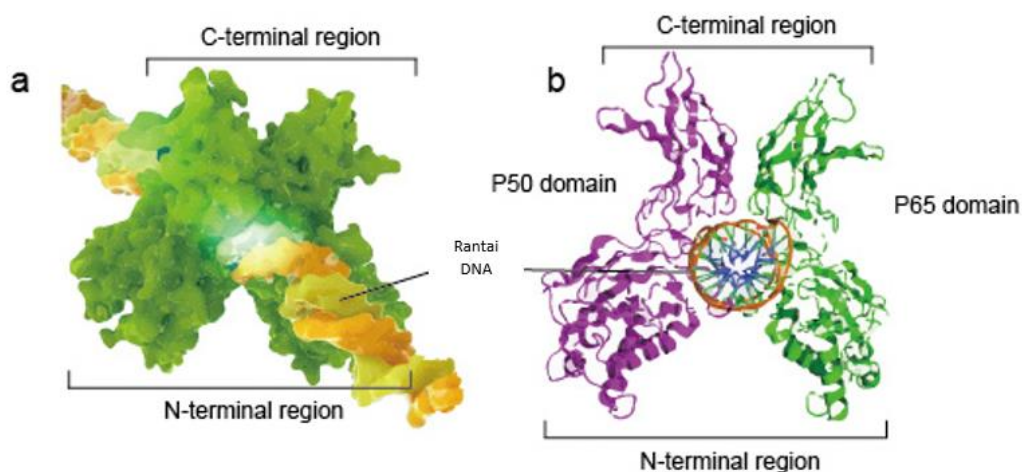
Saat ini ada 3 strategi utama yang dilakukan untuk menghambat TGF- β dalam proses fibrosis yaitu menghalangi ligan TGF- β , menghambat aktivasi TGF- β reseptor (T β R) dan menghambat secara selektif transduksi sinyal intraselular melalui Smads atau koaktivator. *Isotype-specific neutralizing antibodies, soluble T β R1-3 receptors, α v β 6 integrin antibody, natural TGF- β binding protein/decorin* bekerja menghalangi ligan TGF- β . *Orally active small molecule T β R kinase* menghambat aktivasi reseptor TGF- β . *Physiologic endogenous inhibitor Smad7* menghambat fungsi Smad. *Aptamers (Trx-SARA)* menghambat fungsi dan rekrutmen koaktivator.⁹

Beberapa penelitian yang telah dilakukan untuk melihat efek antifibrosis terhadap paru, yaitu Bonniaud et al.³¹ memberikan *active ALK5 kinase inhibitor* (SD-208) secara oral pada paru tikus model dapat menekan proses fibrosis pada hari ke-21, penelitian Dong et al.¹⁷ dengan pemberian sel punca pada paru fibrosis akibat induksi radiasi 15 Gy dapat mengurangi kadar TNF- α dan TGF- β 1. Wang et al.⁴⁴ mengungkapkan bahwa pemberian paclitaxel dosis rendah secara *in vitro* dapat menekan jalur Smad3 TGF- β 1 melalui *miR-140 upregulation*, studi Hostettler et al.⁵⁹ mengungkapkan pemberian nintedanib konsentrasi tinggi 1 μ M dapat mencegah sekresi kolagen yang diinduksi TGF- β pada pasien IPF. Penelitian Scotton⁶⁰ menggunakan antibodi yang langsung melawan TGF- β 1 dilakukan pada uji klinis fase 1 dapat menjadi terapi yang menjanjikan karena TGF- β 1 merupakan sitokin yang paling penting dalam proses fibrosis. Antibodi langsung melawan CTGF juga diteliti dan telah masuk ke tahap uji klinik fase 2. MacKinnon et al.⁶¹ mengidentifikasi inhibitor galectin-3, suatu *β -galactoside binding lectin* yang banyak ditemukan pada jaringan fibrotik paru dan mengurangi progresivitas fibrosis paru tikus model. Pemberian IL-7 dapat mengurangi fibrosis yang diinduksi bleomisin pada paru tikus model.⁶² Anti TGF- β dapat mencegah fibrosis pada paru tikus model yang mengalami *Sclerodermatous Graft-Versus-Host-Disease*.⁶³

2.5 Peran NF- κ B dalam Sistem Regulator Sistem Imunitas dan Respons Inflamasi

NF- κ B merupakan sejenis protein regulator sistem imunitas dan respons inflamasi. Aktivasi NF- κ B membutuhkan fosforilasi protein I κ B untuk memberikan respons

terhadap berbagai macam reseptor seperti sel T, sel B, TNF, TLR/IL-1R. Pada golongan mamalia jenis protein yang ditemukan adalah p50, p52 dan p65 NF- κ B. NF- κ B mengaktivasi gen target melalui pengikatan DNA.⁶⁴ NF- κ B berperan penting dalam hampir semua sel mamalia yaitu mengontrol transkripsi DNA, produksi sitokin, kelangsungan hidup sel dan peran penting dalam regulasi respons imun terhadap infeksi. Struktur molekul khas NF- κ B adalah dimer P50-P65 (NF- κ B1/RelA). Pembentukan dimer diperlukan untuk pengikatan DNA dan dua monomer NF- κ B mengikat DNA sebagai dimer. Bagian N-terminal dimer bertanggung jawab untuk kontak DNA spesifik. Bagian C-terminal bertanggung jawab untuk dimerisasi dan kontak DNA fosfat yang tidak spesifik. Seluruh molekul NF- κ B pada rantai DNA, berfungsi sebagai faktor transkripsi (**Gambar 2.11.**)⁶⁵⁻⁶⁷

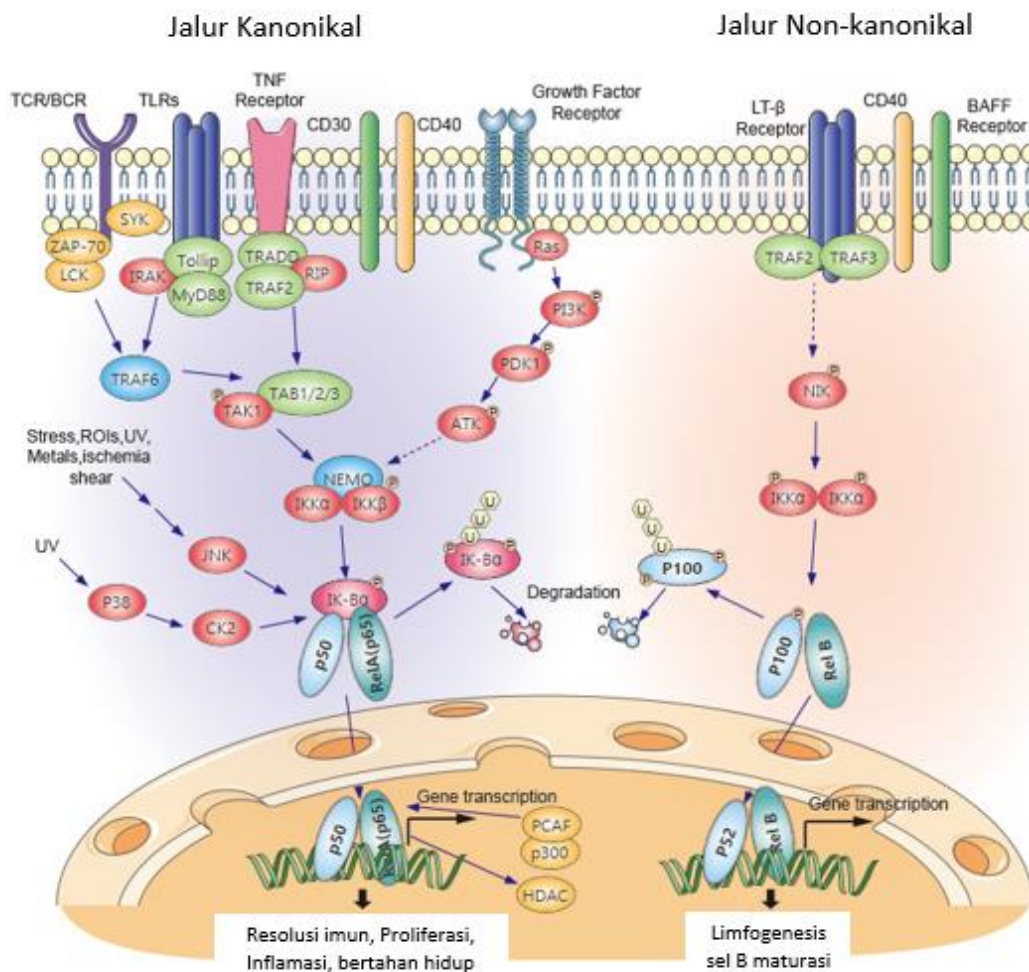


Gambar 2.11. Struktur NF- κ B⁶⁴

Keluarga faktor transkripsi NF- κ B dalam mamalia terdiri atas lima protein yaitu NF- κ B1/P50, NF κ B2/P52, RelA/ P65, RelB dan c-rel. Kelima protein ini berhubungan satu dengan lainnya membentuk kompleks homo/heterodimerik transkripsional dan memiliki *rel homology domain* (RHD). Domain RHD ini memiliki beberapa fungsi seperti dimerisasi, perlekatan ke DNA, interaksi dengan I κ B dan translokasi nuklear. Bentuk dimer NF- κ B yang paling banyak adalah p50/p65 heterodimer yang ditemukan pada hampir semua sel.⁶⁵⁻⁶⁷

NF- κ B dimer yang merupakan faktor transkripsi inti sel akan berfungsi dengan cara migrasi ke nukleus untuk berinteraksi dengan DNA. Sebagian besar sel normal dalam keadaan istirahat, NF- κ B tidak aktif dan bertahan dalam sitoplasma dengan

melekat pada protein spesifik inhibitor yaitu protein IK-B, yang melekat pada *red homology domain* (RHD) dari NF- κ B dan mengganggu fungsi *nuclear localization sequence* (NLS). Untuk mengaktivasi molekul NF- κ B, pertama sel harus memisahkan protein NF- κ B dari inhibitorynya.⁶⁵⁻⁶⁷ Aktivasi NF- κ B melibatkan dua jalur sinyal utama, jalur kanonik dan non-kanonik atau alternatif. Keduanya menjadi penting untuk mengatur respons imun dan inflamasi meskipun mereka berbeda dalam mekanisme jalur sinyal. Jalur kanonik NF- κ B merespons beragam rangsangan, termasuk ligan berbagai reseptor sitokin, TNF *receptor* (TNFR), reseptor sel-T (TCR) dan reseptor sel-B. Mekanisme utama untuk aktivasi jalur kanonik NF- κ B adalah degradasi IK-B α melalui fosforilasi dengan I κ B kinase (IKK) kompleks. IKK terdiri atas dua subunit katalitik, IKK α dan IKK β . IKK dapat diaktifkan oleh rangsangan yang berbeda, termasuk sitokin, faktor pertumbuhan, mitogen, komponen mikroba dan stres (**Gambar 2.12.**)⁶⁴



Gambar 2.12. Jalur Kanonik dan Non-kanonik NF- κ B⁶⁴

Berbeda dengan jalur NF- κ B kanonik, jalur NF- κ B non-kanonik secara selektif merespons terhadap kelompok rangsangan tertentu, termasuk ligan subset anggota superfamili TNFR seperti LT β R, BAFFR, CD40 dan RANK. Selain aktivasi NF- κ B, non-kanonik tidak melibatkan degradasi IK-B α tetapi lebih bergantung pada pemrosesan protein prekursor NF- κ B2, p100. NF- κ B kanonik terlibat dalam hampir semua aspek respons imun, sedangkan jalur NF- κ B non-kanonik tampaknya berevolusi sebagai sumbu sinyal tambahan yang bekerja sama dengan jalur NF- κ B kanonik dalam regulasi fungsi tertentu sistem kekebalan tubuh adaptif.⁶⁴

2.6 Gambir sebagai Antioksidan dan Anti Inflamasi

Pilihan penanganan yang tepat pada penyakit fibrosis paru masih menjadi masalah saat ini. Penggunaan bahan kimia yang cukup efektif untuk pengobatan fibrosis paru tidak selalu memberikan hasil bermakna secara konsisten disebabkan adanya efek samping.⁹ Beberapa cara yang dilakukan untuk mencegah dan mengurangi fibrosis paru telah banyak dilakukan dengan menggunakan obat-obatan yang berinteraksi dengan TGF- β dan berpotensi mengaktivasi antifibrosis. Obat-obat yang telah diujicobakan adalah *tranilast* (menghambat aktivitas dan sekresi TGF- β), losartan (blokade induksi TGF- β), *HMGcoA reductase inhibitor/statin* (blokade stimulasi sintesis kolagen), *imatinib mesylate* (blokade sinyal TGF- β), *PPAR- γ agonists* (merusak transduksi sinyal Smad3), pifenidon (menghambat produksi TGF- β) dan halofuginon (belum diketahui secara jelas).⁹ Keterbatasan efektivitas bahan kimia dalam mengatasi kondisi fibrosis paru, menyebabkan penggunaan bahan alam menjadi alternatif pilihan.

Pemanfaatan bahan alam untuk pencegahan dan pengobatan penyakit paru sudah dilakukan sejak lama dan cenderung meningkat. Selain karena alasan efek toksik yang rendah, bahan alam memiliki beberapa keunggulan yaitu multitarget yang disebabkan oleh beragam kandungan senyawa aktif. Beberapa jenis tanaman memiliki khasiat sebagai pencegahan dan pengobatan gangguan paru dengan efek samping yang relatif ringan. Beberapa penelitian membuktikan bahwa senyawa fitokimia yang mempunyai efek sebagai antioksidan, berpotensi untuk digunakan dalam mengatasi perkembangan fibrosis paru pada uji *in vitro* dan *in vivo*.⁶⁸

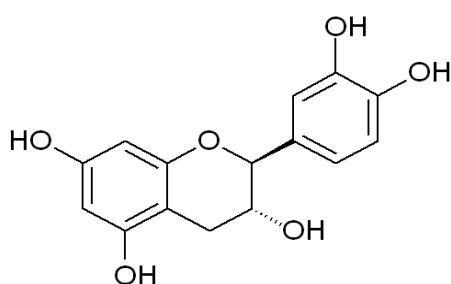
Gambir termasuk tanaman spesifik lokal asli di wilayah Asia Tenggara khususnya Indonesia dan Malaysia. Gambir mengandung senyawa polifenol dengan kandungan

utama flavonoid (+)-katekin mencapai 40–80% berat ekstrak kering, selain (-)-epikatekin 1,5%, prosianidin B1, prosianidin B3 dan gambiriin masing-masing 1%.⁶⁹ Kandungan kimia gambir yang paling banyak dimanfaatkan adalah katekin dan tanin yang merupakan bentuk polimer katekin.⁷⁰ Masyarakat memroses gambir dengan cara merebus daun dan ranting, dipres, dikisatkan dan kemudian dikeringkan. Petani mengolah gambir masih dengan cara tradisional dengan alat kempa atau kampo yang terbuat dari bilah kayu. Sentra produksi gambir di Indonesia terutama berasal dari Sumatera Barat, Riau, Sumatera Selatan, Jambi dan Bengkulu.^{71,72} Produksi gambir Indonesia mampu memenuhi 80% kebutuhan gambir dunia dengan tujuan utama adalah India, Bangladesh, Pakistan, Taiwan, Jepang, Korea Selatan, Perancis dan Swiss. Selama periode lima tahun (2000–2005) terjadi peningkatan volume ekspor sebesar 87,49%. Gambir merupakan komoditas unggulan Provinsi Sumatera Barat peringkat ke-7 penyumbang pendapatan asli daerah. Dalam perdagangan, kadar katekin menentukan kualitas gambir.

Daun dan ranting gambir diproses untuk digunakan sebagai obat sakit gigi, diare, *astringent* kulit dan penghalus kulit. Gambir juga terbukti mampu memperbaiki sindrom metabolik seperti kegemukan, normalisasi tekanan dan glukosa darah, reduksi trigliserida dan kolesterol, antibakteri, antinematoda, perbaikan pembuluh darah, perangsang saraf autonom dan obat tukak lambung.^{70,73} Gambir digunakan dalam industri sebagai bahan pewarna tekstil, penyamak kulit dan pencegah korosif pada lempengan baja.^{12,70}

Penelitian manfaat gambir sebagai antioksidan dan hepatoprotektor telah banyak dilakukan, namun khasiat gambir pada paru belum pernah diteliti. Penelitian Anggraini yang menguji khasiat antioksidan ekstrak gambir, menunjukkan bahwa konsentrasi 250 ppm dapat menghambat radikal bebas DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) sebesar 40%.⁷⁴ Kekuatan inhibisi tersebut di bawah pembanding vitamin C yaitu 50% pada 4 ppm. Hal tersebut mungkin disebabkan oleh tingkat kemurnian gambir yang rendah karena cara pengolahan masih tradisional dan kurang higienis. Edward et al.⁷⁵ yang meneliti efek hepatoprotektor gambir secara *in vivo*, menyatakan bahwa pemberian ekstrak gambir 10 mg/kg BB po selama 8 hari berturut-turut mampu menekan peningkatan kadar MDA serum dan hati akibat

induksi CCl₄ sekali. Efek katekin sebagai hepatoprotektor juga sudah dilakukan oleh peneliti sebelumnya, yaitu Siegers et al.⁷⁶ yang membuktikan bahwa pemberian (+)-katekin 100 mg/kg BB mampu memperbaiki kadar trigliserida dan hidrosiprolin hati tikus yang diinduksi kombinasi CCl₄ dan etanol. Peneliti lain menyebutkan pemberian 50 mg/kg BB katekin selama 4 minggu bersamaan dengan induksi alkohol mampu menekan aktivasi NF-κB.¹⁴ Gambir bersifat antioksidan, menghambat aktivasi NF-κB dengan menekan pembentukan kolagen, TIMP-1 melalui mekanisme fibrolisis dan fibropreventif secara *in vivo* pada hati.^{12,14} Kandungan senyawa kimia utama gambir yaitu flavonoid (+)-katekin mencapai 40–80% getah kering dan terbukti memiliki aktivitas antioksidan kuat yang hampir setara dengan vitamin C *in vitro*, serta menghambat aktivasi NF-κB *in vivo*, sehingga memungkinkan perannya sebagai terapi antifibrosis pada paru.¹³



Gambar 2.13. Struktur Gambir-Katekin⁸⁰

Merupakan Bentuk 2,3-trans flavanol dengan 2 Buah Atom C Asimetrik yaitu C2 dan C3.

Penelitian Ningsih et al.¹³ mengungkapkan bahwa ekstrak gambir terbukti mampu menekan perkembangan fibrosis hati melalui aktivitas fibrolisis pada dosis 262 mg/kg BB dan lebih baik dibanding fibropreventif pada dosis 65 mg/kg BB, karena mampu menekan ekspresi TIMP-1 dan kolagen I. Pengujian fibropreventif pada penelitian tersebut dengan menggunakan dosis 65 mg/kg BB mampu menekan luas fibrosis hati sebesar 28% setara dengan kontrol positif dan mampu menekan ekspresi TIMP-1 dan kolagen 1. Pengujian fibrolisis membuktikan bahwa ekstrak gambir dosis 262 mg/kg BB mampu menekan persentase luas fibrosis hati sebesar 72% serta menghambat ekspresi TIMP-1 dan kolagen I. Aktivitas antioksidan ekstrak gambir (EG) terbukti mampu menekan perkembangan fibrosis hati yaitu aktivitas fibrolisis pada dosis 262 mg/kg BB lebih baik dibanding fibropreventif pada dosis 65 mg/kg BB karena mampu menekan ekspresi TIMP-1 dan kolagen I.

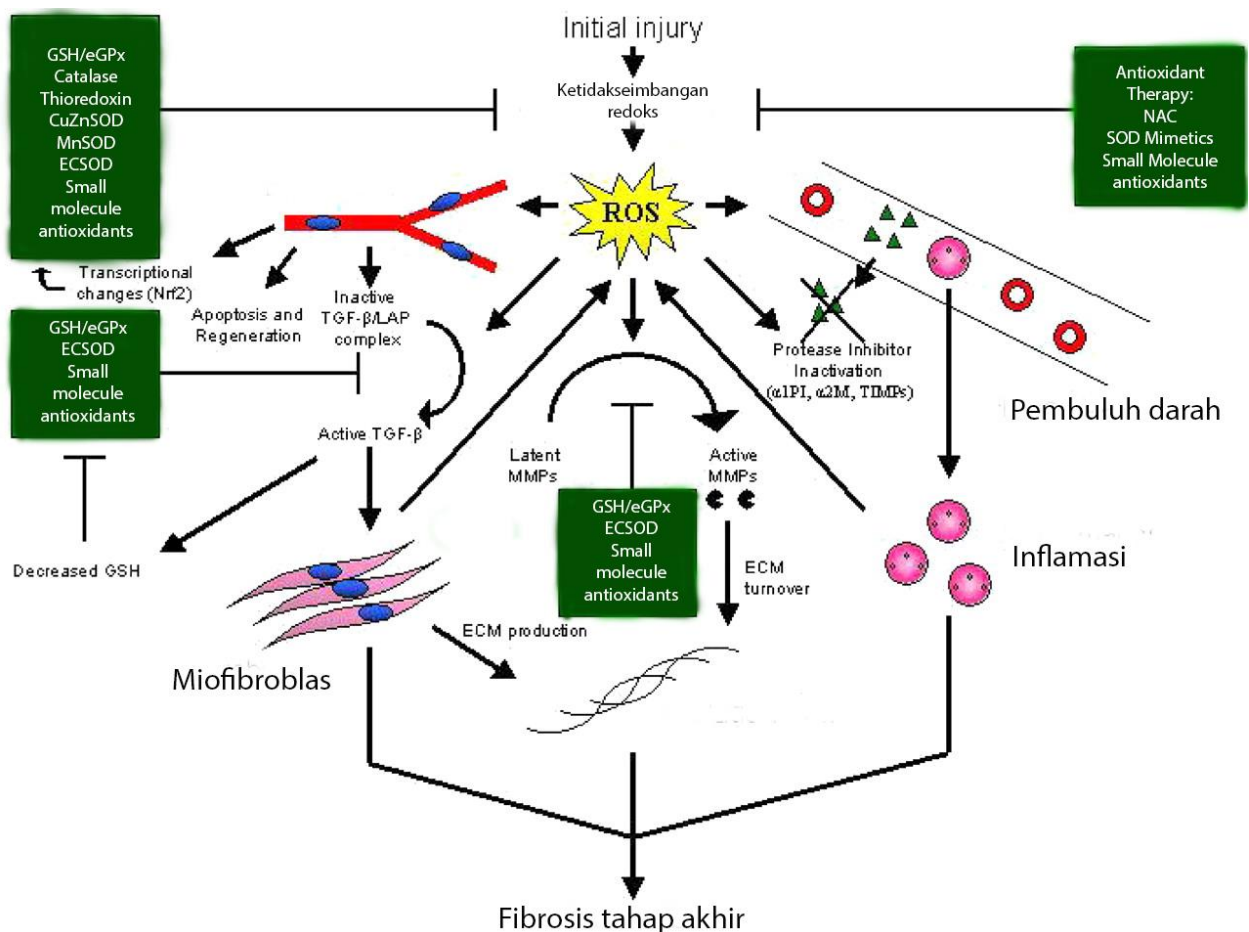
Pengujian aktivitas antiperoksidase lipid *in vitro* digunakan untuk pengujian aktivitas antifibrosis secara *in vivo* dengan parameter yang diukur adalah produk metabolit peroksidase lipid malondialdehid (MDA). Aktivitas senyawa flavonoid dalam melindungi kerusakan lipid dari proses oksidasi kemungkinan disebabkan oleh mekanisme pencegahan pembentukan radikal bebas, mengkhelat ion metal *divalent* yang digunakan sebagai induksi oksidasi, interaksi dengan senyawa induktor misalnya askorbat, inhibisi enzim yang terlibat dalam produksi radikal bebas seperti *xantin oksidase* dan autofagi. Uji toksisitas ekstrak gambir secara *in vitro* telah dilakukan pada sel normal Vero (ginjal monyet) yang menghasilkan nilai $IC_{50} > 80$ ppm, termasuk dalam kategori kurang toksik.¹³

Paru memiliki antioksidan yang sangat spesifik untuk melindungi terhadap ROS dan RNS, termasuk antioksidan seperti *glutathione*, vitamin, asam urat, mucin, protein pengikat logam seperti transferin, laktoferin, *metallothionein*, *superoxide dismutase* (SOD) seperti MnSOD, CuZnSOD dan SOD ekstraselular (ECSOD), sekelompok enzim yang menguraikan H_2O_2 , sistem enzim detoksifikasi misalnya *glutathione S-transferase* dan protein *thiol* regulator redoks seperti sistem thioredoxin-peroxiredoxin dan glutaredoxins. Enzim ini terlokalisasi dalam jenis sel tertentu, seperti sel epitel bronkus, alveolar dan makrofag alveolar, tetapi juga dapat ditemukan ekstrasel. Banyak dari enzim ini diatur oleh faktor transkripsi Nrf2 yang sangat penting untuk induksi enzim antioksidan dan protein paru. Nrf2 sangat penting pada IPF karena defisiensi Nrf2 secara bermakna meningkatkan fibrosis paru akibat induksi bleomisin pada tikus. Pada IPF ditemukan kadar NO, ekspresi iNOS dan biomarker stres oksidatif 8-isoprostan yang tinggi. Beberapa studi menunjukkan bahwa ketidakseimbangan oksidan-antioksidan di saluran pernapasan bagian bawah berperan penting dalam patogenesis IPF.⁸

Ketidakseimbangan protease dan antiproteases berkontribusi pada patogenesis IPF. Pentingnya protease dalam IPF dengan fakta bahwa matriks metaloproteinase-7 (MMP-7) secara bermakna terkait dengan fibrosis paru pada model hewan, dan juga diekspresikan berlebihan pada paru manusia dengan IPF. ROS dan RNS dapat berkontribusi terhadap ketidakseimbangan protease-antiprotease karena dapat mengaktifkan MMP dan menginaktivasi protease inhibitor. Antioksidan utama dalam matriks ekstraselular dan alveolar yang dapat menghambat aktivasi oksidatif

atau inaktivasi MMPs adalah glutathion peroksidase dan ECSOD. Pengobatan *N-acetylcysteine* (NAC) telah terbukti menghambat inaktivasi MMP. Tikus yang kekurangan ECSOD menunjukkan peningkatan aktivitas MMP pada model hewan fibrosis. Selain aktivasi protease, baik ROS dan RNS dapat menonaktifkan protease inhibitor seperti TIMP-1 dan mengubah keseimbangan protease-antiprotease.⁸

Model fibrosis paru akibat agen eksogen seperti asbes, radiasi, dan obat-obatan, dapat menyebabkan fibrosis paru melalui produksi ROS dan RNS. Antioksidan yang paling banyak diteliti dalam model ini termasuk *glutathione*, NAC, dan SODs. NAC secara bermakna mengurangi reaksi inflamasi primer, deposisi kolagen, dan perkembangan fibrosis paru akibat bleomisin, walaupun banyak juga yang tidak berhasil. Pengobatan dengan NAC 600 mg tiga kali sehari selama 12 minggu telah terbukti mengurangi penanda cedera oksidan.⁸



Gambar 2.14. Peran Utama Antioksidan pada Patogenesis IPF⁸

2.7 Bleomisin sebagai Induksi Fibrosis Paru

Model fibrosis paru dengan pemberian bleomisin, sudah sering dilakukan. Bleomisin digunakan untuk menginduksi terjadinya fibrosis paru pada model hewan tikus jantan yang diberikan secara intratrakeal dan intrapleural dengan posisi dekubitus lateral kanan. Fibrosis paru pada hewan kecil secara histologi, dinilai dengan menggunakan modifikasi *Ashcroft scale*. Skala yang sudah dimodifikasi ini memiliki korelasi yang lebih baik dengan gambaran CT scan dibandingkan dengan skala Ashcroft konvensional. Analisis tingkat fibrosis dapat dilakukan juga dengan program *Image J*.⁷⁷

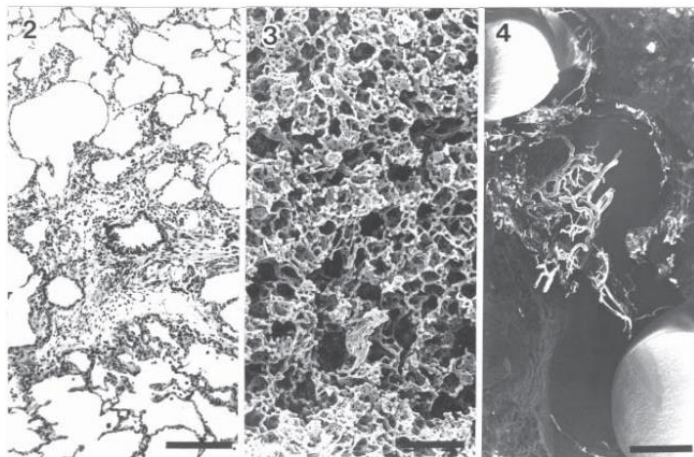
Model fibrosis paru yang diinduksi oleh bleomisin, digunakan untuk mengetahui mekanisme yang berkaitan dengan fibrosis paru dan pleura. Model bleomisin adalah sistem *in vivo* yang paling umum digunakan untuk meneliti pemberian obat. Bleomisin dapat menginduksi paru yang menghasilkan respons inflamasi akut. Fase inflamasi dan perubahan fibrotik, meniru beberapa ciri patologis yang sesuai dengan IPF. Perubahan molekular yang terjadi selama fase fibrosis belum pernah dinilai secara langsung. TGF- β sangat berperan sebagai pemicu pada proses remodeling dalam model bleomisin, namun kontribusinya terhadap pengembangan penyakit di IPF saat ini belum diketahui secara lengkap. Selain itu heterogenitas penyakit di antara pasien, termasuk tingkat perkembangannya belum jelas, apakah model bleomisin secara akurat mencerminkan mekanisme penyakit untuk semua pasien IPF.⁷⁸

Untuk menetapkan dosis bleomisin yang menginduksi fibrosis namun tidak mengakibatkan kematian, penelitian dosis awal respons bleomisin telah dilakukan. Kematian yang bermakna diamati pada kelompok tikus yang diberi dosis 3 U/kg BB (19%) atau 5 U/kg BB (50%). Pemberian dosis 2 U/kg BB tidak menyebabkan kematian dan menyebabkan respons fibrotik submaksimal yang mengakibatkan perubahan fungsi paru, sehingga semua penelitian selanjutnya banyak dilakukan dengan menggunakan dosis ini. Respons awal terlihat banyak ditemukan sel neutrofil yang dengan cepat berkurang seiring waktu dan digantikan dengan meningkatnya jumlah limfosit dan makrofag di saluran napas. Setelah 35 hari, jumlah sel pada BAL tikus yang diberi bleomisin kembali sama dengan kelompok kontrol. Pemberian bleomisin berulang, meningkatkan infiltrasi sel inflamasi pada BAL tikus. Konsentrasi awal neutrofil BAL masih rendah sampai 4 minggu pertama pengamatan dan jumlahnya kemudian meningkat setelah 12 minggu dari

pajanan awal dan menetap selama studi berlangsung. Tingkat limfosit dan makrofag dalam BAL tetap meningkat selama penelitian, walaupun jumlah limfosit mulai berkurang sedikit seiring waktu. Pemberian bleomisin tunggal menyebabkan peningkatan skor fibrosis paru tujuh hari setelah pemberian, dan menetap mulai dari hari ke-14 dan selanjutnya. Pewarnaan kolagen dan kadar hidroksiprolin akan maksimal tujuh hari pasca pemberian bleomisin. Pemberian bleomisin berulang juga menyebabkan fibrosis paru derajat sedang. Mirip dengan model pemberian tunggal, fibrosis masih ditemukan beberapa minggu setelah pemberian bleomisin. Kadar hidroksiprolin BAL meningkat hingga 8 minggu setelah pemberian pertama, namun kemudian menurun kembali ke kadar awal pada minggu 18 dan 24.⁷⁸

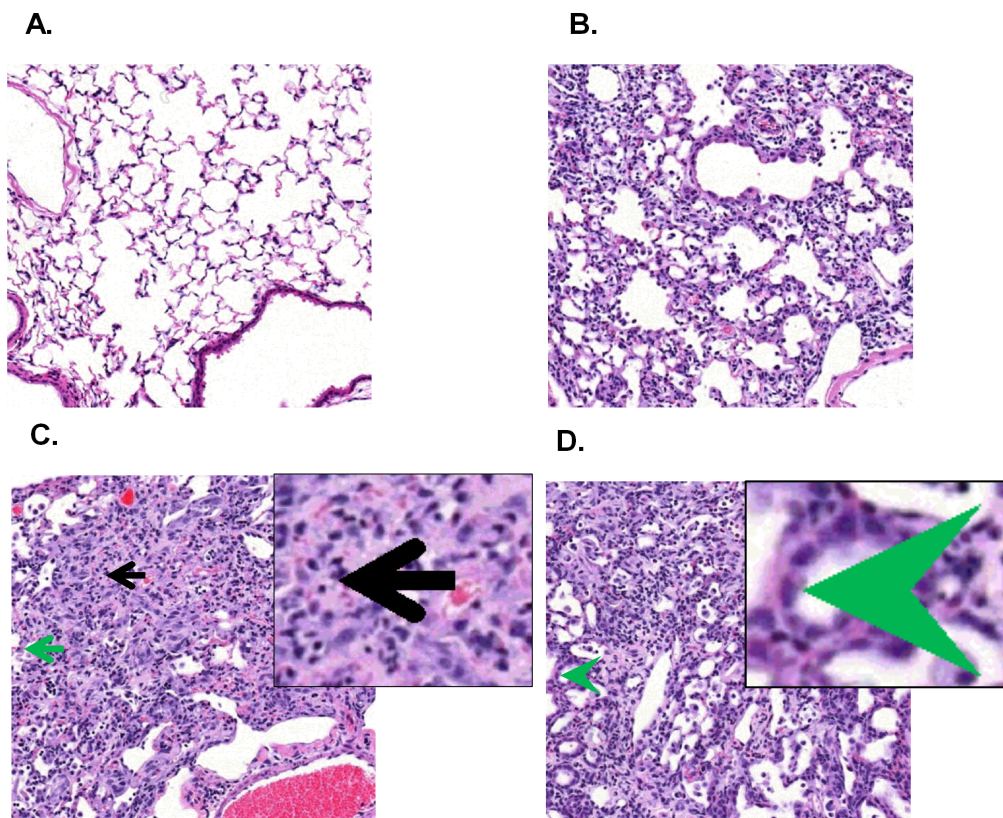
Pada minggu pertama setelah pemberian bleomisin, respons utama ditandai dengan peradangan paru. Sel inflamasi di interstitial, alveolar dan cairan protein diamati secara konsisten dengan beberapa fibroblas yang ada. Selama dua minggu berikutnya, fibrosis alveolar dan interstitial jadi makin terlihat jelas. Setelah lima minggu pasca bleomisin, perubahan yang terjadi lebih heterogen dengan fibrosis yang diselingi alveoli dan alveoli yang sebagian rusak serta dilapisi oleh sel epitel bronkoalveolar. Dalam model bleomisin berulang, setiap periode waktu memberikan gambaran histologis serupa yang diamati pada model pemberian tunggal yaitu radang, fibrosis alveolar dan interstitial, hilangnya ruang alveolar, dan hiperplasia bronkoalveolar. Pada proses kronik fibrosis menjadi semakin interstitial, alveoli menebal sering dilapisi oleh sel epitel bronkoalveolar kuboidal. Ruang alveolar sering diisi dengan granula halus bahan amfofilik homogen yang sering disertai dengan infiltrasi makrofag dan *giant cell* multinukleat serta neutrofil. Kesimpulannya perubahan histopatologis yang diamati pada pemberian bleomisin tunggal dan berulang sangat serupa (**Gambar 2.16**).⁷⁸

Mengingat bahwa pemberian bleomisin berulang tidak menunjukkan perubahan fibrotik yang diamati, banyak penelitian selanjutnya menggunakan bleomisin tunggal. Analisis *microarray* menunjukkan 3 fase yang berbeda yaitu fase inflamasi (hari ke-1 hingga ke-2), fase fibrosis aktif (hari ke-7 hingga ke-14) dan fase fibrosis akhir (hari ke-21 hingga ke-35) dapat dilihat pada **Gambar 2.16**.



Gambar 2.15. Gambaran Histopatologi Perubahan Fibrosis pada Paru Tikus Usia 2,5 bulan setelah Pemberian Bleomisin⁷⁹

Fibrosis alveolar dan interstitial dengan berbagai ukuran, hilangnya ruang alveolar, anastomosis antar pembuluh darah dan hiperplasia bronchoalveolar.



Gambar 2.16. Perubahan Histopatologi Paru Pasca Pemberian Bleomisin 5 mg/kg BB⁷⁸

Struktur paru normal pada kontrol (A). Tampak sel-sel radang di interstitium dan ruang alveoli, dengan minimal fibrosis pada hari ke-7 (B). Fibrosis alveolar dan interstitial lebih banyak dan progresif pada hari ke-21 (C). Tampak jaringan fibrosis memenuhi seluruh ruang alveoli dan interstitium pada hari ke-35 (D).

Respons ekspresi gen puncak terhadap bleomisin terjadi antara hari ke-7 dan ke-14 pasca pengobatan, sesuai dengan respons fibrotik yang diamati dan diukur pada BAL dan jaringan paru (skor Ashcroft). Peningkatan ekspresi sitokin inflamasi pada awal respons terhadap bleomisin, diikuti oleh peningkatan mediator pro-fibrotik seperti TGF- β dan *lysophosphatidic acid* (LPA) serta deposisi matriks. Gen matriks metaloprotease (MMP) termasuk gen MMP12, MMP19, dan juga *lisyl oxidase-like* (LOXL) yang terlibat dalam patogenesis penyakit fibrotik diinduksi dari tujuh hari dan seterusnya setelah pemberian bleomisin. Regulator positif sinyal TGF- β termasuk TGF β R1, TGF β R2, dan Smads 1–3 diregulasi selama fase fibrosis, sedangkan regulator negatif seperti inhibitor Smads yaitu Smad6 dan Smad7 mengalami *down-regulated*. Gen dari jalur sinyal lain yang terlibat dalam IPF, termasuk gen pensinyalan dan gen Wnt yang berubah sebagai respons terhadap aktivitas *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K), juga diinduksi selama fase fibrosis aktif dan beberapa sinyal Wnt gen tetap meningkat selama fase fibrosis akhir.⁷⁸

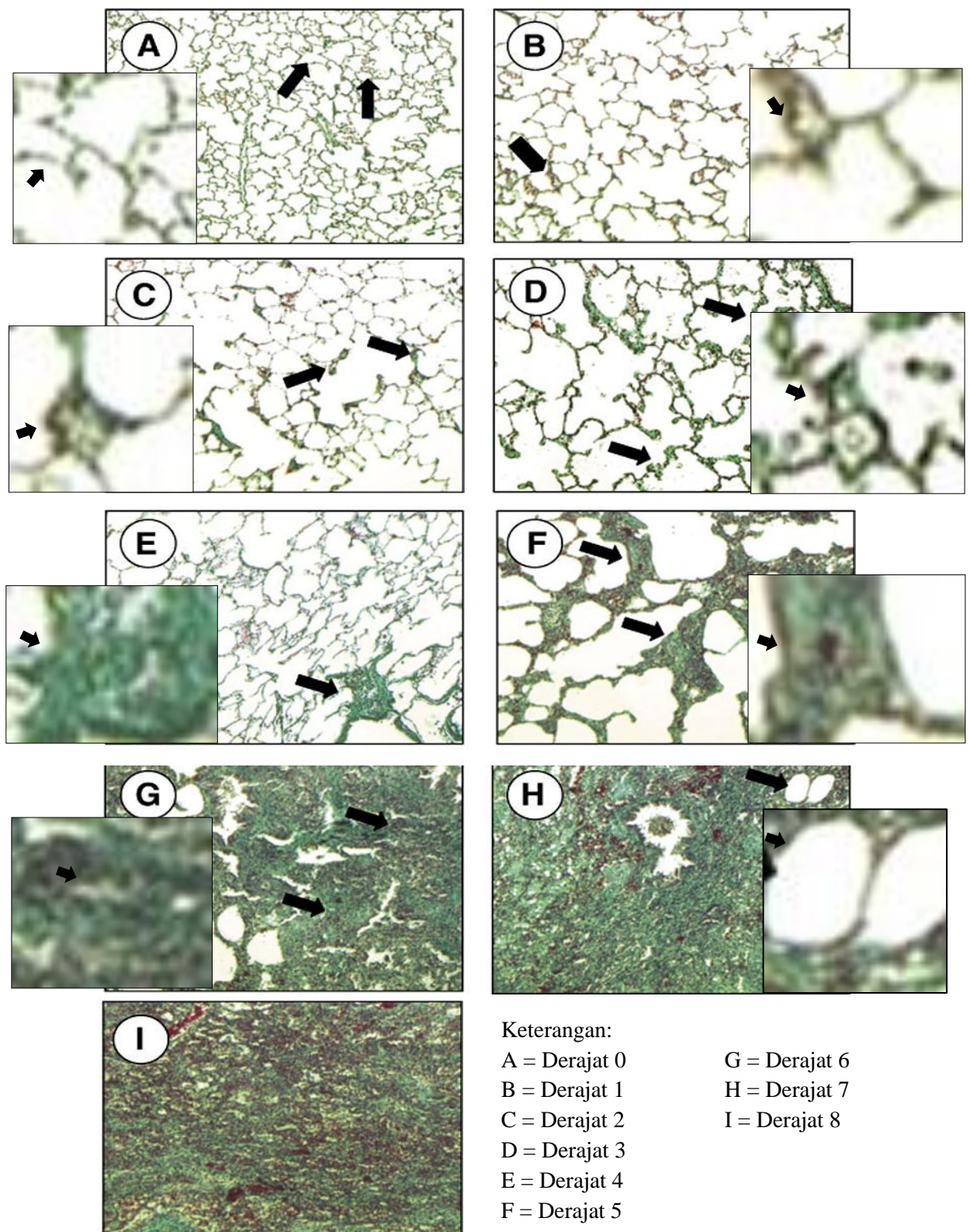
2.8 Model Hewan pada Fibrosis Paru

Mekanisme dasar terjadinya fibrosis pada paru belum dapat dijelaskan secara lengkap, walaupun penelitian telah dilakukan hampir 30 tahun. Penelitian pada manusia memberikan informasi dan gambaran awal, respons fisiologis dan perubahan inflamasi pada paru. Diagnosis pasien IPF yang tidak menunjukkan gambaran *high resolution computed tomography* (HRCT) yang jelas, dikonfirmasi dengan evaluasi histopatologi secara biopsi paru. Untuk memahami patogenesis IPF dan penyakit fibrosis paru yang lain, perlu digunakan model hewan. Model hewan diharapkan mampu menjembatani kesenjangan antara pasien sebagai subjek penelitian dan kajian laboratorium. Hipotesis yang berasal dari penelitian pada subjek manusia dapat diuji secara langsung pada model hewan. Hasil riset *in vitro* di laboratorium juga dapat langsung diuji pada model hewan. Walaupun sudah digunakan secara luas tetapi disadari bahwa model hewan mempunyai banyak keterbatasan, terutama perbedaan anatomi dan fisiologi antara hewan laboratorium dan manusia. Model hewan juga tidak dapat direproduksi secara adekuat meniru patofisiologi penyakit pada manusia, di antaranya efek perbedaan usia, dampak genetik dan pengaruh penyakit kronik pada model hewan fibrosis yang penyebabnya bermacam-macam. Di antara banyak keterbatasan penggunaan model

hewan fibrosis, beberapa keuntungan yang dapat diperoleh dari penelitian eksperimental adalah kesempatan untuk melakukan studi intervensi dan meneliti jaringan tubuh, yang tidak dapat dilakukan secara rutin pada manusia tanpa harus melakukan autopsi. Sebagian besar penelitian terdahulu menggunakan kucing, kuda dan anjing, namun saat ini terdapat tendensi penggunaan model hewan kecil seperti tikus dan marmot (rodent) untuk mempelajari fisiologi dan patofisiologi paru.⁸⁰

Tabel 2.2 Karakterisasi Skala Modifikasi Ashcroft.⁷⁷

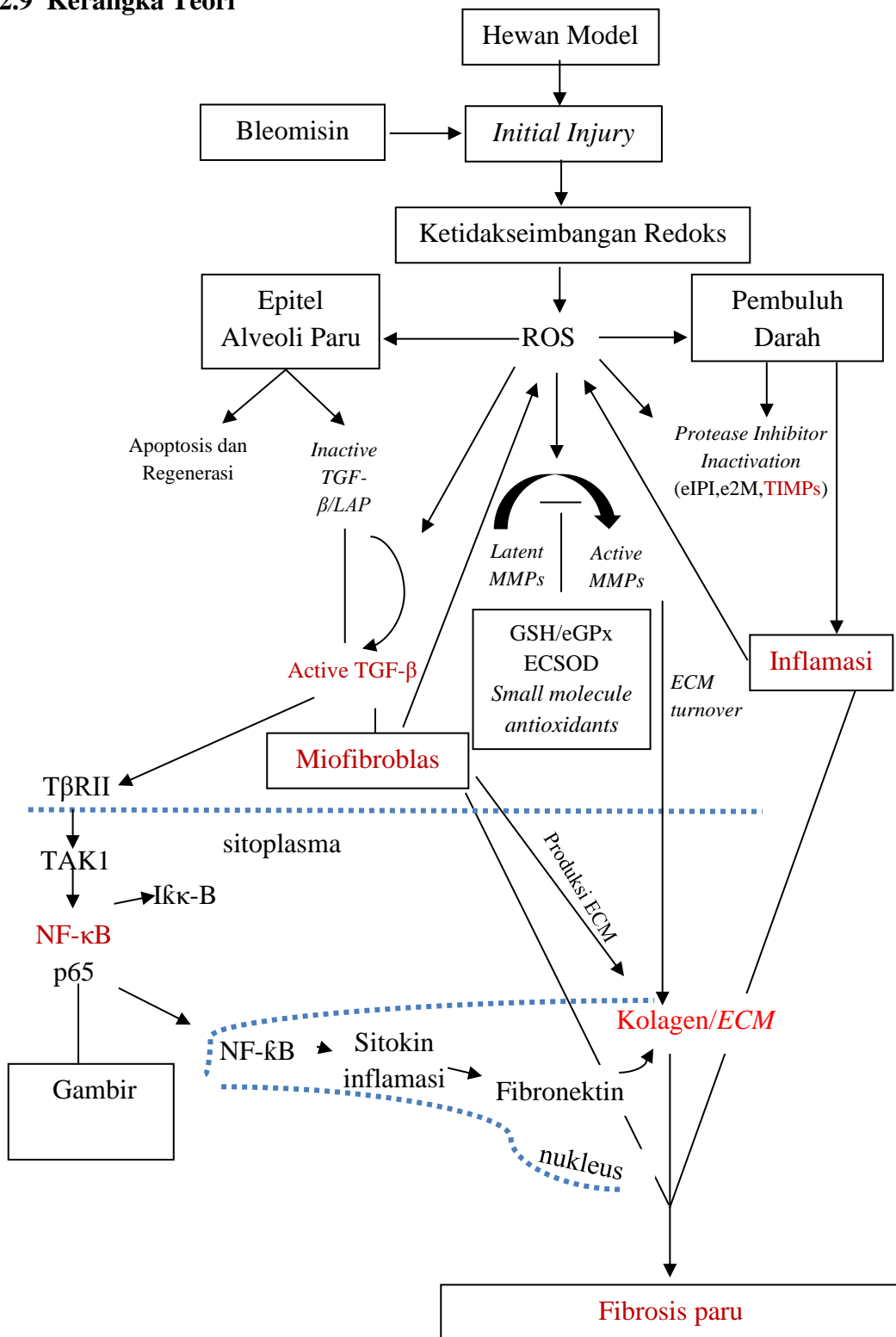
Derajat Fibrosis	Sampel Foto	Skala Modifikasi
0	Gambar A	Septum alveoli: tidak ditemukan fibrosis pada sebagian besar dinding alveoli. Struktur paru normal
1	Gambar B	Septum alveoli: fibrosis terbatas, ketebalan septum $\leq 3x$ dari normal. Struktur paru sebagian alveoli membesar, belum terlihat fibrosis
2	Gambar C	Septum alveoli: fibrosis tampak jelas, ketebalan septum $\geq 3x$ dari normal. Struktur paru sebagian alveoli membesar, belum terlihat fibrosis
3	Gambar D	Septum alveoli: dinding mulai fibrosis, ketebalan $\geq 3x$ dari normal. Struktur paru: sebagian alveoli membesar, belum terlihat fibrosis
4	Gambar E	Septum alveoli: bervariasi. Struktur paru: <i>single fibrotic masses</i>
5	Gambar F	Septum alveoli: bervariasi. Struktur paru <i>confluent fibrotic masses</i> , $\geq 10\%$ dan $\leq 50\%$ lapang pandang, kerusakan struktur meluas.
6	Gambar G	Septum alveoli: bervariasi, sebagian besar berubah bentuk. Struktur paru: massa fibrotik besar, $\geq 50\%$ lapang pandang, kerusakan struktur sangat luas
7	Gambar H	Septum alveoli: tidak berbentuk. Struktur paru: alveoli bergabung dengan massa fibrosis, masih tampak gelembung udara
8	Gambar I	Septum alveoli: tidak berbentuk. Struktur paru: <i>complete obliteration with fibrotic masses</i>



Gambar 2.17. Gambaran Fibrosis Paru dengan Modifikasi Skala Ascroft.⁷⁷

Skor fibrosis juga dapat dinilai dengan menggunakan derajat : 0 (normal), 1 (inflamasi ringan pada perivaskuler dan atau peribronkial), 2 (penyebaran inflamasi ke parenkim), 3 (fibrogenesis dan inflamasi yang luas), 4 (fibrogenesis dan inflamasi difus berat).⁴⁰

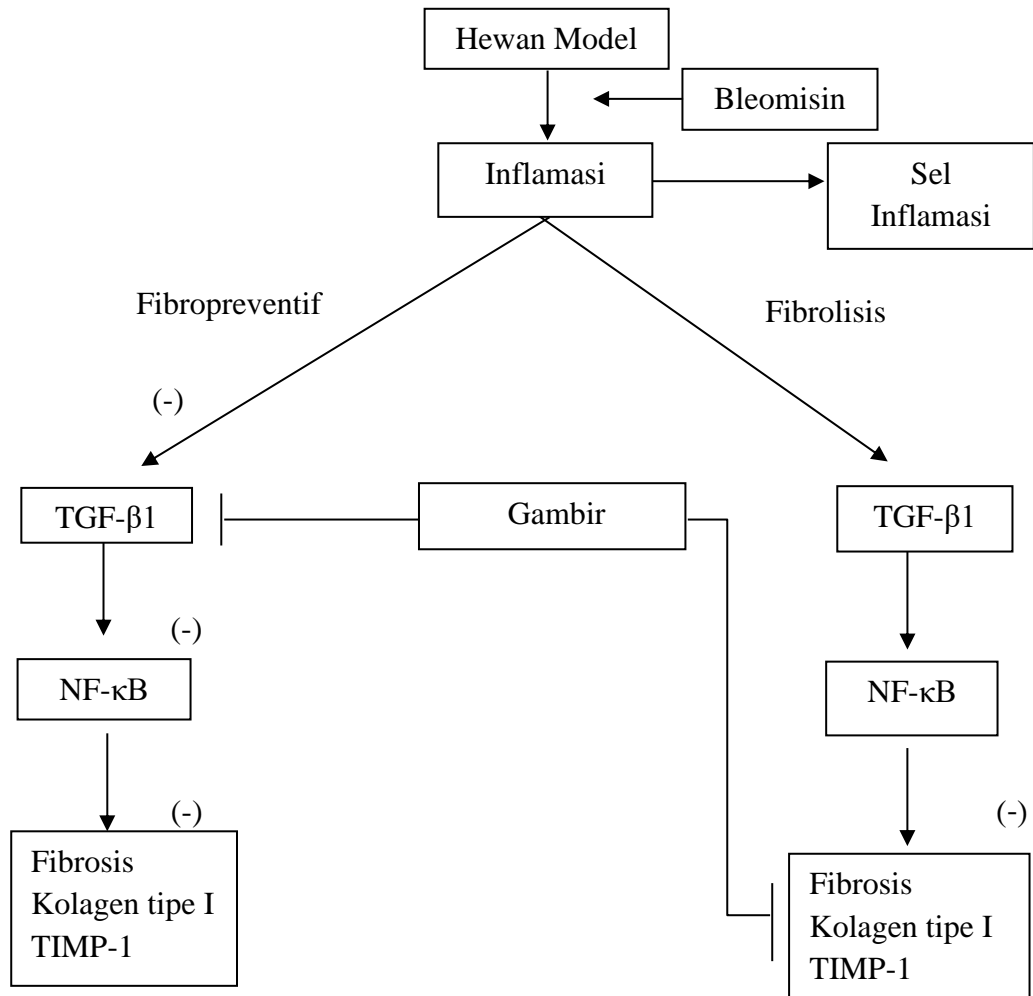
2.9 Kerangka Teori



Garis biru putus-putus: proses dalam sel dan inti sel
 Warna merah: komponen yang akan diteliti

Gambar 2.18. Kerangka Teori Peran Gambir pada Fibrosis Paru Hewan Model Diakibatkan Bleomisin

2.10 Kerangka Konsep



Keterangan

—| : Menghambat

Gambar 2.19. Kerangka Konsep Peran Gambir Fibropreventif dan Fibrosis pada Fibrosis Paru Hewan Model Diakibatkan Bleomisin

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian analitik dengan desain eksperimental secara *in vivo* acak pada sepuluh kelompok hewan coba tikus. Penelitian dibagi atas dua tahap yaitu penelitian tahap I dan II.

Tahap I: adalah studi pendahuluan yang dilaksanakan pada bulan april 2018 di UPHL FKH IPB dan laboratorium patologi anatomi FKH IPB untuk mengetahui kejadian fibrosis akibat pemberian bleomisin secara intratrakeal dan intrapleural serta menentukan pemberian injeksi bleomisin yang terbaik berdasarkan hasil gambaran histopatologi. Prosesnya adalah dilakukan pada dua kelompok hewan tikus model, kemudian menganalisis prosedur kerja, proses pengumpulan sampel dan data hasil penelitian awal. Subjek penelitian adalah dua belas ekor tikus jantan, usia sepuluh minggu dengan berat sekitar 200–250 g. Tikus model tersebut dibagi dalam dua kelompok dan bleomisin diberikan dengan rute berbeda, yaitu secara intratrakeal dan intrapleura. Setelah itu subjek penelitian diterminasi, untuk pengambilan jaringan paru dan pengamatan terhadap perubahan histomorfologinya.

Tahap II: adalah studi eksperimental untuk menilai dan menganalisis efek antifibrosis pemberian gambir pada paru tikus model yang mengalami fibrosis akibat pemberian bleomisin dibandingkan dengan pembanding positif teh hijau. Subjek penelitian adalah sepuluh kelompok tikus jantan model dengan berat badan sekitar 200–250 g dan berusia sepuluh minggu. Dosis bleomisin yang digunakan adalah 4 mg/kg BB secara intratrakeal.⁶⁹ Dosis gambir yang digunakan adalah 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB dan 262 mg/kg BB peroral, serta dosis teh hijau yang digunakan adalah 125 mg/kg BB peroral, berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan oleh Ningsih.¹²

Penghitungan jumlah kematian hewan:

Model hewan tikus yang mati selama pengujian dicatat dan dibuat persentase jumlah kematian setiap minggu dengan rumus:

$$\% \text{ Kematian hewan coba} = \frac{\text{Jumlah hewan mati}}{\text{Jumlah hewan awal}} \times 100\%$$

Skrining Pra-penelitian

Dilakukan pemeriksaan fisis diagnostik dan pemberian obat cacing (*deworming*)

3.2 Perkiraan Besar Sampel

- Jumlah hewan coba yang digunakan ditetapkan berdasarkan rumus Federer:

$$(t - 1) (n - 1) > 15 \text{ ekor}$$

$$t = \text{jumlah kelompok (10)}$$

$$n = \text{jumlah hewan coba per kelompok}$$

$$n = (10 - 1) (n - 1) \geq 15 \text{ ekor}$$

$n = 3$, sehingga dibutuhkan masing-masing tiga ekor tikus untuk setiap kelompok.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada Unit Pengelola Hewan Laboratorium FKH IPB, Laboratorium Patologi FKH IPB, Laboratorium Departemen Biokimia FKUI, Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi FKUI-RSCM. Penelitian berlangsung dari bulan September 2018 sampai Maret 2019.

3.4 Bahan dan Cara Kerja

Simplisia gambir (ranting dan daun ekstrak gambir) yang diperoleh dari Payakumbuh Sumatera Barat dan diolah menjadi ekstrak gambir di Laboratorium Pusat Teknologi dan Medika BPPT Serpong. Teh hijau sebagai pembanding positif dalam bentuk serbuk dari Plamed. Hewan coba tikus putih jantan galur *Sprague Dawley* yang diperoleh dari Unit Pengelola Hewan Laboratorium FKH IPB, usia 10 minggu dengan berat badan $\pm 200\text{--}250$ gram.

3.4.1 Tahap 1: Uji Pendahuluan Induksi Bleomisin *in vivo*

Uji pendahuluan bleomisin dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan dosis optimal bleomisin yang dapat menyebabkan fibrosis paru dengan tingkat kematian hewan yang paling rendah. Sebelum dilibatkan dalam penelitian, hewan coba diaklimatisasi selama 14 hari dalam kandang individual polikarbonat 1 ekor per kandang yang dialasi dengan serutan kayu. Hewan coba mendapat pakan standar dan air minum *ad libitum*, serta obat cacing albendazol. Kondisi ruangan bersuhu sekitar $25\text{--}30^{\circ}\text{C}$, kelembaban $80\text{--}90\%$, penerangan 12 jam dan gelap 12 jam. Selain

untuk tujuan membiasakan hewan coba dalam kondisi percobaan, aklimatisasi dimaksudkan untuk menyeleksi hewan yang sakit. Hewan sakit ditunjukkan dengan mata keruh, bulu berdiri, berat badan menurun. Hewan yang sakit tidak digunakan dalam percobaan. Uji pendahuluan tahap satu dapat dilihat di Gambar 3.1.

3.4.1.1 Pengelompokan Hewan Coba

Pada uji pendahuluan, hewan coba dikelompokkan menjadi dua kelompok. Kelompok tikus model yang pertama sebanyak enam ekor, dilakukan injeksi bleomisin secara intratrakeal dengan dosis yang mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Tashiro et al.⁶⁹ yaitu sebesar 4 U/kg berat badan atau 0,04 mL setelah dilakukan pengenceran dengan cairan salin. Kelompok tikus model yang kedua diberikan injeksi bleomisin intrapleura sebanyak 5 U/ kg berat badan atau 0,05 mL setelah dilakukan pengenceran dengan cairan saline. Pemberian bleomisin dilakukan hanya satu kali pada hari pertama.

3.4.1.2 Terminasi Hewan Coba

Delapan hari setelah induksi bleomisin, dilakukan terminasi dengan sebelumnya diberikan anestesi menggunakan ketamin dosis letal, dieutanasia dengan cara dislokasi leher, diposisikan terlentang pada papan bedah, kemudian dilakukan pembedahan mulai bagian bawah abdomen hingga bagian torak. Organ paru diambil, dibersihkan dan dicuci dengan larutan NaCl fisiologis dingin hingga bersih, kemudian dimasukkan dalam larutan *buffered neutral formalin* (BNF) 10% dengan perbandingan 1 bagian organ : 20 bagian BNF untuk keperluan analisis histologi.

3.4.1.3 Pemrosesan Jaringan untuk Pewarnaan

Sebelum dilakukan pewarnaan, organ yang difiksasi dilakukan serangkaian proses sebagai berikut. Pertama-tama dilakukan dehidrasi untuk mengeluarkan air dari organ dengan cara merendam dalam larutan etanol konsentrasi meningkat dan xilen. Infiltrasi jaringan bertujuan memasukkan parafin ke dalam rongga-rongga jaringan sehingga mempertahankan tekstur dan struktur sel selama proses pemotongan dan pewarnaan. Penanaman/*blocking* jaringan dalam parafin cair dilakukan dalam *box cassette* khusus dimaksudkan untuk memudahkan memosisikan jaringan dalam mesin mikrotom sebelum dipotong. Selanjutnya *box cassette* diberi tanda khusus.

Penyayatan jaringan dilakukan menggunakan mesin mikrotom pada ketebalan 3–5 μm . Sebelum disayat, blok parafin disimpan pada $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama minimal 60 menit untuk memudahkan penyayatan. Penempelan sayatan pada gelas objek dan dilanjutkan dengan pelarutan parafin serta hidrasi pada larutan xilen dan etanol dengan konsentrasi menurun secara berturut-turut. Untuk pewarnaan dengan teknik imunohistokimia dengan gelas objek khusus yang dilapisi dengan poli-L-lisin. Tahap hidrasi bertujuan untuk memudahkan pemasukan bahan pewarna karena digunakan bahan larut air. Setelah dilakukan pewarnaan yang sesuai, dilakukan dehidrasi untuk menghilangkan air dengan cara merendam gelas objek yang telah diwarnai ke dalam etanol secara bertingkat dan xilen. Terakhir adalah proses penutupan jaringan dengan menggunakan bahan yang sesuai dan bersifat larut dalam xilen yaitu DPX.

3.4.1.4 Pewarnaan Hematoksilin-eosin (HE) dan Masson Trichome

Pewarnaan hematoksilin eosin merupakan pewarnaan untuk mengetahui struktur sel/jaringan paru. Pewarnaan HE dilakukan menggunakan reagen Hematoksilin-Mayer dan larutan Eosin serta Masson trichome pada 12 ekor tikus model (uji tahap I) dan 10 kelompok tikus model (uji tahap 2).

Pewarnaan Hematoksilin-Eosin :

Tahapan pewarnaan hematoksilin eosin adalah sebagai berikut:

1. Proses deparafinisasi dengan menggunakan larutan xilol I, II, dan III masing-masing selama 3–5 menit.
2. Proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol bertingkat konsentrasi 100% (III, II, dan I), 96%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing selama 3–5 menit.
3. Preparat direndam dalam air keran selama 10 menit kemudian dibersihkan dengan cara direndam dalam akuades selama 5 menit.
4. Preparat diwarnai dengan haematoksilin selama 30–45 detik kemudian direndam di dalam air keran selama beberapa saat.
5. Warna yang dihasilkan dikontrol di bawah mikroskop. Jika warna ungu yang dihasilkan kurang kontras, preparat dicelupkan kembali ke dalam pewarna haematoksilin selama 3–5 detik. Namun jika warnanya terlalu ungu, preparat dapat dicelupkan dalam pemucat haematoksilin 1–2 kali (0.5% HCl dalam 70% alkohol).

6. Preparat kembali direndam di dalam air keran selama 10 menit lalu direndam di dalam akuades selama 5 menit.
7. Preparat diwarnai dengan eosin selama 30–45 detik.
8. Preparat di dehidrasi dengan alkohol bertingkat dimulai dengan konsentrasi 70%, 80%, 90%, 96%, dan 100% (I, II, dan III) masing-masing 2–4 kali celup.
9. Preparat dijernihkan dengan larutan xilol I, II, dan III masing-masing selama 5 menit.

Proses *mounting* dilakukan dengan penutupan preparat dengan penutup kaca menggunakan entellan®.

Hasil: inti berwarna biru hingga ungu, sitoplasma, kolagen, keratin dan eritrosit berwarna merah.

Pewarnaan Masson Trichome :

Sampel organ dalam gelas objek dilakukan pewarnaan Masson's Trichrome yang diawali dengan proses deparafinisasi dan dibilas dengan akuades selama beberapa detik. Gelas objek yang tertempel potongan organ direndam dalam larutan mordant selama 40 menit dan dibilas kembali dengan akuades selama beberapa detik. Selanjutnya organ yang telah direndam dalam larutan mordant kemudian dilakukan perendaman dalam pewarna Carrazi's hematoksilin selama 40 menit dan dibilas kembali dengan akuades. Setelah itu, dilanjutkan dengan perendaman pada pewarna orange G 0,75% selama 2 menit. Selanjutnya gelas objek tersebut dimasukkan ke dalam asam asetat 1% selama beberapa detik. Gelas objek kemudian diangkat dari larutan asam asetat 1% dan dimasukkan ke dalam larutan pewarna *ponceau xyloidine fuchsin* selama 15 menit dan dibilas kembali pada asam asetat 1% selama beberapa detik sambil digoyang-goyangkan. Setelah itu, direndam dalam larutan asam fosfotungstat 2,5% selama 10 menit, kemudian dilakukan perendaman kembali pada asam asetat 1% selama beberapa detik. Selanjutnya dimasukkan ke dalam pewarna *aniline blue* selama 15 menit dan kembali direndam dalam asam asetat 1%. Kemudian dilakukan perendaman gelas objek dalam alkohol 95% selama 3 menit. Setelah semua tahapan tersebut selesai maka akan dilanjutkan dengan proses dehidrasi. Gelas objek ditutup dengan menggunakan kaca penutup yang sebelumnya telah diberikan perekat dan ditunggu sampai kaca penutup menempel pada gelas objek. Preparat yang telah terwarnai, dilanjutkan dengan pengamatan

terhadap struktur kolagen yang terbentuk di bawah mikroskop dan dilakukan skoring terhadap fibrosis pada masing- masing kelompok perlakuan.

3.4.1.5 Analisis Tingkat Fibrosis Paru

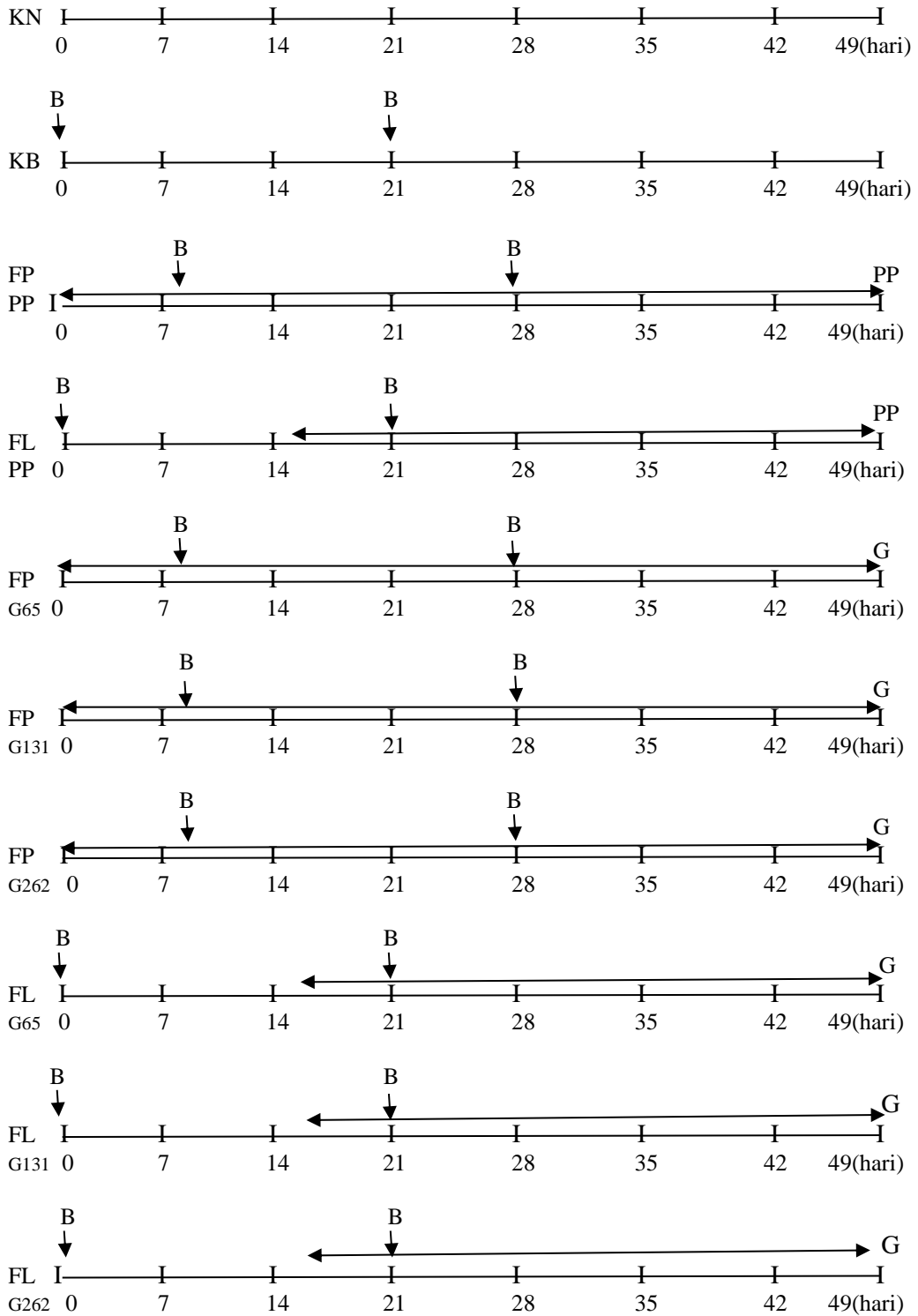
Gambaran fibrosis dianalisis dengan menggunakan modifikasi skala Ascroft pada uji tahap 1, sedangkan pada uji tahap 2 selain melihat gambaran fibrosis, penghitungan dilakukan secara kuantitatif menggunakan teknik *image analysis* dengan program *imageJ*. Penghitungan persentase luas fibrosis dilakukan terhadap *slide* dengan pemeriksaan imunohistokimia. Persentase luas fibrosis adalah persen total luas kolagen yang berwarna coklat terhadap total luas satu lapang pandang. Pengambilan gambar dilakukan dengan ketentuan sebagai berikut:

1. Dilakukan pada perbesaran 40x sebanyak 10 lapang pandang per-*slide*. Foto diatur supaya tidak terjadi tumpang tindih antar bagian. Foto diambil menggunakan mikroskop tipe *stereo Axio10-zoom V16* dengan kamera *Axiocam105-color* menggunakan program Zen.
2. Dihitung persentase luas fibrosis dengan program *imageJ* dengan tahapan seperti pada lampiran 9.
3. Persentase luas fibrosis per hewan = rerata dari ke-10 lapang pandang dan dinyatakan dalam satuan %.

3.4.2 Tahap II

3.4.2.1 Pengujian Antifibrosis *in vivo*

Pengujian secara *in vivo* dilakukan pada hewan tikus putih jantan galur *Sprague Dawley* dapat dilihat di gambar dibawah ini



Keterangan: B = Bleomisin, PP = Pembanding Positif, G = Gambir, FP = Fibropreventif, FL = Fibrolisis.

Gambar 3.1. Skema Pengujian Antifibrosis *In Vivo* pada Kelompok Penelitian

KN: Kelompok kontrol negatif.

KB: Kelompok kontrol positif yaitu tikus model yang hanya diberikan bleomisin 4 mg/kg BB minggu pertama dan ketiga.

FP TH: Kelompok tikus model dengan pemberian bleomisin 4 mg/kg BB hari ke-8 dan hari ke-28 + teh hijau setiap hari selama 7 minggu (fibropreventif pembanding positif).

FL TH: Kelompok tikus model dengan pemberian bleomisin 4 mg/kg BB hari ke-0 dan hari ke-21 + teh hijau setiap hari mulai hari ke-15 sampai ke-49 (fibrosis pembanding positif).

FP G65: Kelompok tikus model dengan pemberian bleomisin 4 mg/kg BB hari ke-8 dan hari ke-28 + gambir dengan dosis 65 mg/kg BB setiap hari sampai hari ke-49 (fibropreventif).

FP G131: Kelompok tikus model dengan pemberian bleomisin 4 mg/kg BB hari ke-8 dan hari ke-28 + gambir dengan dosis 131 mg/kg BB setiap hari sampai hari ke-49 (fibropreventif).

FP G262: Kelompok tikus model dengan pemberian bleomisin 4 mg/kg BB hari ke-8 dan hari ke-28 + gambir dengan dosis 262 mg/kg BB setiap hari sampai hari ke-49 (fibropreventif).

FL G65: Kelompok tikus model dengan pemberian bleomisin 4 mg/kg BB hari ke-0 dan hari ke-21 + gambir dengan dosis 65 mg/kg BB setiap hari mulai hari ke-15 sampai hari ke-49 (fibrosis).

FL G131: Kelompok tikus model dengan pemberian bleomisin 4 mg/kg BB hari ke-0 dan hari ke-21 + gambir dengan dosis 131 mg/kg BB setiap hari mulai hari ke-15 sampai hari ke-49 (fibrosis).

FL G262: Kelompok tikus model dengan pemberian bleomisin 4 mg/kg BB hari ke-0 dan hari ke-21 + gambir dengan dosis 262 mg/kg BB setiap hari mulai hari ke-15 sampai hari ke-49 (fibrosis).

Seluruh kelompok hewan coba akan diterminasi pada akhir minggu ke-7 atau hari ke-50. Pada seluruh kelompok hewan coba, organ paru yang telah bersih, diambil sebagian untuk dilakukan analisis sel inflamasi, kadar TGF- β 1 dalam cairan BAL dengan metode ELISA, kolagen tipe I, TIMP-1 secara IHK dan aktivasi NF- κ B secara ELISA dan *western blott*. Sisa jaringan paru digunakan untuk pembuatan

persediaan histologi yang difiksasi ke BNF 10% (organ : BNF = 1 : 20). Pengamatan makroskopis organ paru dilakukan pada akhir percobaan setelah hewan coba dieutanasia. Analisis fibrosis dilakukan seperti pada uji pendahuluan dengan menggunakan metode skor Ashcroft yang telah dimodifikasi dan teknik *image analysis* program *Image J*. Analisis tingkat ekspresi kolagen 1 dan TIMP-1 dilakukan pada slide dengan pewarnaan imunohistokimia.

3.4.2.1 Prosedur Pewarnaan Imunohistokimia

Pengujian ekspresi protein dilakukan dengan teknik pewarnaan imunohistokimia (IHK) sesuai dengan prosedur kerja Dako Real Envision (Dako) dengan optimasi sebagai berikut:

1. Organ paru yang telah diblok dalam parafin dipotong dengan ketebalan 3–5 mikrometer (μM) kemudian dilekatkan pada gelas objek khusus berlapis poli-L-lisin selanjutnya dilakukan deparafinisasi seperti digambarkan di bagian uji pendahuluan.
2. Antigen retrieval (AR) bertujuan untuk membuka epitope protein target sehingga memudahkan untuk dikenal oleh antibodi primer (Ab-primer). Gelas objek direndam di larutan 0,1% tripsin dalam 0,1% CaCl_2 pH 7,7–7,8 yang telah dihangatkan pada suhu 37°C . Proses inkubasi dilakukan selama 20 menit pada 37°C . Reaksi dihentikan dengan merendam gelas objek dalam air dingin selama 5 menit kemudian gelas objek dicuci dengan air mengalir selama 3 menit.
3. Gelas objek dicuci dengan cara meletakkan pada wadah khusus pewarnaan menggunakan pelarutan PBS-Tween (*phosphate buffer saline*-0,05% tween20) sebanyak 3x@5 menit. Pencucian menggunakan botol semprot dengan hati-hati agar tidak mengenai permukaan potongan jaringan. Gelas objek dikeringkan dengan mengelap sekitar potongan jaringan menggunakan *tissue*.
4. *Blocking peroxidase* bertujuan untuk memblok peroksidase endogen yang ada dalam jaringan. Ditetaskan larutan 0,3% H_2O_2 (tersedia dalam kit) sebanyak 2 tetes pada permukaan potongan jaringan, selanjutnya diinkubasi selama 20 menit dalam keadaan gelap dan lembab, kemudian sediaan dicuci seperti di atas.

5. Penambahan Ab-primer bertujuan untuk mendeteksi keberadaan antigen target. Ab-primer diencerkan menggunakan pelarut *Tris buffer saline-0,05% tween20* (TBS-Tween). Larutan Ab-primer diteteskan sebanyak 100 uL per sediaan, kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar dalam keadaan gelap dan lembab. Pengenceran Ab-primer untuk protein kolagen I adalah 1 : 100 (konsentrasi stok 0,1 mg/mL) dan protein TIMP-1 adalah 1 : 20 (konsentrasi stok 0,1 mg/mL), kemudian sediaan dicuci seperti diatas.
6. Pada permukaan potongan jaringan diteteskan Ab-sekunder (Dako Real Envision®) sebanyak 1–2 tetes/sediaan, kemudian diinkubasi selama 45 menit pada suhu kamar dalam keadaan gelap dan lembab. Selanjutnya sediaan dicuci seperti di atas.
7. Pewarnaan dilakukan menggunakan larutan 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Larutan kerja DAB disiapkan dengan cara mengencerkan 1 tetes larutan stok DAB dengan 1 mL larutan *buffer* (tersedia dalam kit) dan dikocok hingga homogen. Pada permukaan potongan jaringan diteteskan 1–2 tetes larutan kerja DAB dan diinkubasi selama 5 menit (untuk kolagen I) atau 7 menit (untuk TIMP-1) hingga terbentuk warna coklat. Reaksi dihentikan dengan cara menuangkan akuades pada permukaan potongan jaringan. Gelas objek dicuci dengan air mengalir selama 3 menit.
8. Pewarnaan *counterstain* bertujuan untuk memberikan latar belakang dan bagian lain yang tidak akan diamati, yaitu inti sel dan sitoplasma sehingga memudahkan dalam pengamatan. Gelas objek direndam dalam larutan hematoksilin-Lili selama 5 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 6 menit. Gelas objek direndam dalam larutan Scott selama 45 detik dan dikembali dicuci selama 3 menit.
9. Gelas objek didehidrasi dan dilanjutkan dengan penutupan.
10. Selama pewarnaan imunohistokimia dilakukan juga kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif adalah organ yang secara alamiah mengandung protein target. Kontrol positif untuk kolagen I adalah organ ginjal tikus sementara untuk TIMP-1 adalah organ *ca-mammae* tikus. Kontrol negatif digunakan organ *Ca-mammae* tikus. Dalam proses pengerjaan, Ab-primer diganti dengan larutan TBST.

Pengukuran Tingkat Ekspresi Protein

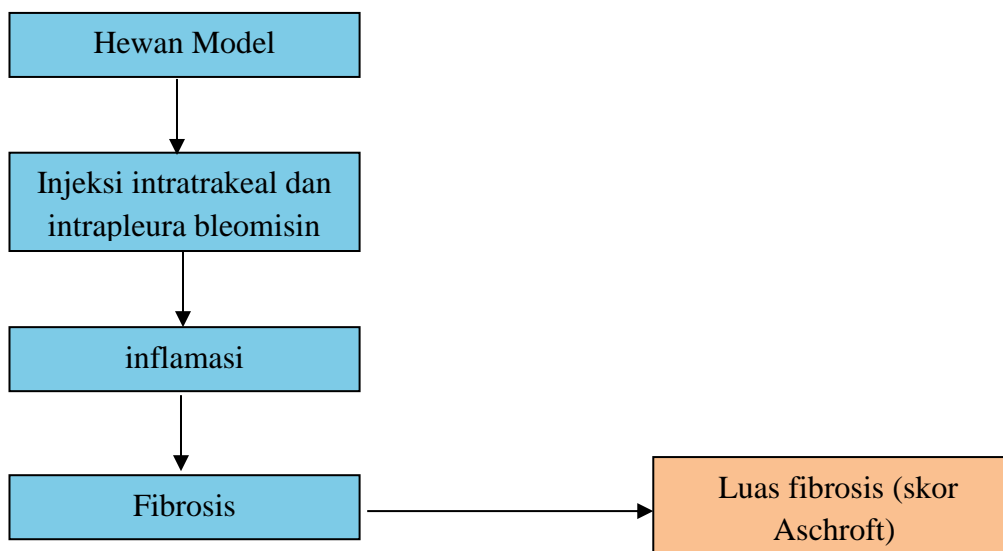
Analisis Ekspresi Ekstraselular

Penghitungan tingkat ekspresi kolagen I dan TIMP-1 ekstraselular dilakukan secara kuantitatif dengan teknik *image analysis* menggunakan program ImageJ.⁵² Ekspresi protein adalah persentase total protein yang memberikan warna coklat pada daerah sekitar alveoli terhadap total luas satu lapang pandang. Pengambilan gambar dilakukan dengan ketentuan sebagai berikut.

1. Dilakukan pada perbesaran 400 kali pada sekitar alveoli sebanyak 10 lapang pandang per sediaan. Foto diambil menggunakan mikroskop *Axiovision Rel46* dengan kamera *Canon PowershootA460*.
2. Dihitung persentase luas area berwarna merah dengan program ImageJ dengan tahapan tertentu.
3. Ekspresi protein per hewan = rerata dari ke-10 lapang pandang dan dinyatakan dalam satuan %.

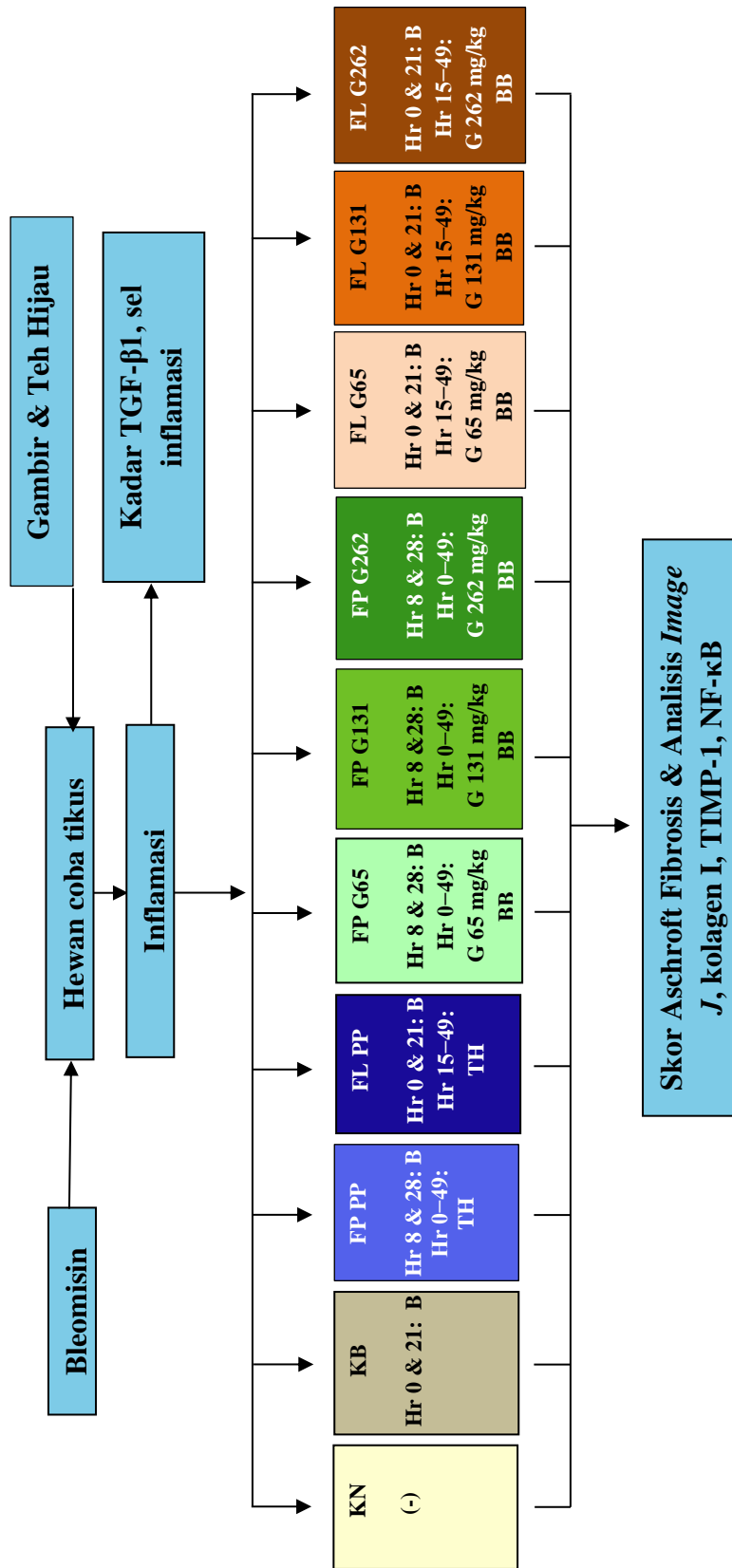
3.5 Alur Penelitian

3.5.1 Tahap I



Gambar 3.2. Alur Penelitian Tahap I

3.5.2 Tahap II



Keterangan: FP = Fibropreventif, FL = Fibrolisis B = Bleomisin, G = Gambir, PP = Pemandang Positif

Gambar 3.3. Alur Penelitian Tahap II

3.6 Etika Penelitian

Sebelum penelitian dimulai telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Hewan Fakultas Kedokteran Hewan IPB dengan nomor surat 114/KEH/SKE/XII/2018 serta izin lokasi dari Bagian Penelitian IPB.

3.7 Variabel Penelitian

3.7.1 Tahap I

Variabel bebas: pemberian bleomisin

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah tingkat fibrosis paru

3.7.2 Tahap II

Variabel bebas: pemberian teh hijau sebagai pembanding positif dan gambir

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah sel inflamasi, kadar TGF- β 1 pada cairan BAL dengan metode ELISA, tingkat fibrosis paru dengan modifikasi skor Ashcroft, kolagen tipe 1 dan TIMP-1 dengan imunohistokimia, persentase area fibrosis pada paru dengan analisis *Image J*, kadar dan aktivasi NF- κ B dengan metode ELISA dan western blot.

3.8 Definisi Operasional

1. Fibropreventif adalah proses penghambatan pembentukan material penyusun ECM
2. Fibrolisis: Proses degradasi ECM melalui peruraian dan lisis protein penyusun ECM dan atau induksi apoptosis dan nekrosis sel-sel miofibroblas.
3. Bahan induksi fibrosis: Bleomisin yang diberikan secara intratrakeal dengan dosis 4 mg/kg BB setelah dilakukan pengenceran dengan cairan salin.
4. Ekstrak gambir adalah ekstrak etanol 96% getah gambir kering (EtOH96% getah gambir) selanjutnya digunakan istilah gambir untuk sampel pada pengujian *in vivo*.
5. Kelompok kontrol negatif/KN: kelompok hewan coba yang tidak mendapat perlakuan apa-apa.
6. Kelompok kontrol positif/KB: kelompok hewan coba yang hanya diberi injeksi bleomisin intratrakeal.

7. Tingkat fibrosis dinyatakan dengan parameter persen luas fibrosis (skala rasio). Persen luas fibrosis menjadi parameter utama yang digunakan dalam menyatakan tingkat fibrosis dengan pemeriksaan image J dan imunohistokimia (skala rasio). Selain itu derajat fibrosis juga dianalisis dengan menggunakan modifikasi skor Ascroft.
8. Ekspresi kolagen I dan TIMP-1 diukur ekstraselular dan intraselular. Analisis ekstraselular dilakukan dengan image J dan analisis intraselular dilakukan dengan pewarnaan imunohistokimia (skala rasio).
9. Sel inflamasi: total jumlah sel, neutrofil, makrofag dan limfosit ($\times 10^4/\text{ml}$) dengan hemositometer.
10. Kadar TGF- β dalam BAL diukur dengan ELISA ($> 7 \text{ pg/mL}$).
11. Pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan HE dan Masson trichome untuk menilai kandungan kolagen dan derajat fibrosis dinilai dengan modifikasi skor Ascroft.
12. Aktivasi NF- κ B ditentukan dengan pemeriksaan ELISA dan *western blott*.

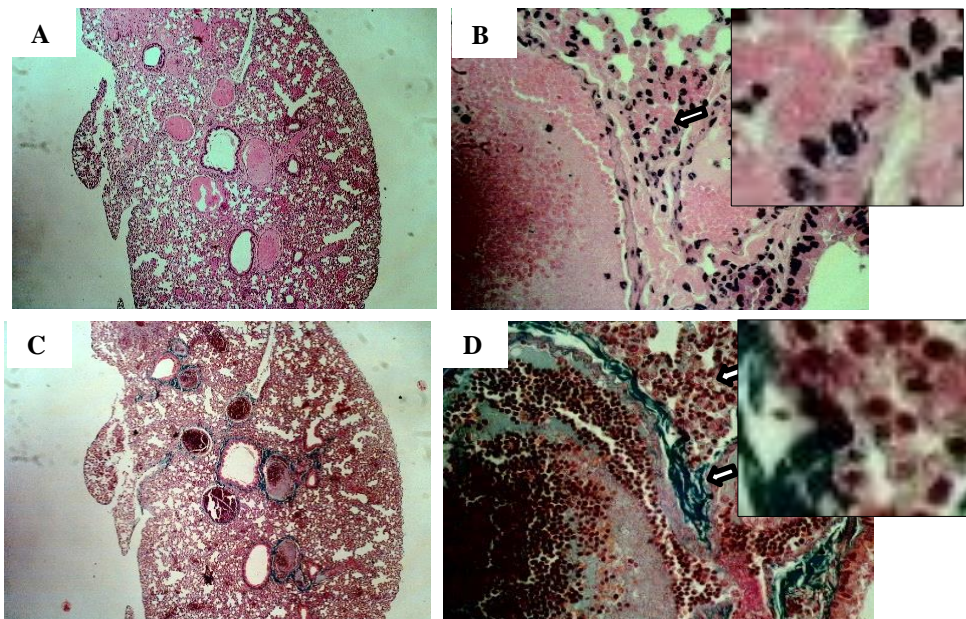
3.9 Analisis Data

Setelah seluruh data penelitian diperoleh, selanjutnya dilakukan pengolahan data. Seluruh analisis dilakukan dengan menggunakan piranti lunak statistik SPSS ver. 20. Nilai median dan min-max ditampilkan sebagai bagian dari analisis deskriptif. Untuk melihat perbedaan variabel yang diteliti pada kesepuluh kelompok akan dilakukan uji ANOVA dan jika hasil menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna maka akan dilanjutkan dengan analisis *postHoc*.

BAB 4 HASIL PENELITIAN

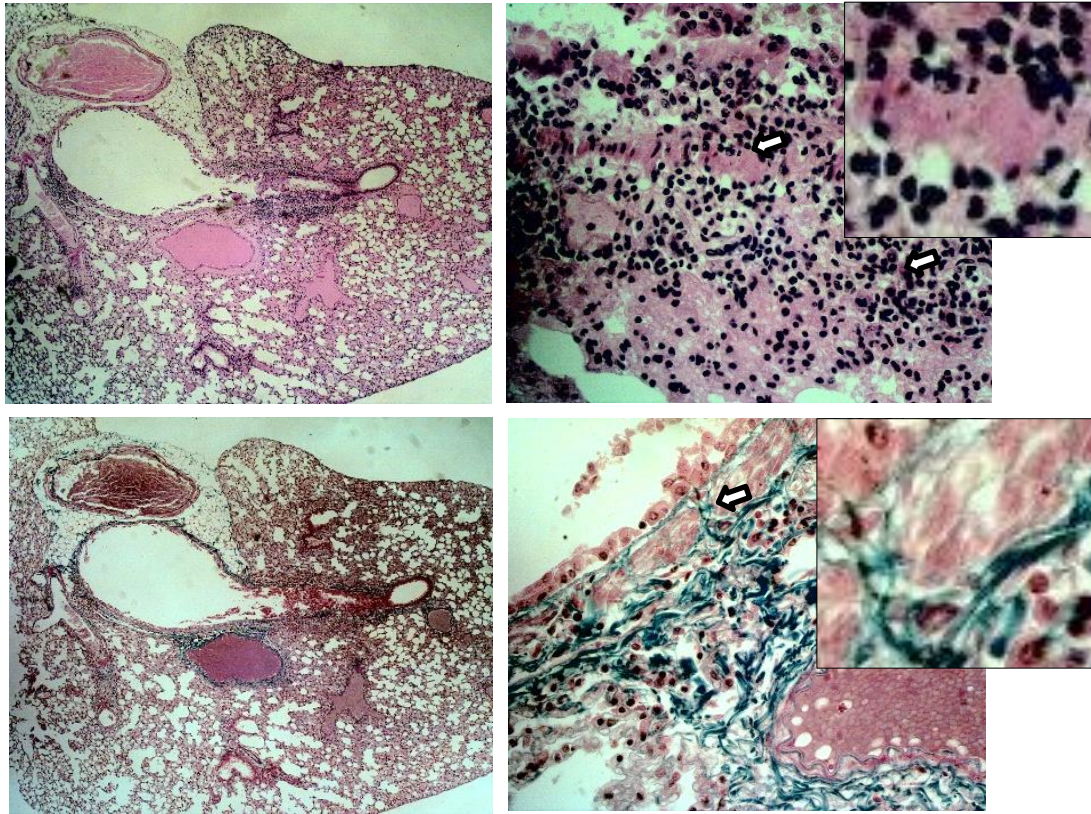
4.1 Perbandingan Pemberian Bleomisin Secara Intratrakeal dan Intrapleural terhadap Kejadian Fibrosis

Pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan HE dan MT, memperlihatkan bahwa pada pemberian injeksi bleomisin 4 mg/kg BB secara intratrakeal, area fibrosis lebih luas dibandingkan pemberian injeksi bleomisin 4 mg/kg BB secara intrapleural. Pemberian injeksi bleomisin 4 mg/kg BB secara intratrakeal menunjukkan struktur paru *confluent fibrotic masses*, $\geq 10\%$ dan $\leq 50\%$ lapang pandang, disertai kerusakan struktur yang meluas. Pemberian injeksi secara intratrakeal memberikan hasil fibrosis yang lebih luas dibandingkan dengan pemberian injeksi intrapleura, yang dapat dinilai dari gambaran mikroskopis sehingga untuk penelitian tahap berikutnya digunakan pemberian bleomisin intratrakeal (**Gambar 4.1.** dan **Gambar 4.2.**).



Gambar 4.1. Perubahan Histopatologi Jaringan Paru akibat Pemberian Bleomisin Intratrakeal

Pewarnaan H dan E (A dan C) dan Masson-Trichome (B dan D). Terlihat ada serbuk sel radang dan fibrosis. Tanda panah menunjukkan adanya penebalan dinding septum alveoli dan *confluent fibrotic mass* (Pembesaran asli A dan C 40x, B dan D 400x).



Gambar 4.2. Perubahan Histopatologi Jaringan Paru akibat Pemberian Bleomisin Intrapleural

Pewarnaan H dan E (A dan C) dan Masson-Trichome (B dan D). Terlihat ada serbukan sel radang dan fibrosis. Tanda panah menunjukkan adanya penebalan dinding septum alveoli dan *confluent fibrotic mass* (Pembesaran asli A dan C 40x, B dan D 400x).

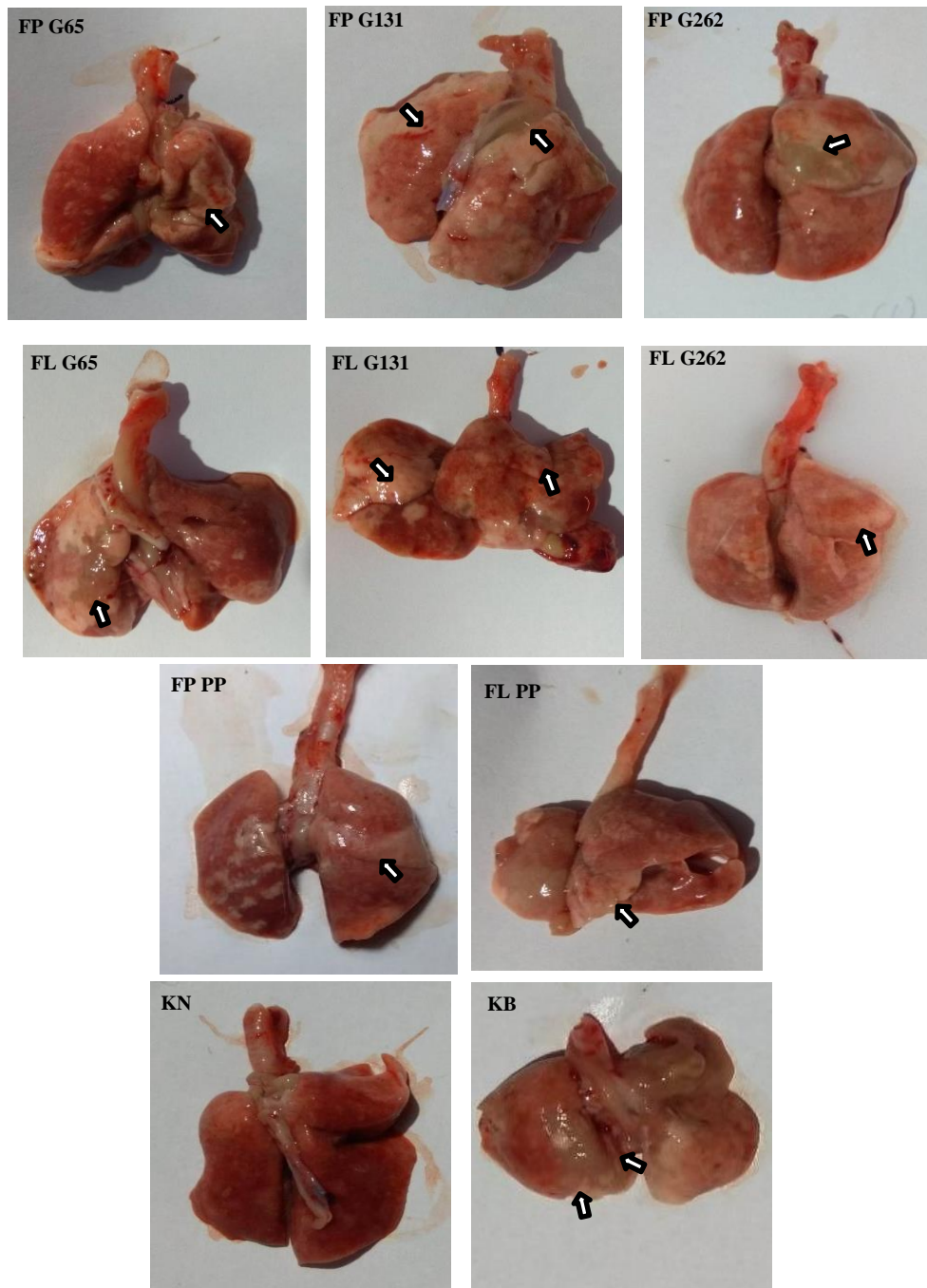
4.2 Karakteristik Subjek Penelitian

Data karakteristik dasar subjek penelitian yang meliputi karakteristik demografik (berat badan dan bobot paru tikus) dan gambaran makroskopis paru dilihat di Tabel 4.1. Subjek penelitian adalah 10 kelompok tikus jantan model yang masing-masing terdiri atas 3 tikus dengan berat badan 200–250 g serta berusia 10 minggu. Rerata berat badan tikus terendah terlihat pada kelompok FP G262 sebesar 210 g, sedangkan rerata berat badan tikus tertinggi terlihat pada kelompok FP PP sebesar 246 g. Setelah diterminasi, jaringan paru subjek penelitian dinilai mengenai bobot paru dan tampilan makroskopisnya. Bobot paru seluruh subjek penelitian berkisar antara 2,8 g sampai 4,1 g. Berat organ relatif ditemukan dengan bobot paru dibagi dengan berat badan. Kelompok KN mempunyai berat organ relatif adalah 0,016. Kelompok KB dan FL G65 memiliki berat organ relatif yang tertinggi yaitu 0,018 sedangkan berat organ relatif terendah dijumpai pada kelompok FP G262 dan FL G262 yaitu 0,013.

Tabel 4.1. Karakteristik dan Gambaran Makroskopis Paru Subjek Penelitian

Kelompok n = 3	Berat badan, rerata (g)	Bobot paru, rerata (g)	Berat organ relatif	Gambaran Makroskopis
KN	218 g	3,7	0,016	Tidak tampak kerusakan jaringan paru
KB	232 g	4,3	0,018	Tampak kerusakan jaringan paru yg ditandai dengan perdarahan, edema paru, timbul benjolan
FP PP	246 g	4	0,016	Tampak sedikit terjadi kerusakan jaringan paru
FL PP	235 g	3,3	0,014	Tampak sedikit terjadi kerusakan jaringan paru
FP G65	212 g	3	0,014	Tampak sedikit kerusakan jaringan paru, beberapa bagian tampak seperti jaringan paru normal
FP G131	243 g	3,9	0,016	Tampak kerusakan jaringan paru yang cukup luas ditandai dengan edema paru, timbul benjolan-benjolan, perdarahan, paru tampak berwarna merah kebiruan
FP G262	210 g	2,8	0,013	Tampak kerusakan jaringan paru, perdarahan, timbul benjolan, hanya tidak seburuk seperti FP G131
FL G65	221 g	4	0,018	Tampak sedikit kerusakan jaringan paru, beberapa bagian tampak seperti jaringan paru normal
FL G131	240 g	4,1	0,017	Tampak kerusakan jaringan paru yang cukup luas ditandai dengan edema paru, timbul benjolan-benjolan, perdarahan, paru tampak berwarna merah kebiruan
FL G262	229 g	3	0,013	Tampak sedikit kerusakan jaringan paru, beberapa bagian tampak seperti jaringan paru normal

Pada KN tidak tampak kerusakan jaringan paru di permukaan, sedangkan pada KB tampak perubahan di permukaan jaringan paru yang ditandai dengan perdarahan, edema paru, dan timbul benjolan. Pada FP PP dan FL PP, tampak perubahan pada permukaan paru tidak nyata. sedikit terjadi kerusakan jaringan paru. Kelompok FP G65, FL G65 dan FL G262 menunjukkan perubahan jaringan paru yang minimal, beberapa bagian tampak seperti jaringan paru normal. Kelompok FP G131 dan FL G131 menunjukkan kerusakan jaringan paru yang cukup luas, ditandai dengan edema paru, timbul benjolan-benjolan, perdarahan dan paru tampak berwarna merah kebiruan. Kelompok FP G262 menunjukkan perubahan jaringan paru yaitu adanya perdarahan dan timbul benjolan, hanya tidak seberat perubahan pada FP G131. Dapat disimpulkan bahwa secara makroskopis perubahan paru paling rusak terlihat pada FP G131 dan FL G131, oleh ada banyaknya benjolan-benjolan, perdarahan dan paru tampak berwarna merah kebiruan (**Gambar 4.3**).



Gambar 4.3. Gambaran Makroskopis Jaringan Paru pada Subjek Penelitian

Tanda panah menunjukkan perdarahan dan timbulnya benjolan di jaringan paru. Kelompok KB berukuran lebih kecil dibandingkan KN, tetapi berat relatif lebih berat (0,016 vs 0,018). Kelompok FP PP, FL PP, FP G65, FL G65 dan FL G262 menunjukkan derajat kerusakan lebih rendah dibandingkan kelompok lainnya.

4.2.1 Analisis Tingkat Kematian Hewan Coba

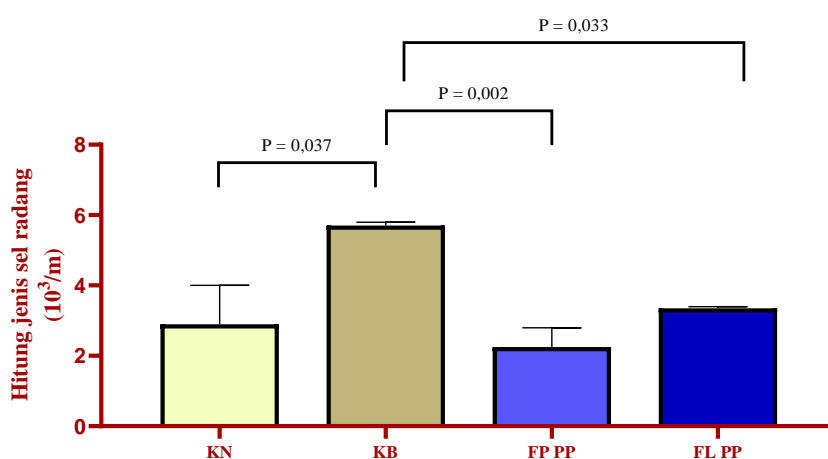
Pada penelitian ini ditemukan jumlah kematian sebanyak 7 hewan coba. Terlihat kematian mulai teramati pada minggu ke-4 sebanyak 2 subjek penelitian pada FP

G65 dan FP G262. Pada minggu ke-5 terdapat kematian pada 2 subjek penelitian pada KB dan FL G131. Kematian paling banyak teramati pada minggu ke-6 yaitu sebanyak 3 subjek penelitian, masing-masing pada FP G262, dan FL G131 dan FL G262. Pada subjek kelompok yang mengalami kematian dilakukan penelitian ulang dengan mengambil subjek penelitian yang baru dan dilakukan dengan perlakuan yang sama untuk menggantikan subjek penelitian yang mati.

4.3 Analisis Hitung Jenis Sel Radang antara Kelompok Kontrol, Pembanding Positif dan Gambir Fibropreventif /Fibrolisis

4.3.1 Hitung Hitung Jenis Sel Radang Pembanding Positif dan Kontrol

Hasil hitung jenis sel radang dari pemeriksaan BAL antara kelompok kontrol, pembanding positif fibropreventif dan fibrolisis, ditemukan median (min-max) dari KN, KB, FP PP dan FL PP adalah 2,90 (2,3–4,0); 5,70 (5,0–5,8); 2,25 (2,0–2,8); 3,35 (2,7–3,4) dapat dilihat di Gambar 4.4A. Hasil uji statistik Kruskal Wallis ditemukan perbedaan hitung sel radang BAL yang berbeda bermakna $p = 0,048$ di antara 4 kelompok di atas. Median hitung jenis sel radang FP PP lebih rendah dibandingkan dengan FL PP. Analisis *post hoc* perbedaan hitung sel radang antara kelompok kontrol, pembanding positif fibropreventif dan fibrolisis terdapat perbedaan bermakna antara KB dan FP PP ($p < 0,05$) seperti yang terlihat di Gambar 4.4.



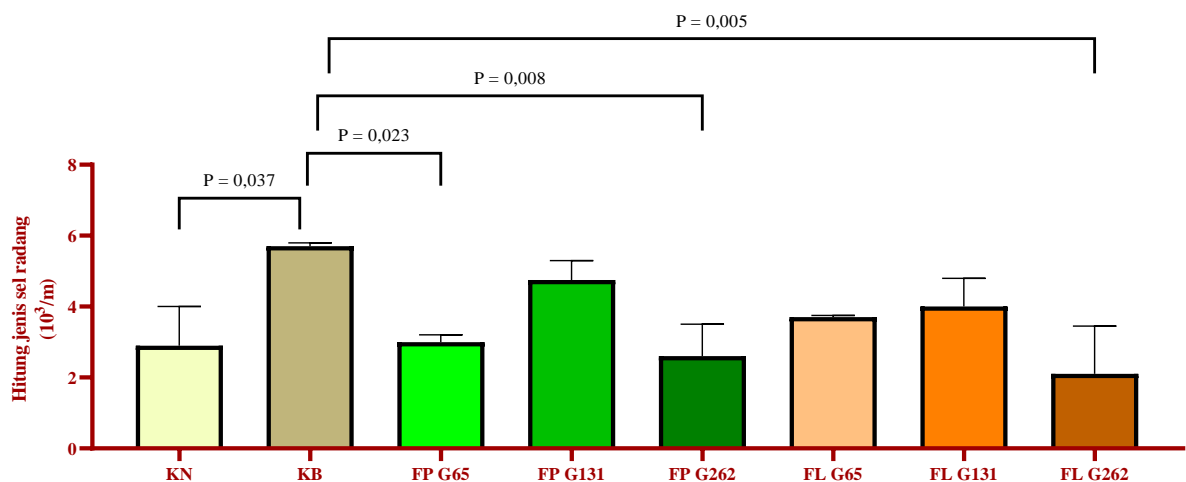
Gambar 4.4. Perbandingan Jumlah Sel Radang antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif

Terlihat penurunan jumlah sel radang BAL secara bermakna pada kelompok pembanding positif fibropreventif maupun fibrolisis. Ditemukan perbedaan bermakna jumlah sel radang pada KB dengan FP PP ($p = 0,002$) dan antara KB dengan FL PP ($p = 0,033$) menggunakan uji statistik Kruskal Wallis

4.3.2 Hitung Jenis Sel Radang Gambir dan Kontrol

Hasil penghitungan jenis sel radang dari pemeriksaan BAL antara kelompok kontrol, gambir fibropreventif dan fibrolisis ditemukan median (min–max) dari KN, KB dan FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G262 adalah 2,90 (2,3–4,0); 5,70 (5,0–5,8); 3,0 (2,8–3,2); 4,75 (4,6–5,3); 2,60 (2,0–3,5); 3,70 (1,6–3,8); 4,00 (3,9–4,8); 2,10 (2,0–3,5) dapat dilihat di Gambar 4.5A. Hasil uji statistik Kruskal Wallis menemukan perbedaan hitung sel radang BAL yang berbeda bermakna $p = 0,017$.

Kelompok fibropreventif yang memiliki median hitung jenis sel radang yang paling rendah terlihat pada FP G262 diikuti oleh FP G65, sedangkan median hitung jenis sel radang paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G131. Kelompok fibrolisis yang memiliki median hitung jenis sel radang paling rendah terlihat pada FL G262, sedangkan median hitung jenis sel radang paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL G131. Analisis *post hoc* perbedaan hitung sel radang antara kelompok gambir fibropreventif, fibrolisis dan kontrol mendapatkan perbedaan bermakna antara beberapa kelompok seperti yang terlihat di Gambar 4.5.



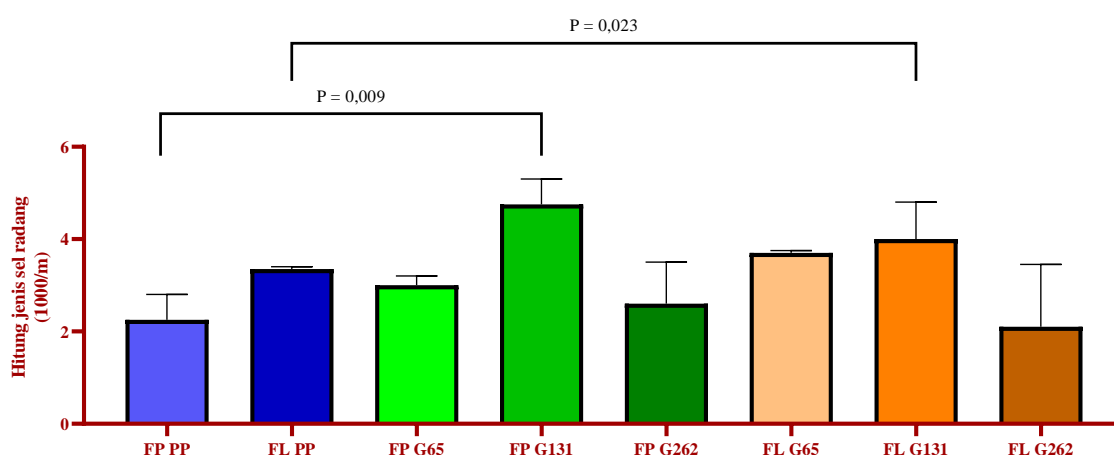
Gambar 4.5. Perbandingan Jumlah Sel Radang antara Kelompok dan Gambir

Terlihat jumlah sel radang yang menurun dan berbeda bermakna dibandingkan KB pada 4 kelompok, yaitu kelompok KB dengan FP ($p = 0,023$), KB dengan FP G262 ($p = 0,008$), dan FL G262 ($p = 0,005$).

4.3.3 Hitung Jenis Sel Radang Gambir dan Pemanding Positif

Hasil hitung jenis sel radang dari pemeriksaan *bronchoalveolar lavage* (BAL) antara kelompok pemanding positif dan gambir fibropreventif serta fibrolisis ditemukan median (min–max) dari FP PP, FL PP, FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G262 adalah 2,25 (2,0–2,8); 3,35 (2,7–3,4); 3,0 (2,8–3,2); 4,75 (4,6–5,3); 2,60 (2,0–3,5); 3,70 (1,6–3,8); 4,00 (3,9–4,8); 2,10 (2,0–3,5) dapat dilihat di Gambar 4.6. Hasil uji statistik ditemukan perbedaan hitung jenis sel radang yang berbeda bermakna $p = 0,041$.

Kelompok fibropreventif yang memiliki median hitung jenis sel radang yang paling rendah terlihat pada FP PP, sedangkan median hitung jenis sel radang paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G131. Kelompok fibrolisis yang memiliki median hitung jenis sel radang yang paling rendah terlihat pada FL G262, sedangkan median hitung jenis sel radang paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL G131. Analisis *post hoc* perbedaan hitung sel radang antara kelompok pemanding positif dan gambir fibropreventif serta fibrolisis ditemukan perbedaan bermakna antara beberapa kelompok seperti yang terlihat di Gambar 4.6. Hal tersebut menunjukkan bahwa dalam fibropreventif, pemberian teh hijau sebagai pemanding positif lebih baik dibandingkan dengan gambir. Kelompok fibrolisis, pemberian gambir (FL G262) lebih baik dibandingkan dengan kelompok fibrolisis lainnya termasuk pemanding positif yaitu teh hijau.



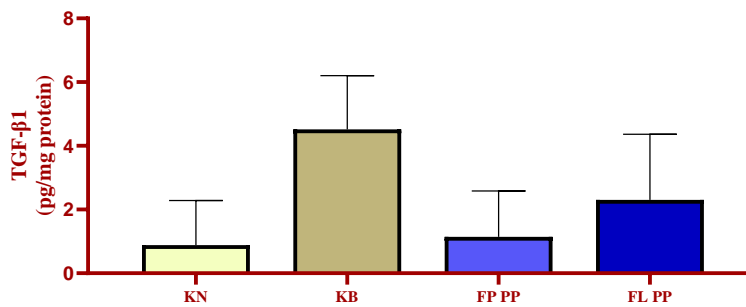
Gambar 4.6. Perbandingan Jumlah Sel Radang antara Pemanding Positif dan Gambir

Terdapat berbeda bermakna antara kelompok FP PP dan FP 131 ($p = 0,009$) dan kelompok FL PP dengan FL 13 ($p = 0,023$).

4.4 Analisis kadar TGF- β 1 antara Kelompok Kontrol, Pembanding Positif dan Gambir Fibropreventif /Fibrolisis

4.4.1 Kadar TGF- β 1 antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif

Hasil pemeriksaan kadar TGF- β 1 (pg/mg protein) antara kelompok kontrol, pembanding positif fibropreventif dan fibrolisis ditemukan median (min-max) dari KN, KB, FP PP dan FL PP adalah 0,88 (0,3–2,3); 4,52 (2,6–6,2); 1,14 (0,1–2,6); 2,30 (1,0–4,4). Hasil uji statistik Kruskal Wallis tidak menemukan perbedaan kadar TGF- β 1 yang berbeda bermakna $p = 0,082$. Median kadar TGF- β 1 FP PP lebih rendah dibandingkan dengan FL PP seperti yang terlihat di Gambar 4.7.



Gambar 4.7. Perbandingan Kadar TGF- β 1 antara Kontrol dan Pembanding Positif

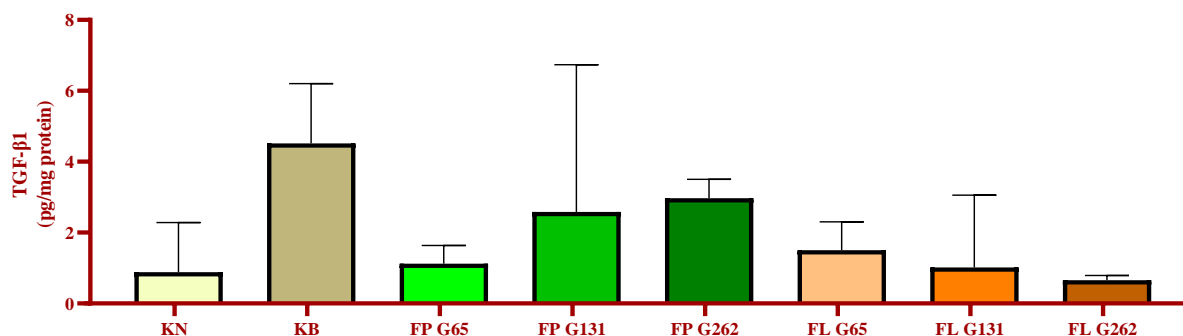
Kadar TGF- β 1 tertinggi ditemukan pada KB sedangkan pada kelompok FP PP kadarnya mendekati kadar pada KN. Tidak ditemukan perbedaan bermakna antar kelompok ($p = 0,082$)

4.4.2 Kadar TGF- β 1 antara Kelompok Kontrol dan Gambir

Pemeriksaan kadar TGF- β 1 (pg/mg protein) antara kontrol, kelompok gambir fibropreventif dan fibrolisis mendapatkan median (min-max) dari KN, KB dan FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G262 adalah 0,88 (0,3–2,3); 4,52 (2,6–6,2); 1,12 (0,4–1,6); 2,58 (1,2–6,7); 2,97 (1,6–3,5); 1,50 (0,3–2,3); 1,02 (0,1–3,1); 0,64 (0,5–0,8) dapat dilihat di Gambar 4.8. Hasil uji statistik Kruskal Wallis tidak didapatkan perbedaan bermakna kadar TGF- β 1 dengan $p = 0,097$.

Kelompok fibropreventif yang memiliki median kadar TGF- β 1 paling rendah terlihat pada FP G65, sedangkan median kadar TGF- β 1 paling tinggi pada kelompok

fibropreventif terlihat pada FP G262. Kelompok fibrolisis yang memiliki median kadar TGF- β 1 paling rendah terlihat pada FL G262, sedangkan median kadar TGF- β 1 paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL G65.



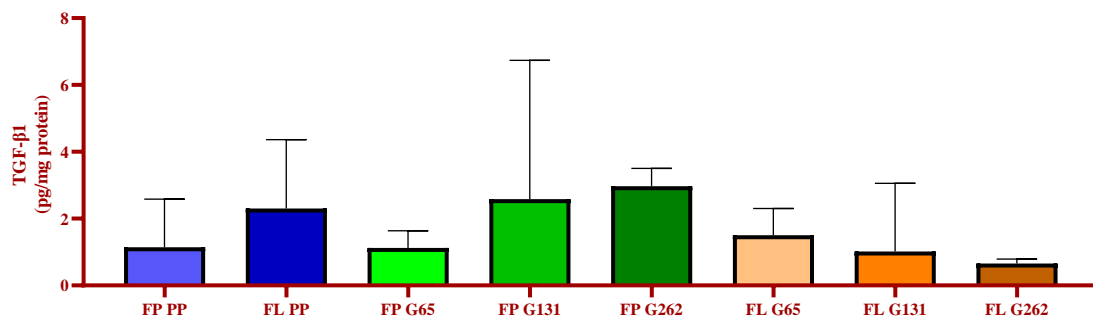
Gambar 4.8. Perbandingan Kadar TGF- β 1 antara Kontrol dan Gambir

Kadar TGF- β 1 terendah ditemukan pada FL G262. Tidak ditemukan perbedaan bermakna antar kelompok ($p = 0,097$)

4.4.3 Kadar TGF- β 1 antara Pemanding Positif dan Gambir

Hasil hitung dari pemeriksaan TGF- β 1 (pg/mg protein) kelompok pembanding positif dan gambir fibropreventif serta fibrolisis ditemukan median (min-max) dari FP PP, FL PP, FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G262 adalah 1,14 (0,1–2,6); 2,30 (1,0–4,4); 1,12 (0,4–1,6); 2,58 (1,2–6,7); 2,97 (1,6–3,5); 1,50 (0,3–2,3); 1,02 (0,1–3,1); 0,64 (0,5–0,8) dapat dilihat di Gambar 4.9. Hasil uji statistik tidak ditemukan perbedaan kadar TGF- β 1 yang berbeda bermakna $p = 0,28$.

Kelompok fibropreventif yang memiliki median kadar TGF- β 1 yang paling rendah terlihat pada FP G65, sedangkan median kadar TGF- β 1 paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G262. Kelompok fibrolisis yang memiliki median kadar TGF- β 1 yang paling rendah terlihat pada FL G262, sedangkan median kadar TGF- β 1 paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL PP. Hal tersebut menunjukkan bahwa dalam fibropreventif, pemberian gambir (FP G65) lebih baik dibandingkan dengan kelompok fibropreventif lainnya termasuk pembanding positif yaitu teh hijau. Kelompok fibrolisis, pemberian gambir (FL G262) lebih baik dibandingkan dengan kelompok fibrolisis lainnya termasuk pembanding positif yaitu teh hijau.



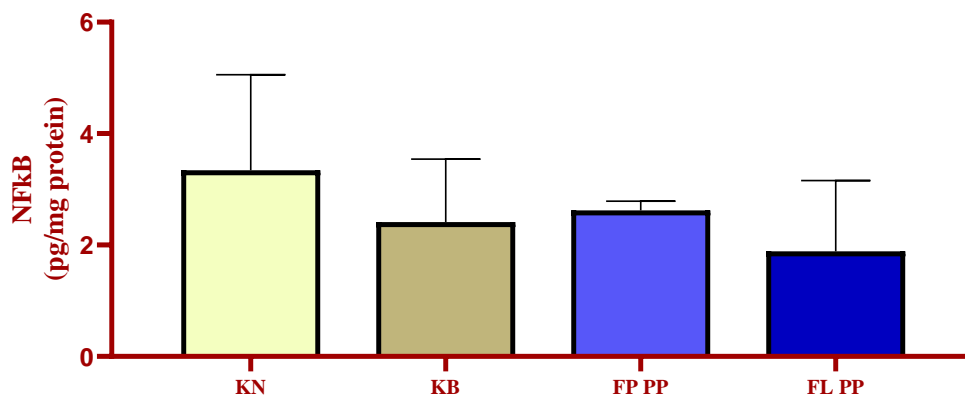
Gambar 4.9. Perbandingan Kadar TGF-β1 antara Pembanding Positif dan Gambir

Kadar TGF-β1 terendah ditemukan pada FL G262. Tidak ditemukan perbedaan kadar TGF-β1 antar kelompok yang berbeda bermakna $p = 0,28$

4.5 Analisis kadar NF-κB antara Kelompok Kontrol, Pembanding Positif dan Gambir Fibropreventif /Fibrolisis

4.5.1 Kadar NF-κB antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif

Pemeriksaan NF-κB (pg/mg protein) antara kelompok kontrol, pembanding positif fibropreventif dan fibrolisis mendapatkan median (min-max) dari KN, KB, FP PP dan FL PP adalah 3,34 (2,5-5,1); 2,41 (1,0-3,5); 2,62 (2,2-2,8); 1,89 (1,9-3,2). Hasil uji statistik Kruskal Wallis tidak ditemukan perbedaan kadar NF-κB antar kelompok, $p = 0,424$. Median kadar NF-κB FL PP lebih rendah dibandingkan FP PP seperti yang terlihat di Gambar 4.10.

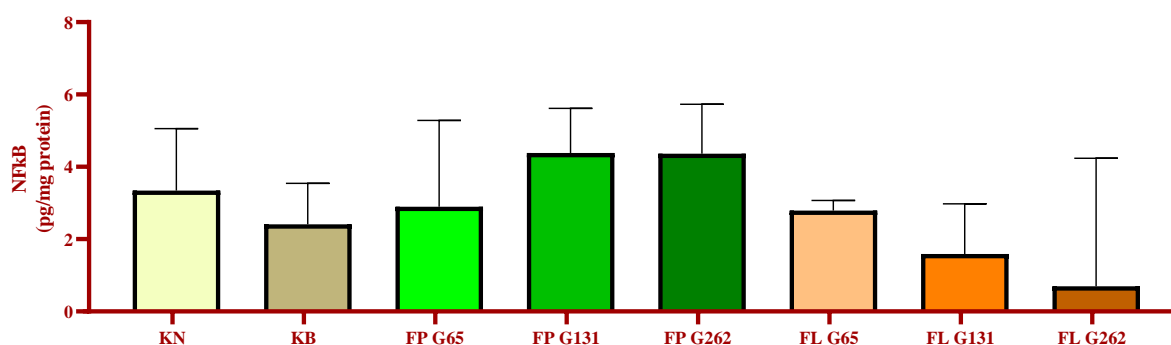


Gambar 4.10. Perbandingan Kadar NF-κB Jaringan Paru antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif

Pemeriksaan kadar NF-κB menunjukkan kelompok dengan kadar NF-κB tertinggi adalah KN, sedangkan FL PP menunjukkan kadar yang terendah. Tidak ditemukan perbedaan kadar NF-κB antar kelompok yang berbeda bermakna $p = 0,424$

4.5.2 Kadar NF- κ B antara Kelompok Kontrol dan Gambir

Pemeriksaan NF- κ B (pg/mg protein) antara kelompok kontrol, gambir fibropreventif dan fibrolisis mendapatkan median (min-max) dari KN, KB, FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131 dan FL G262 adalah 3,34 (2,5–5,1); 2,41 (1,0–3,5); 2,89 (2,2–5,3); 4,38 (3,4–5,6); 4,36 (3,3–5,7); 2,79 (1,7–3,1); 1,59 (1,0–3,0); 0,70 (0,6–4,2) dapat dilihat di Gambar 4.11. Hasil uji statistik tidak ditemukan perbedaan kadar NF- κ B yang berbeda bermakna $p = 0,145$. Kelompok fibropreventif yang memiliki median kadar NF- κ B paling rendah terlihat pada FP G65 tetapi tidak lebih rendah dari KB, sedangkan median kadar NF- κ B paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G131. Kelompok fibrolisis yang memiliki median kadar NF- κ B paling rendah terlihat pada FLG262, sedangkan median kadar NF- κ B paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL G65.



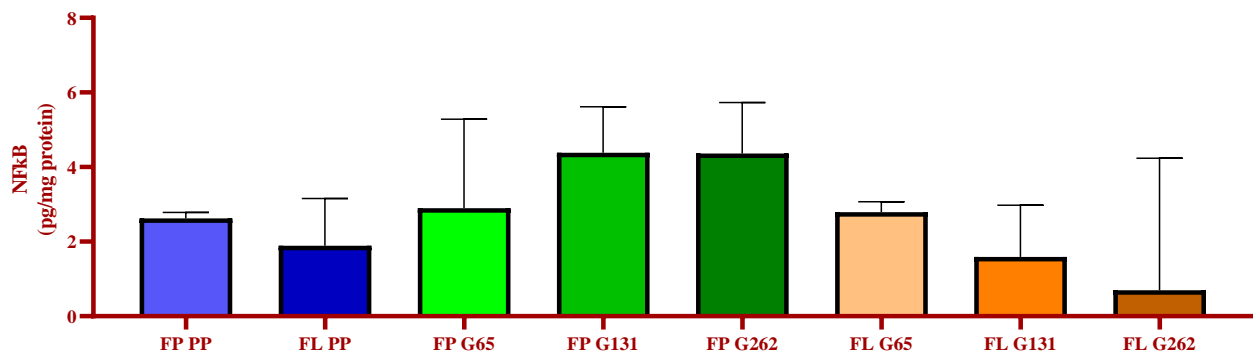
Gambar 4.11. Perbandingan Kadar NF- κ B Jaringan Paru antara Kelompok Pembanding Positif dan Gambir

Pemeriksaan kadar NF- κ B menunjukkan kelompok dengan kadar NF- κ B tertinggi adalah FP G131 dan FP G262, sedangkan pada FL G262 menunjukkan kadar yang terendah. Tidak ditemukan perbedaan bermakna kadar NF- κ B pada kelompok penelitian ($p = 0,145$).

4.5.3 Kadar NF- κ B antara Kelompok Pembanding Positif dan Gambir

Hasil hitung dari pemeriksaan NF- κ B (pg/mg protein) kelompok pembanding positif dan gambir fibropreventif serta fibrolisis ditemukan median (min-max) dari FP PP, FL PP, FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G262 adalah 2,62 (2,2–2,8); 1,89 (1,9–3,2); 2,89 (2,2–5,3); 4,38 (3,4–5,6); 4,36 (3,3–5,7); 2,79 (1,7–3,1); 1,59 (1,0–3,0); 0,70 (0,6–4,2) dapat dilihat di Gambar 4.12. Hasil uji statistik kruskal wallis tidak ditemukan perbedaan kadar NF- κ B yang berbeda bermakna $p = 0,089$.

Kelompok fibropreventif yang memiliki median kadar NF- κ B paling rendah terlihat pada FP PP diikuti oleh FP G65, sedangkan median kadar NF- κ B paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G262. Kelompok fibrosis yang memiliki median kadar NF- κ B paling rendah terlihat pada FL G262, sedangkan median kadar NF- κ B paling tinggi pada kelompok fibrosis terlihat pada FL G65. Hal tersebut menunjukkan bahwa dalam fibropreventif, pemberian teh hijau lebih baik dibandingkan dengan kelompok gambir, namun median FP PP dan FP G65 tidak jauh berbeda. Kelompok fibrosis, pemberian gambir (FL G262) lebih baik dibandingkan kelompok fibrosis lainnya termasuk pembanding positif yaitu teh hijau.



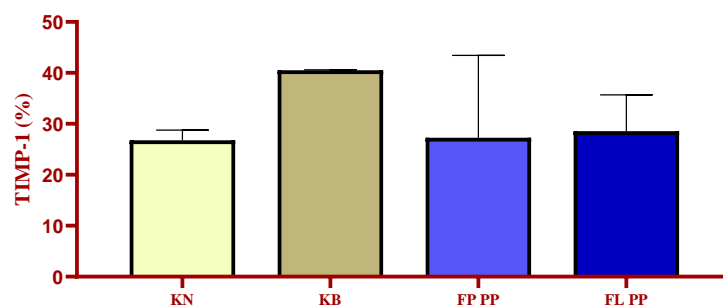
Gambar 4.12. Perbandingan Kadar NF- κ B Jaringan Paru antara Kelompok Pembanding Positif dan Gambir

Pemeriksaan kadar NF- κ B menunjukkan kelompok dengan kadar NF- κ B tertinggi adalah FP G131 dan FP G262, sedangkan pada FL G262 menunjukkan kadar yang terendah. Tidak ditemukan perbedaan bermakna kadar NF- κ B pada kelompok penelitian ($p = 0,089$).

4.6 Analisis Ekspresi TIMP-1 dengan *Image J* dalam Persentase Area Fibrosis Paru antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif

4.6.1 Ekspresi TIMP-1 antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif

Hasil perhitungan pemeriksaan TIMP-1 dengan *Image J* antara kelompok kontrol, pembanding positif fibropreventif dan fibrosis, median (min-max) dari KN, KB, FP PP dan FL PP adalah 26,77 (16,76–28,77); 40,5 (32,44–40,6); 27,28 (21,36–43,34); 28,56 (22,62–35,70) dapat dilihat di Gambar 4.13. Hasil uji statistik Kruskal Wallis tidak mendapatkan perbedaan persentase TIMP-1 yang bermakna $p = 0,282$. Median persentase TIMP-1 FP PP lebih rendah dibandingkan dengan FL PP.



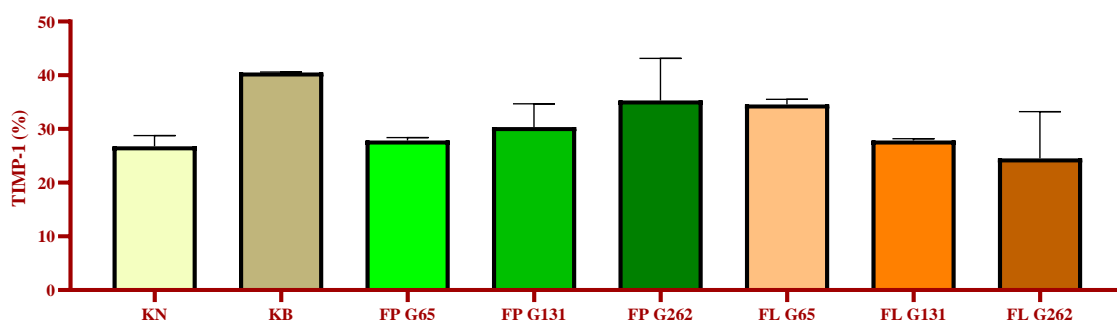
Gambar 4.13. Ekspresi TIMP-1 dengan *Image J* dalam Persentase Area Fibrosis Paru antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif

Median persentase TIMP-1 paling rendah terlihat pada KN diikuti oleh FP PP. Tidak terdapat perbedaan bermakna persentase TIMP-1 antar kelompok.

4.6.2 Ekspresi TIMP-1 antara Kelompok Kontrol dan Gambir

Hasil hitung pemeriksaan TIMP-1 dengan *Image J* antara kelompok kontrol, gambir fibropreventif dan fibrolisis ditemukan median (min–max) dari KN, KB, dan FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G262 adalah 26,77 (16,76–28,77); 40,5 (32,44–40,6); 27,87 (23,14–28,41); 30,37 (20,97–34,70); 35,30 (32,46–43,13); 34,58 (26,50–35,51); 27,84 (22,28–28,20); 24,52 (23,03–33,22) dapat dilihat pada Gambar 4.14. Tidak ditemukan perbedaan persentase TIMP-1 yang berbeda bermakna $p = 0,109$.

Kelompok fibropreventif yang memiliki median persentase TIMP-1 paling rendah terlihat pada FP G65, sedangkan median persentase TIMP-1 paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G262. Kelompok fibrolisis yang memiliki median persentase TIMP-1 paling rendah terlihat pada FL G262, sedangkan median persentase TIMP-1 paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL G262.



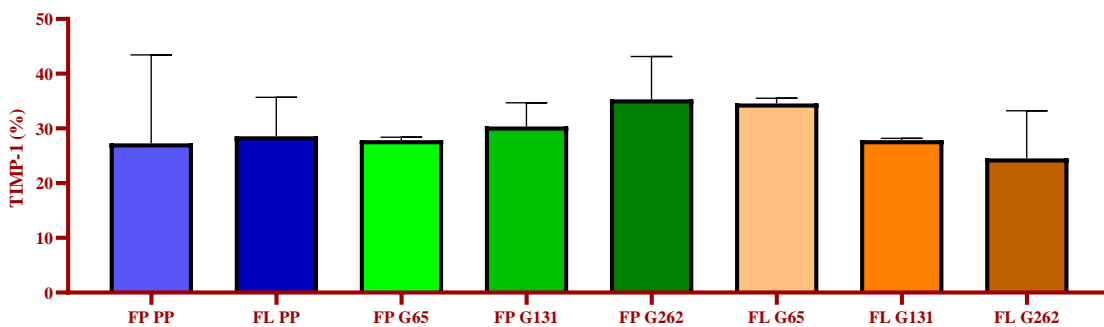
Gambar 4.14. Ekspresi TIMP-1 dengan *Image J* dalam Persentase Area Fibrosis Paru antara Kelompok Kontrol dan Gambir

Median persentase TIMP-1 paling rendah terlihat pada FL G262. Tidak terdapat perbedaan bermakna persentase TIMP-1 antar kelompok

4.6.3 Ekspresi TIMP-1 antara Kelompok Pembanding Positif dan Gambir

Hasil hitung pemeriksaan persentase TIMP-1 (%) pada kelompok teh hijau dan gambir fibropreventif serta fibrolisis mendapatkan nilai median (min–max) dari FP PP, FL PP, FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G262 adalah 27,28 (21,36–43,34); 28,56 (22,62–35,70); 27,87 (23,14–28,41); 30,37 (20,97–34,70); 35,30 (32,46–43,13); 34,58 (26,50–35,51); 27,84 (22,28–28,20); 24,52 (23,03–33,22) dapat dilihat di Gambar 4.15. Tidak ditemukan perbedaan persentase TIMP-1 yang berbeda bermakna $p = 0,574$.

Kelompok fibropreventif yang memiliki median persentase TIMP-1 paling rendah terlihat pada FP PP, sedangkan median persentase TIMP-1 paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G262. Kelompok fibrolisis yang memiliki median persentase TIMP-1 paling rendah terlihat pada FL G262, sedangkan median persentase TIMP-1 paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL G65. Hal tersebut menunjukkan bahwa dalam fibropreventif, pemberian teh hijau sebagai pembanding positif lebih baik dibandingkan dengan gambir. Kelompok fibrolisis, pemberian gambir (FL G262) lebih baik dibandingkan kelompok fibrolisis lainnya termasuk pembanding positif yaitu teh hijau.



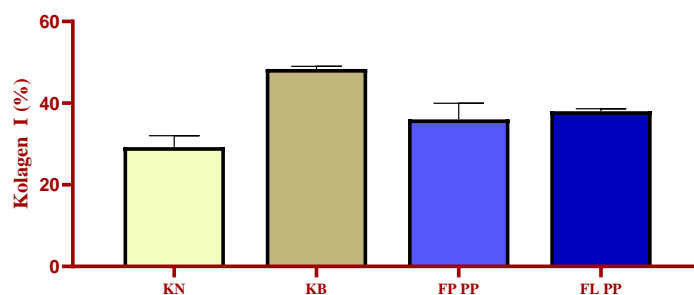
Gambar 4.15. Ekspresi TIMP-1 dengan *Image J* dalam Persentase Area Fibrosis Paru antara Kelompok Pembanding Positif dan Gambir

Median persentase TIMP-1 paling rendah terlihat pada FL G262. Tidak terdapat perbedaan bermakna persentase TIMP-1 antar kelompok.

4.7 Analisis Ekspresi Kolagen I dengan *Image J* dalam Persentase Area Fibrosis Paru antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif

4.7.1 Ekspresi Kolagen I antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif

Hasil perhitungan pemeriksaan Kolagen I dengan *Image J* antara kelompok kontrol, teh hijau fibropreventif dan fibrolisis ditemukan median (min-max) dari KN, KB, FP PP dan FL PP adalah 29,2 (26,35–32,03); 48,36 (44,51–49,02); 36,04 (26,17–39,99); 38,02 (29,40–38,64) dapat dilihat di Gambar 4.16. Hasil uji statistik Kruskal Wallis tidak ditemukan perbedaan persentase kolagen I yang berbeda bermakna $p = 0,063$. Median persentase Kolagen I FP PP lebih rendah dibandingkan dengan FL PP.



Gambar 4.16. Ekspresi Kolagen I dengan *Image J* dalam Persentase Area Fibrosis Paru antara Kelompok Kontrol dan Pembanding Positif

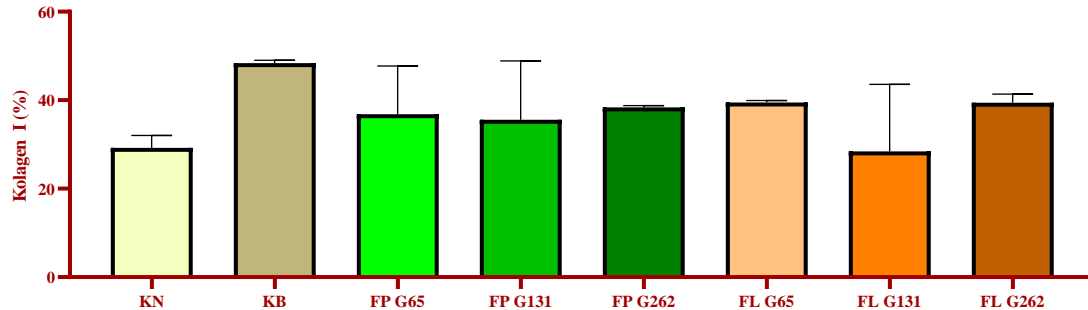
Median persentase Kolagen I paling rendah terlihat pada KN diikuti oleh FP PP. Tidak terdapat perbedaan bermakna persentase Kolagen I antar kelompok.

4.7.2 Ekspresi Kolagen I antara Kelompok Kontrol dan Gambir

Hasil hitung pemeriksaan Kolagen I dengan *Image J* antara kelompok kontrol, gambir fibropreventif dan fibrolisis ditemukan median (min-max) dari KN, KB dan FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G262 adalah 29,2 (26,35–32,03); 48,36 (44,51–49,02); 36,82 (34,88–47,71); 35,59 (32,53–48,90); 38,4 (29,82–38,77); 39,46 (33,43–39,93); 28,41 (26,42–43,57); 39,43 (37,95–41,40) dapat dilihat di Gambar 4.17. Hasil uji statistik tidak ditemukan perbedaan persentase Kolagen I yang berbeda bermakna $p = 0,098$.

Kelompok fibropreventif yang memiliki median persentase Kolagen I paling rendah terlihat pada FP 131 diikuti oleh FP G65, sedangkan median persentase Kolagen I paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G262. Kelompok fibrolisis yang memiliki median persentase Kolagen I paling rendah terlihat pada FL

G131, sedangkan median persentase Kolagen I paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL G65.



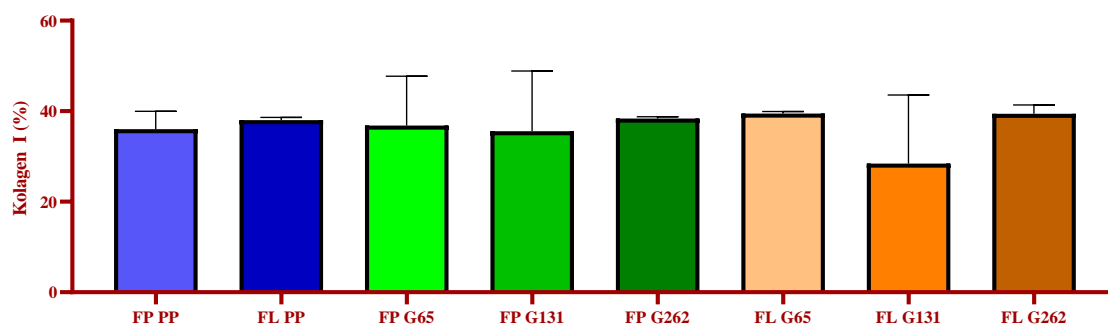
Gambar 4.17. Ekspresi Kolagen I dengan *Image J* dalam Persentase Area Fibrosis Paru antara Kelompok Kontrol dan Gambir

Median persentase Kolagen I paling rendah terlihat pada FL G131. Tidak terdapat perbedaan bermakna persentase Kolagen I antar kelompok.

4.7.3 Ekspresi Kolagen I antara Kelompok Pembanding Positif dan Gambir

Hasil hitung pemeriksaan Kolagen I (%) kelompok teh hijau dan gambir fibropreventif serta fibrolisis ditemukan median (min–max) dari FP PP, FL PP, FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G262 adalah 36,04 (26,17–39,99); 38,02 (29,40–38,64); 36,82 (34,88–47,71); 35,59 (32,53–48,90); 38,4 (29,82–38,77); 39,46 (33,43–39,93); 28,41 (26,42–43,57); 39,43 (37,95–41,40) dapat dilihat di Gambar 4.17B. Hasil uji statistik tidak ditemukan persentase Kolagen I yang berbeda bermakna $p = 0,909$.

Kelompok fibropreventif yang memiliki median persentase Kolagen I paling rendah terlihat pada FP G131 sedangkan median persentase Kolagen I paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G262. Kelompok fibrolisis yang memiliki median persentase Kolagen I paling rendah terlihat pada FL G131, sedangkan median persentase Kolagen I paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL G65. Hal tersebut menunjukkan bahwa dalam fibropreventif dan fibrolisis pemberian gambir (FP G131 dan FP G262) lebih baik dibandingkan dengan kelompok fibropreventif dan fibrolisis termasuk pembanding positif yaitu teh hijau.



Gambar 4.17. Ekspresi Kolagen I dengan *Image J* dalam Persentase Area Fibrosis Paru antara Kelompok Pembanding Positif dan Gambir

Median persentase kolagen I paling rendah terlihat pada FL G131. Tidak terdapat perbedaan bermakna persentase Kolagen I antar kelompok.

4.8 Delta Nilai Hitung Jenis Sel Radang, Kadar TGF- β 1 BAL, NF- κ B Jaringan Paru, Ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I

Delta nilai hitung selisih didapatkan melalui pengurangan rerata kelompok bleomisin terhadap rerata kelompok perlakuan. Delta jumlah sel radang terbesar terlihat pada FP PP. Delta kadar TGF- β 1 dan NF- κ B terbesar terlihat pada FL G262. Delta TIMP-1 dan Kolagen I terbesar terlihat pada FL G131 (Tabel 4.3.).

Kelompok fibropreventif FP PP memiliki delta terbesar dibandingkan kelompok fibropreventif lainnya berdasarkan jumlah sel radang (3,15), kadar NF- κ B (-0,22) dan ekspresi Kolagen I (13,23) diikuti oleh FP G65 yang juga memiliki delta terbesar dibandingkan kelompok fibropreventif lainnya berdasarkan kadar TGF- β 1 (3,38) dan ekspresi TIMP-1 (11,37).

Kelompok fibropreventif gambir menunjukkan delta terbesar jumlah sel radang dan terlihat pada FP G262, namun tidak terlihat adanya pengaruh semakin tinggi/rendahnya suatu dosis dalam menurunkan jumlah sel radang. Di lain sisi, delta terbesar kadar TGF- β 1 dan ekspresi TIMP-1 pada kelompok terlihat pada FP G65 serta terlihat adanya pengaruh semakin rendah dosis gambir semakin baik dalam menurunkan kadar TGF- β 1 dan ekspresi TIMP-1 (penurunan delta rerata kadar TGF- β 1 dan ekspresi TIMP-1 sejalan dengan peningkatan dosis gambir). Hal tersebut berlawanan dengan delta Kolagen I yang menunjukkan delta terbesar Kolagen I terlihat pada FP G262. Delta rerata kadar NF- κ B pada kelompok

fibropreventif menunjukkan hasil negatif yang berarti pemberian fibropreventif gambir dan pembanding positif memiliki rerata kadar NF- κ B yang lebih tinggi dibandingkan kelompok bleomisin serta semakin tinggi dosis gambir semakin meningkatkan kadar NF- κ B.

Kelompok fibrolisis FL G262 memiliki delta terbesar dibandingkan kelompok fibrolisis lainnya berdasarkan jumlah sel radang (0,63), kadar TGF- β 1 (3,80) dan kadar NF- κ B (0,48) diikuti oleh FL G131 yang juga memiliki delta terbesar dibandingkan dengan kelompok fibrolisis lainnya berdasarkan kadar NF- κ B (0,48), kadar TIMP-1 (11,74) dan kadar Kolagen I (14,50). Delta rerata jumlah sel radang dan ekspresi Kolagen I tidak terlihat adanya pengaruh semakin tinggi/rendahnya suatu dosis dalam menurunkan jumlah sel radang dan ekspresi Kolagen I. Di sisi lain, kadar TGF- β 1, NF- κ B dan ekspresi TIMP-1 menunjukkan semakin tinggi dosis gambir semakin baik dalam menurunkan kadar TGF- β 1, NF- κ B dan ekspresi TIMP-1 (penaikkan delta rerata kadar TGF- β 1, NF- κ B dan ekspresi TIMP-1 I sejalan dengan peningkatan dosis gambir). Nilai selisih (D) dapat terlihat bahwa kelompok FP G65 memberikan efek fibropreventif paling besar, sedangkan kelompok FL G262 memberikan efek fibrolisis yang paling besar.

Tabel 4.2. Delta Rerata Kelompok Uji Coba dengan Kelompok Bleomisin

Kelompok	Δ Jumlah Sel Radang, $10^3/m$	Δ Kadar TGF- β 1, pg/mg	Δ Kadar NF- κ B, pg/mg	Δ Kadar TIMP-1, %	Δ Kadar Kolagen I, %
FP PP	3,15	3,16	-0,22	7,15	13,23
FP G65	2,52	3,38	-1,12	11,37	7,49
FP G131	0,62	0,94	-2,13	9,17	8,29
FP G262	2,80	1,76	-2,12	0,88	11,63
FL PP	0,13	1,88	0,03	8,89	11,94
FL G65	0,13	3,08	-0,18	5,65	9,69
FL G131	-1,08	3,06	0,48	11,74	14,50
FL G262	0,63	3,80	0,48	10,92	7,70

KN = kontrol negatif; KB = kontrol bleomisin; FP PP = fibropreventif pembanding positif; FL PP = fibrolisis pembanding positif; FP G65 = fibropreventif gambir dosis 65 mg/kg BB; FP 131 = fibropreventif gambir dosis 131 mg/kg BB; FP 262 = fibropreventif gambir dosis 262 mg/kg BB; FL G65 = fibrolisis gambir dosis 65 mg/kg BB; FL G131 = fibrolisis gambir dosis 131 mg/kg BB; FL G262 = fibrolisis gambir dosis 262 mg/kg BB

4.9 Gambaran Histopatologi Jaringan Paru dengan Pewarnaan Hematoksin-Eosin dan Masson-Trichome

Berdasarkan gambaran histopatologis yang dilihat, masing-masing kelompok dinilai dengan skor Modifikasi Ascroft untuk menentukan derajat fibrosis pada masing-masing kelompok yang dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

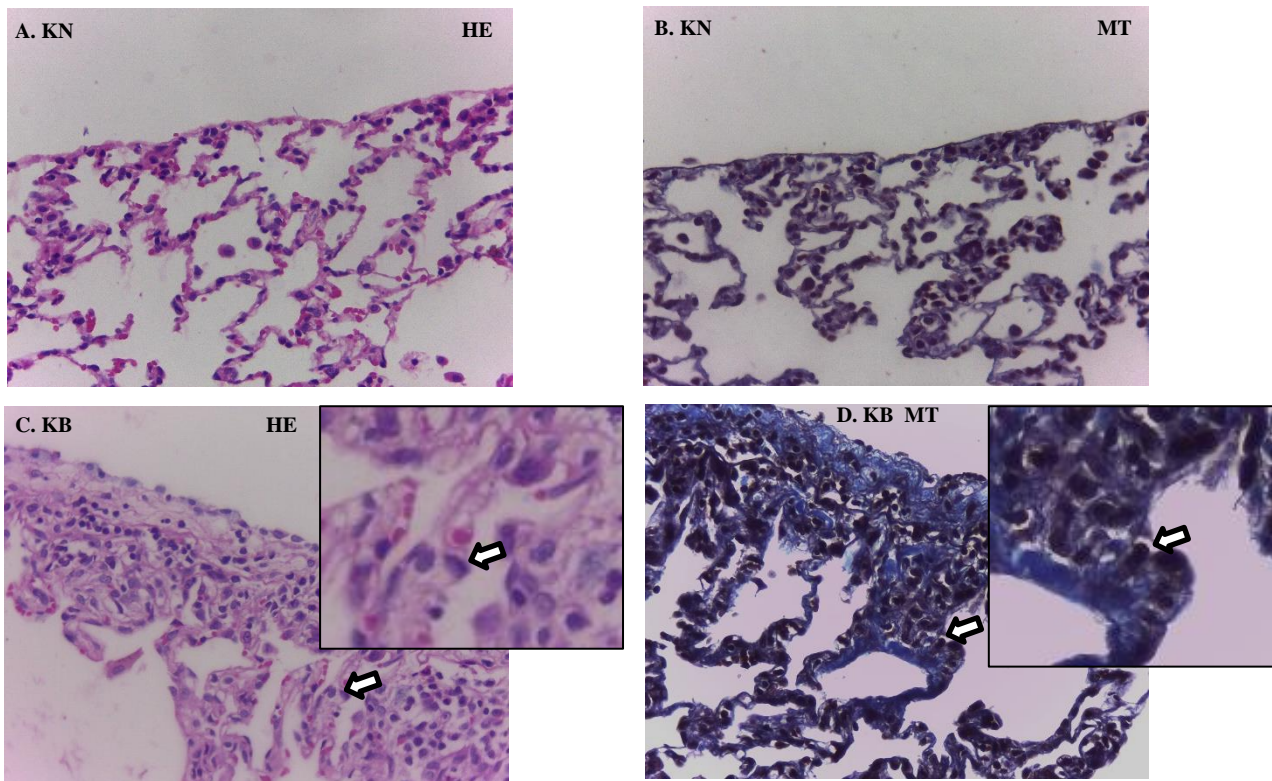
Tabel 4.3. Derajat Fibrosis Berdasarkan Skor Modifikasi Ascroft

Kelompok n = 3	Derajat Fibrosis	Gambaran Histopatologis
KN	Derajat 0	Septum alveoli: tidak ditemukan fibrosis pada sebagian besar dinding alveoli. Struktur paru normal
KB	Derajat 7	Septum alveoli: tidak berbentuk. Struktur paru: alveoli bergabung dengan massa fibrosis, masih tampak gelembung udara
FP PP	Derajat 5	Septum alveoli: bervariasi. Struktur paru <i>confluent fibrotic masses</i> , $\geq 10\%$ dan $\leq 50\%$ lapang pandang, kerusakan struktur meluas.
FL PP	Derajat 5	Septum alveoli: bervariasi. Struktur paru <i>confluent fibrotic masses</i> , $\geq 10\%$ dan $\leq 50\%$ lapang pandang, kerusakan struktur meluas.
FP G65	Derajat 5	Septum alveoli: bervariasi. Struktur paru <i>confluent fibrotic masses</i> , $\geq 10\%$ dan $\leq 50\%$ lapang pandang, kerusakan struktur meluas.
FP G131	Derajat 6	Septum alveoli: bervariasi, sebagian besar berubah bentuk. Struktur paru: massa fibrotik besar, $\geq 50\%$ lapang pandang, kerusakan struktur sangat luas
FP G262	Derajat 6	Septum alveoli: bervariasi, sebagian besar berubah bentuk. Struktur paru: massa fibrotik besar, $\geq 50\%$ lapang pandang, kerusakan struktur sangat luas
FL G65	Derajat 5	Septum alveoli: bervariasi. Struktur paru <i>confluent fibrotic masses</i> , $\geq 10\%$ dan $\leq 50\%$ lapang pandang, kerusakan struktur meluas.
FL G131	Derajat 5	Septum alveoli: bervariasi. Struktur paru <i>confluent fibrotic masses</i> , $\geq 10\%$ dan $\leq 50\%$ lapang pandang, kerusakan struktur meluas.
FL G262	Derajat 3	Septum alveoli: dinding mulai fibrosis, ketebalan $\geq 3x$ dari normal. Struktur paru: sebagian alveoli membesar, belum terlihat fibrosis

KN = kontrol negatif; KB = kontrol bleomisin; FP PP = fibropreventif pembanding positif; FL PP = fibrolisis pembanding positif; FP G65 = fibropreventif gambir dosis 65 mg/kg BB; FP 131 = fibropreventif gambir dosis 131 mg/kg BB; FP 262 = fibropreventif gambir dosis 262 mg/kg BB; FL G65 = fibrolisis gambir dosis

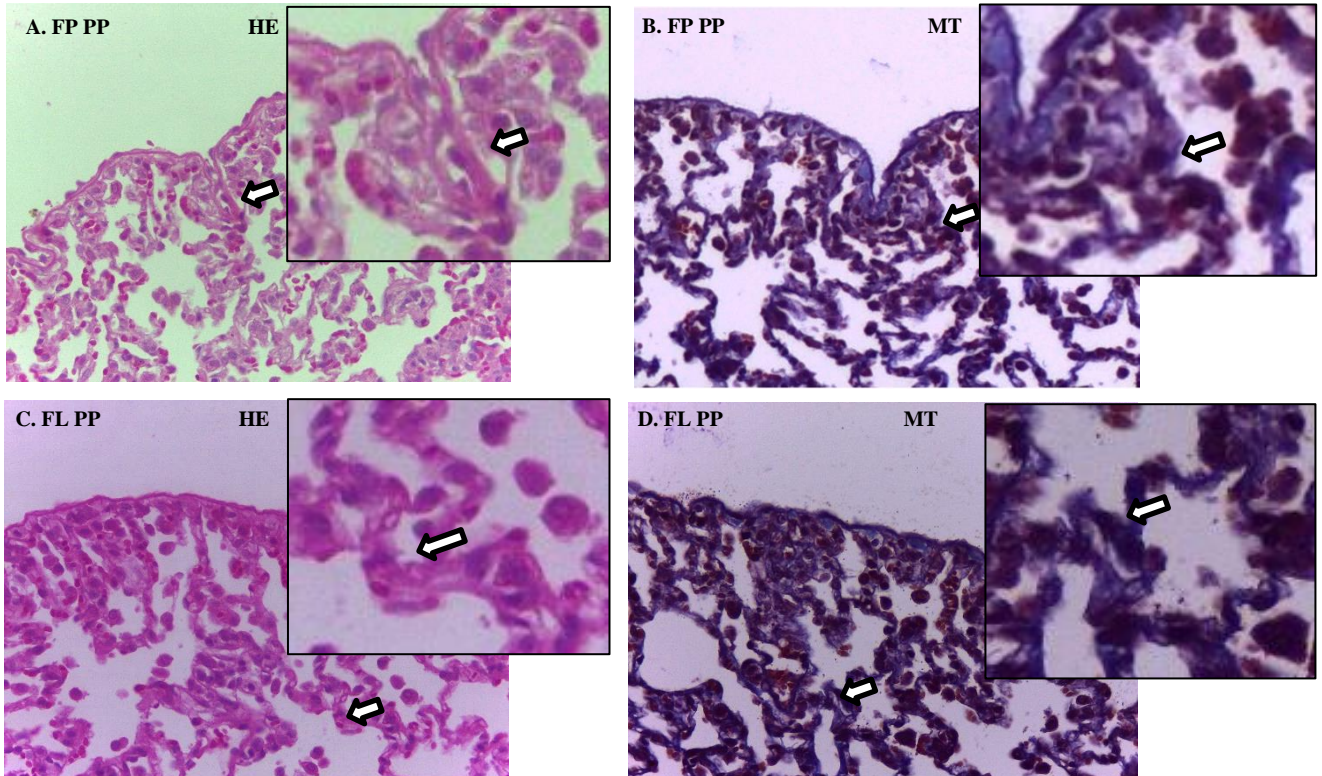
65 mg/kg BB; FL G131 = fibrolisis gambir dosis 131 mg/kg BB; FL G262 = fibrolisis gambir dosis 262 mg/kg BB

Berdasarkan skor Modifikasi Ashcroft ditemukan bahwa gambaran histopatologi derajat terendah yaitu derajat 0 terdapat pada KN. Gambaran histopatologi terberat berdasarkan skor Modifikasi Ashcroft terlihat pada KB. Kelompok fibropreventif yang memiliki derajat terendah berdasarkan skor Modifikasi Ashcroft adalah FP G65 dan FP PP (derajat 5). Kelompok fibrolisis yang memiliki derajat terendah berdasarkan skor Modifikasi Ashcroft adalah FL G262 (Derajat 3). Gambaran histopatologi jaringan paru dengan pewarnaan hematoksilin-eosin dan masson-trichrome dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



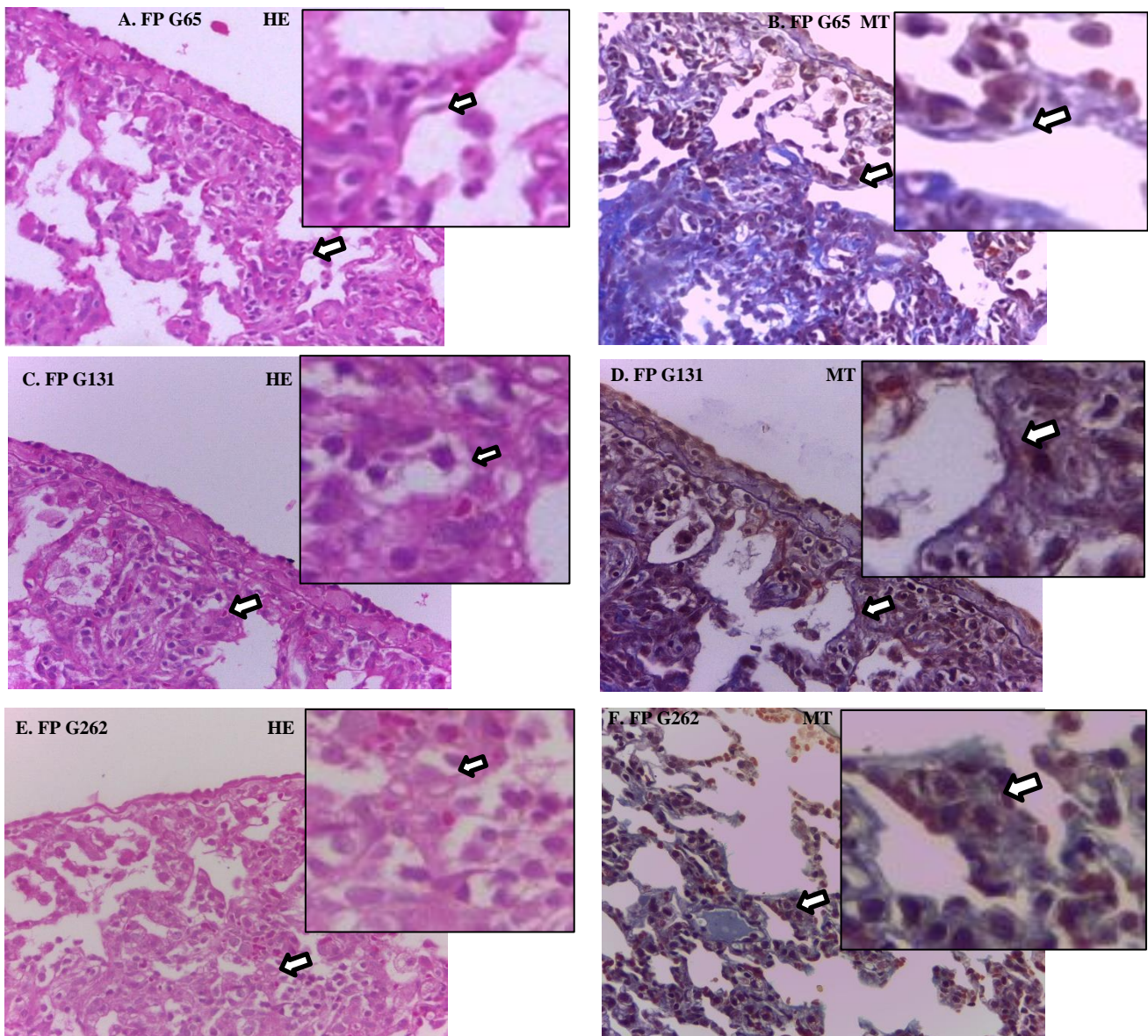
Gambar 4.18. Perubahan Gambaran Histopatologi Jaringan Paru pada Kelompok Kontrol Negatif dan Bleomisin

A. Kelompok KN menunjukkan alveoli yang mengembang dengan sedikit sel radang. B. Tidak ditemukan fibrosis pada KN (derajat 0) C. Kelompok KB, tanda panah menunjukkan gambaran alveoli dengan dinding septum yang mengalami fibrosis. D. Terlihat jelas fibrosis di dinding alveolus, septum alveoli tidak berbentuk dan alveoli bergabung dengan massa fibrosis (derajat 7). A dan C = pewarnaan H&E; B dan D = Masson Trichrome. Pembesaran asli 400 kali)



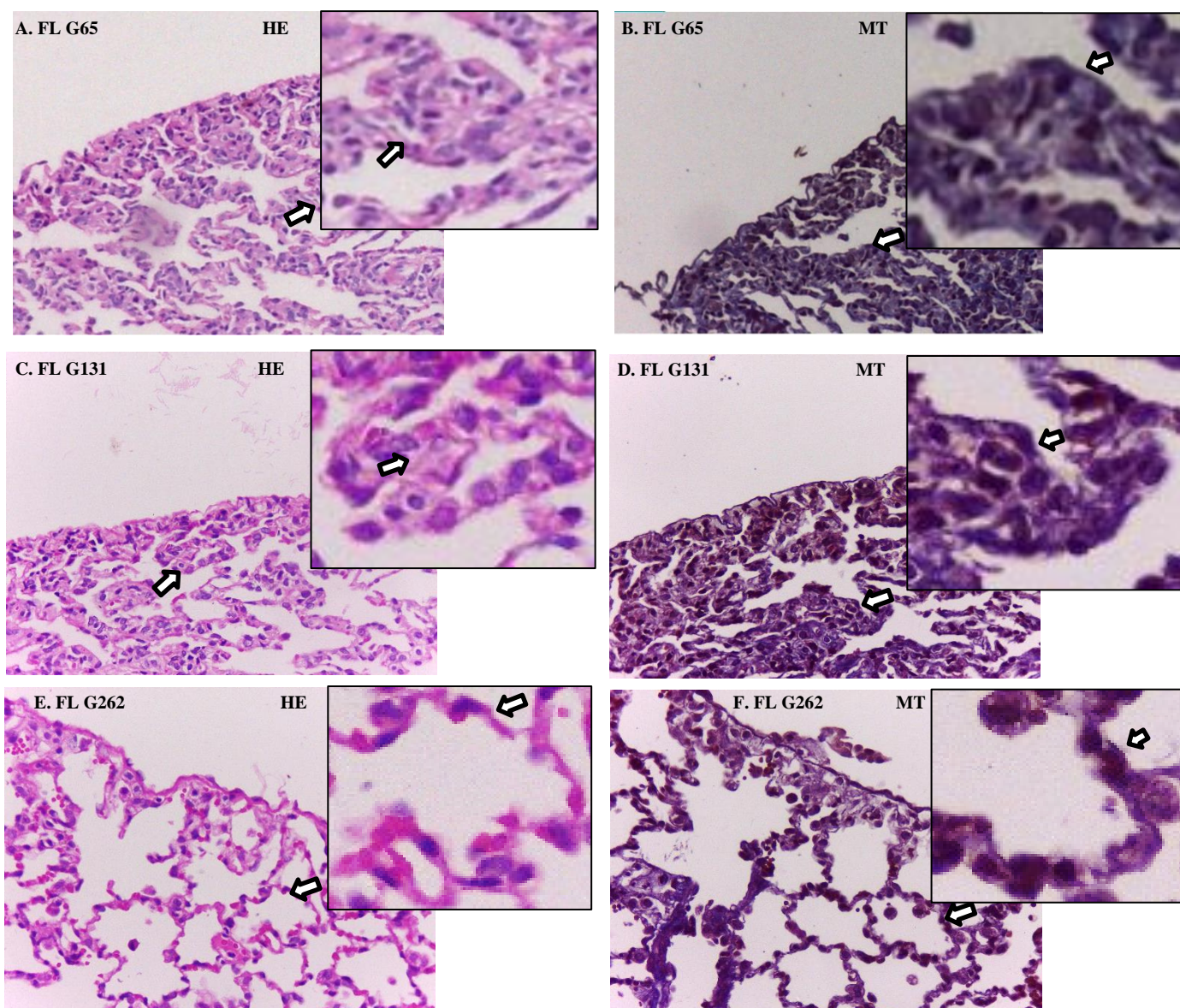
Gambar 4.19. Gambaran Perubahan Histopatologi Jaringan Paru pada Pembandingan Positif Fibropreventif dan Fibrolisis

A. Kelompok FP PP, tanda panah menunjukkan septum alveoli yang bervariasi. B. Struktur paru *confluent fibrotic masses*, $\geq 10\%$ dan $\leq 50\%$ lapangan pandang, kerusakan struktur meluas (derajat 5). C. Kelompok FL PP, tanda panah menunjukkan tebal septum alveoli yang bervariasi. D. Struktur paru *confluent fibrotic masses*, $\geq 10\%$ dan $\leq 50\%$ lapang pandang, kerusakan struktur meluas (derajat 5). (A dan C, pewarnaan H&E; B dan D, Masson Trichrome. Pembesaran asli 400 kali)



Gambar 4.20. Perubahan Gambaran Histopatologi Jaringan Paru pada Kelompok Fibropreventif Gambir dengan berbagai Dosis

A. Kelompok FP G65, tanda panah menunjukkan septum alveoli yang bervariasi. B. Struktur paru *confluent fibrotic masses*, $\geq 10\%$ dan $\leq 50\%$ lapang pandang, kerusakan struktur yang luas/*confluent* (derajat 5). C. Kelompok FP G131, tanda panah menunjukkan septum alveoli yang bervariasi, sebagian besar berubah bentuk. D. Struktur paru *confluent fibrotic masses* $\geq 50\%$ lapang pandang, kerusakan struktur sangat luas (derajat 6). E. Kelompok FP G262, tanda panah menunjukkan septum alveoli yang bervariasi. F. Struktur paru *confluent fibrotic masses* $\geq 50\%$ lapang pandang, kerusakan struktur sangat luas (derajat 6). (A, C dan E = pewarnaan H&E; B, D dan F = Masson Trichrome. Pembesaran asli 400 kali)

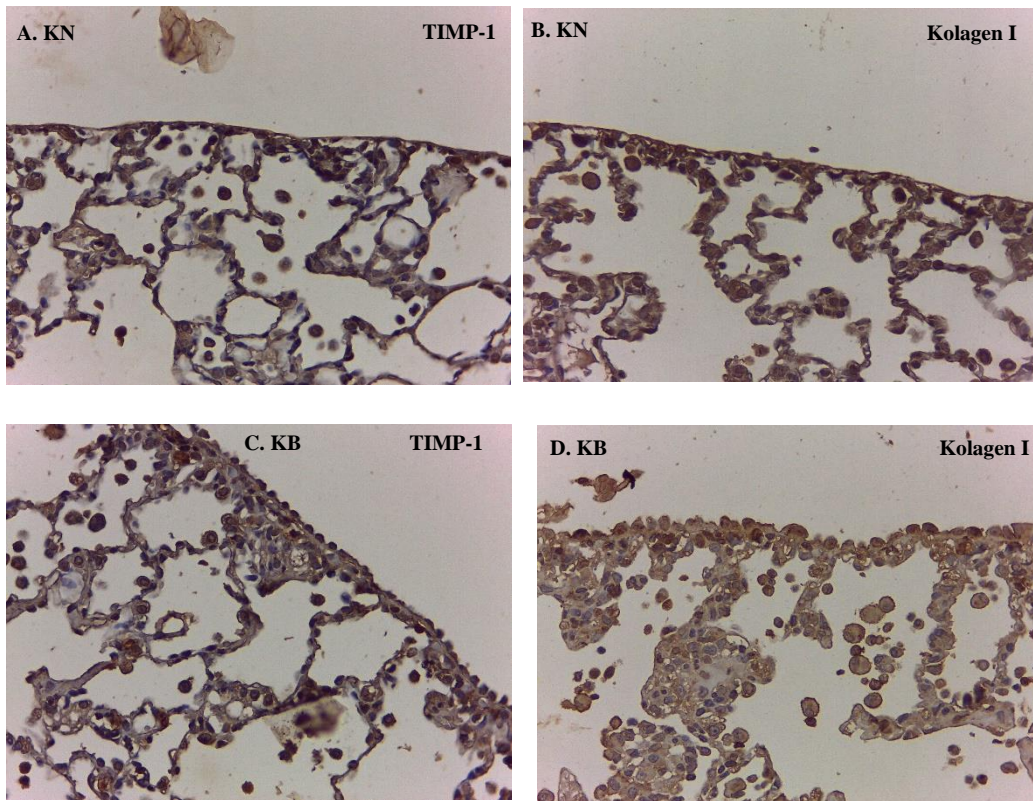


Gambar 4.21. Gambaran Histopatologi Perubahan Jaringan Paru pada Kelompok Fibrolisis Gamber dengan berbagai Dosis

A. Kelompok FL G65, tanda panah menunjukkan septum alveoli yang bervariasi. B. Struktur paru *confluent fibrotic masses*, $\geq 10\%$ dan $\leq 50\%$ lapang pandang, kerusakan struktur meluas (derajat 5). C. Kelompok FL G131, tanda panah menunjukkan septum alveoli yang bervariasi. D. Struktur paru *confluent fibrotic masses*, $\geq 10\%$ dan $\leq 50\%$ lapang pandang, kerusakan struktur meluas (derajat 5). E. Kelompok FL G262, tanda panah menunjukkan dinding alveoli mulai fibrosis, ketebalan $\geq 3x$ dari normal. F. Struktur paru: sebagian alveoli membesar, belum terlihat fibrosis (derajat 3). (A, C dan E = pewarnaan H&E; B, D dan F = Masson trichrome. Pembesaran asli 400 kali)

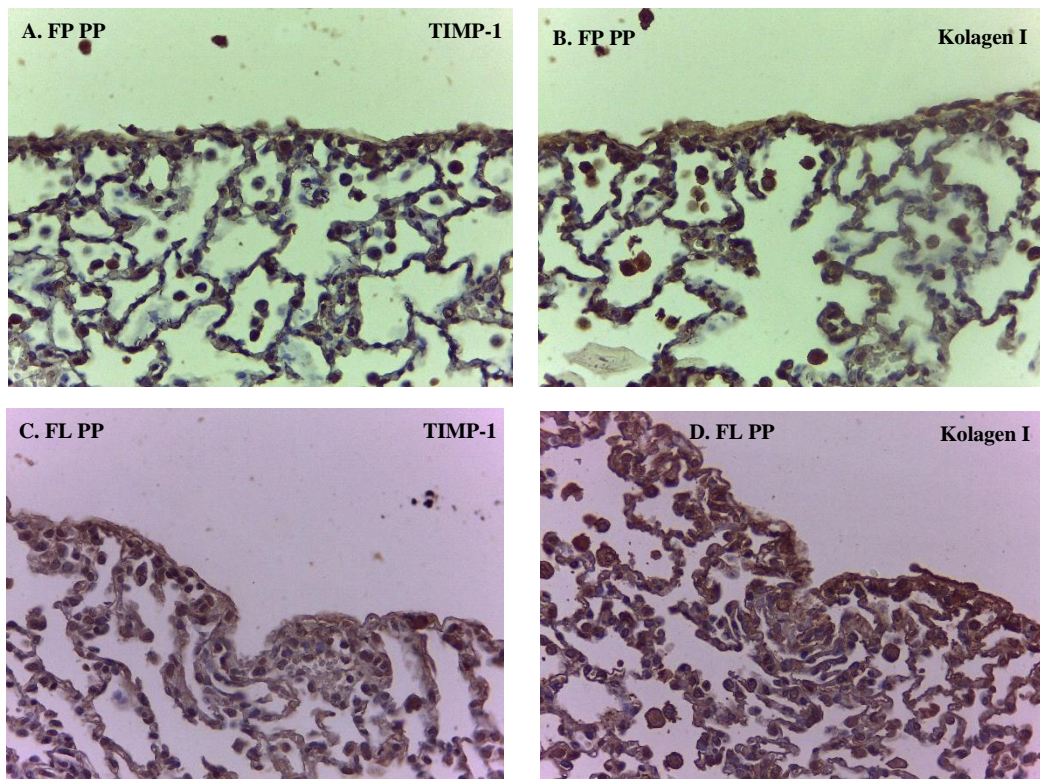
4.10 Ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I dengan Pemeriksaan Imunohistokimia

Gambaran tingkat fibrosis paru dengan imunohistokimia dapat dilihat pada gambar di bawah ini



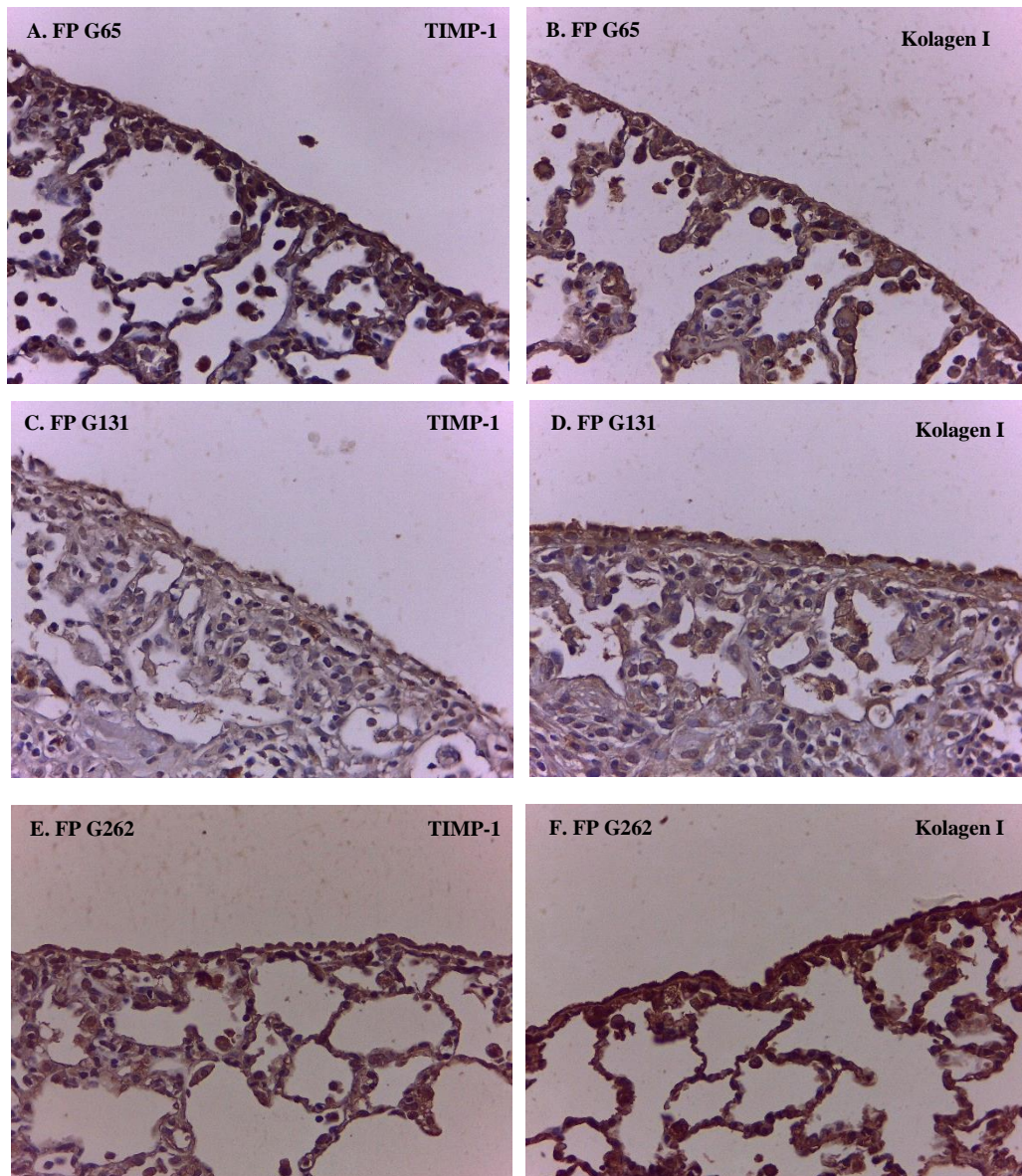
Gambar 4.22. Ekspresi TIMP-1 pada kelompok KN dan KB

A dan B, kelompok KN menunjukkan ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I pada interstitial alveoli. C dan D, kelompok KB menunjukkan ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I yang lebih banyak sampai terlihat di septum interstitial dibandingkan dengan KN. Peningkatan ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I menunjukkan tingkat fibrosis yang dialami pada kelompok tersebut (A dan C, TIMP-1; B dan D, Kolagen I)



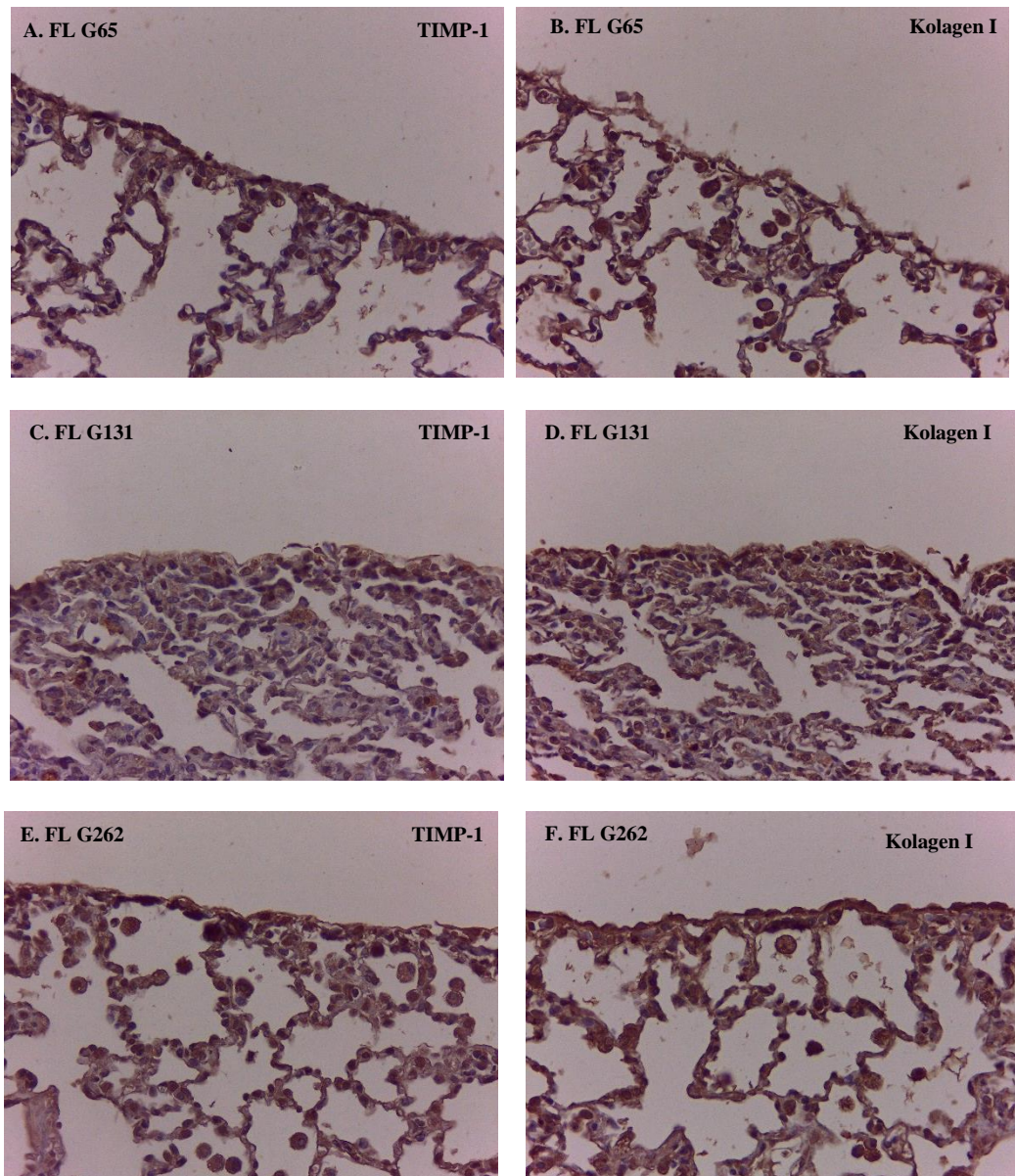
Gambar 4.23. Ekspresi TIMP-1 (A) dan Kolagen I (B) pada Kelompok Fibropreventif dan Fibrosis Pembanding Positif

A dan B, kelompok FP PP menunjukkan ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I terbatas pada interstitial alveoli. C dan D, kelompok FL PP menunjukkan ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I yang lebih banyak sampai terlihat di semua dinding alveoli. Peningkatan ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I menunjukkan tingkat fibrosis yang dialami pada kelompok tersebut (A dan C, TIMP-1; B dan D, Kolagen I)



Gambar 4.24. Ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I pada Kelompok Fibropreventif dengan Gambir berbagai Dosis

A dan B, kelompok FP G65 menunjukkan ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I terbatas di interstitial alveoli. C dan D, kelompok FP G131 menunjukkan ekspresi TIMP-1 dan Kolagen yang lebih banyak, terlihat peningkatan ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I di bagian paru yang mengalami fibrosis dan penebalan dinding alveolus. E dan F, kelompok FP G262, menunjukkan ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I di interstitial dan dinding alveoli serta tampak ekspresi TIMP-1 dan Kolagen di bagian fibrosis paru. Peningkatan ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I menunjukkan tingkat fibrosis yang dialami pada kelompok tersebut (A, C dan E, TIMP-1; B, D dan F; Kolagen I)



Gambar 4.25. Ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I pada Kelompok Fibrosis Gambir berbagai Dosis

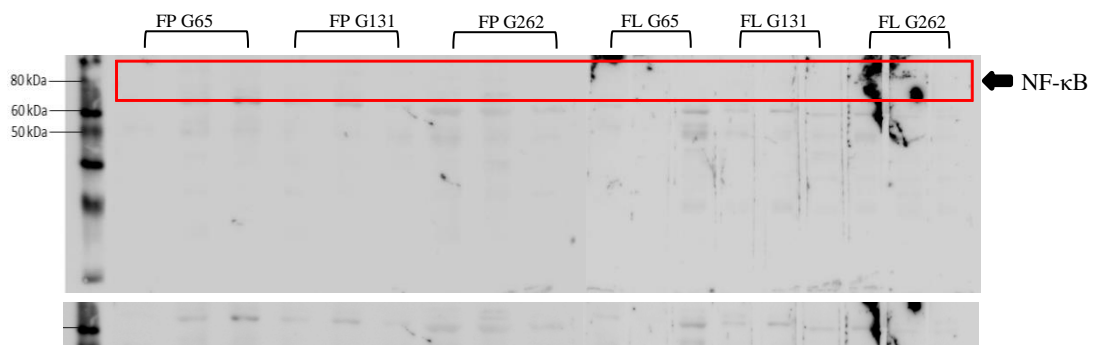
A dan B, kelompok FL G65 menunjukkan ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I di interstitial alveoli. C dan D, kelompok FL G131 menunjukkan ekspresi TIMP-1 dan Kolagen yang lebih banyak, terlihat peningkatan ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I di bagian paru yang mengalami fibrosis dan penebalan dinding alveolus. E dan F, kelompok FL G262, menunjukkan ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I di interstitial dan dinding alveoli. Peningkatan ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I menunjukkan tingkat fibrosis yang dialami pada kelompok tersebut (A, C dan E, TIMP-1; B, D dan F; Kolagen I)

Pada hewan yang diinduksi bleomisin, ekspresi kolagen I ekstraselular ditandai dengan warna coklat yang nyata terlihat sepanjang septum alveoli. Demikian juga dengan ekspresi TIMP-1. Ekspresi kolagen I di septum alveoli dan endotel. Gambaran mikroskopik terlihat bahwa ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I ditandai

dengan berupa serat warna coklat yang nyata terlihat sepanjang septum alveoli. Persentase area fibrosis paru dianalisis dengan *Image J* (sesuai dengan yang dicantumkan pada metodologi).

4.11 Analisis NF- κ B dengan Pemeriksaan *Western Blott*

Pemeriksaan dengan menggunakan *western blott* menunjukkan bahwa pada FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G262 terlihat di band spesifik untuk ukuran p65 seperti yang terlihat di Gambar 4.18. Hal tersebut menunjukkan interaksi gambir yang diberikan dapat mengikat NF- κ B sehingga NF- κ B tidak translokasi ke nukleus, yang menyebabkan tidak terjadinya proses inflamasi/fibrogenesis. Pada KN, KB, FP PP dan FL PP tidak terlihat band spesifik seperti pada kelompok gambir (lampiran)

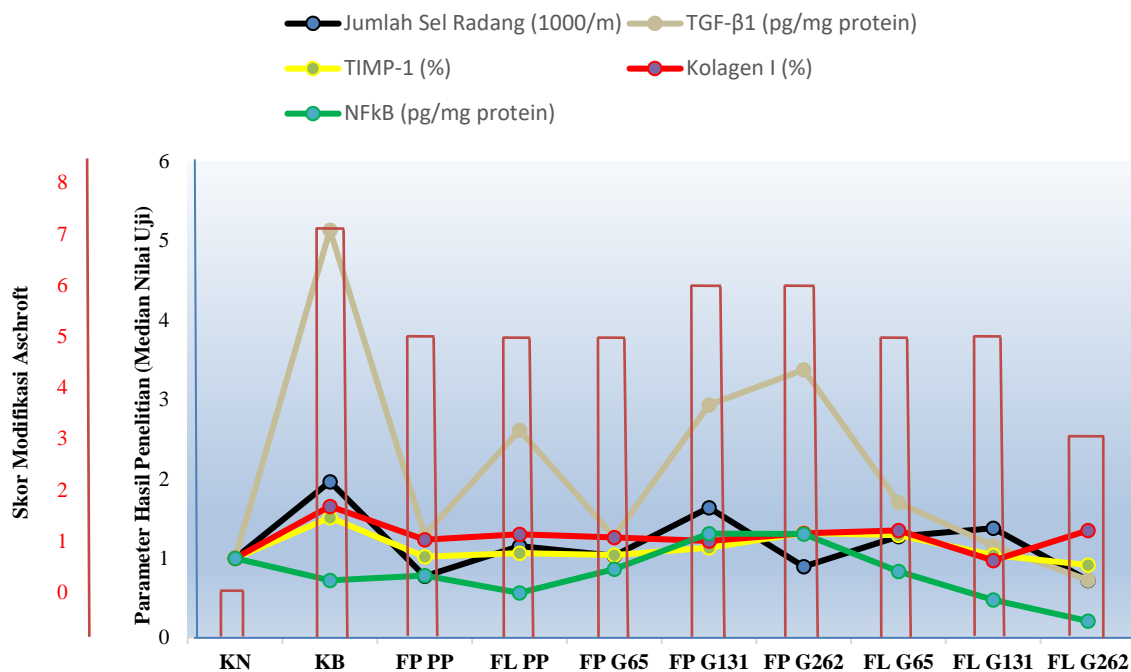


Gambar 4.26. Hasil Pemeriksaan NF- κ B menggunakan Metode *Western Blott* pada Kelompok Gambir

4.12 Rangkuman Hasil Penelitian

Rangkuman parameter hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok fibropreventif yaitu FP PP dan FP G65 menunjukkan titik grafik yang lebih rendah secara umum dibandingkan dengan kelompok fibropreventif lainnya (Gambar 4.19.). FP PP memiliki hitung jenis sel radang dan kadar TIMP-1 terendah sedangkan FP G65 memiliki kadar TGF- β 1 dan NF- κ B terendah dibandingkan dengan kelompok fibropreventif lainnya. FP PP dan FP G65 juga menunjukkan skor modifikasi ascroft (derajat 5) yang lebih baik dibandingkan kelompok fibropreventif lainnya.

Kelompok fibrolisis yaitu FL G262 menunjukkan titik grafik yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok fibrolisis lainnya (Gambar 4.19.). FL G262 memiliki hitung jenis sel radang, kadar TGF- β 1, NF- κ B, TIMP-1, dan derajat skor modifikasi aschroft (derajat 3) terendah dibandingkan dengan kelompok fibrolisis lainnya. Berdasarkan grafik tersebut, dapat terlihat bahwa kelompok FP G65 dan FPP memberikan efek fibropreventif paling besar, sedangkan kelompok FL G262 memberikan efek fibrolisis yang paling besar.



Gambar 4.19. Perbedaan Median Nilai Uji antara Seluruh Kelompok Hewan Coba

Parameter hasil penelitian terdiri atas jumlah sel radang, TGF- β 1, Kolagen I, TIMP-1 dan NF- κ B dibagi dengan kontrol negatif yang ditunjukkan masing-masing kelompok dalam bentuk grafik garis. Skor modifikasi aschroft ditunjukkan oleh masing-masing kelompok dengan grafik berbentuk balok. FP G65 menunjukkan tren grafik yang lebih baik dibandingkan kelompok fibropreventif lainnya dan disertai dengan skor modifikasi aschroft lebih rendah dibandingkan kelompok fibropreventif gambir lainnya. FL G262 menunjukkan tren grafik yang lebih baik dibandingkan kelompok fibrolisis lainnya dan disertai dengan skor modifikasi aschroft yang lebih rendah dibandingkan kelompok fibrolisis lainnya.

BAB 5 PEMBAHASAN

5.1 Gambaran Histopatologi Pemberian Bleomisin Secara Intratrakeal dan Intrapleural terhadap Kejadian Fibrosis

Pada penelitian ini pemberian injeksi bleomisin intratrakeal menyebabkan terbentuknya jaringan ikat yang lebih banyak dibandingkan intrapleural. Penelitian yang dilakukan oleh Ralf et al.⁷⁷ mengungkapkan bahwa pemberian bleomisin intratrakeal dibandingkan dengan pemberian saline intratrakeal menunjukkan perbedaan bermakna fibrosis paru yang dilihat dari skor modifikasi ascroft dan pemeriksaan *CT scan contrast*. Decologne et al.⁸¹ melaporkan pemberian intrapleural dan intratrakeal bleomisin dengan dosis 0,07 U tidak memberikan dampak fibrosis pada paru, kecuali jika pemberiannya digabungkan dengan karbon 0,1 mg, yang dapat menimbulkan efek fibrosis baik pada intrapleural dan intratrakeal. Hal tersebut berbeda dengan hasil penelitian ini karena dosis bleomisin yang digunakan juga berbeda. Pemberian bleomisin 3 U/kg BB atau 5 U/kg BB dapat menyebabkan kematian yang bermakna pada kelompok tikus, namun pemberian 2 U/kg BB menimbulkan respons fibrotik submaksimal yang mengakibatkan perubahan fungsi paru.⁷⁸

5.2 Karakteristik Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah 10 kelompok tikus jantan model yang masing-masing terdiri atas 3 tikus dengan berat badan sekitar 200–250 g serta berusia sepuluh minggu. Setelah diterminasi, jaringan paru subjek penelitian dinilai mengenai bobot paru dan tampilan makroskopisnya. Bobot paru seluruh subjek penelitian berkisar antara 2,8 g sampai 4,1 g. Pada KB yang merupakan kelompok hewan coba dengan pemberian bleomisin saja menunjukkan gambaran makroskopis paru berupa kerusakan jaringan paru yg ditandai dengan perdarahan, edema paru dan timbul benjolan. Hal menarik terlihat pada FP PP dan FL PP yang menunjukkan gambaran makroskopis paru berupa tampak sedikit terjadi kerusakan jaringan paru. Hal tersebut didukung oleh penelitian El-Safli yang mengungkapkan kondisi fibrosis paru pada tikus akibat pemberian bleomisin 15 mg/kg BB/hari secara intraperitoneal sebanyak 3 x dalam seminggu selama 4 minggu dapat membaik, setelah sebelumnya diberikan ekstrak pembeding positif (teh hijau) sebesar 150 mg/kg BB/hari selama 2 minggu.⁸²

Kelompok fibropreventif gambir, FP G65 menunjukkan gambaran sedikit kerusakan jaringan paru diselingi dengan gambaran jaringan paru normal. Hasil penelitian ini menunjukkan efek fibropreventif gambir semakin menurun dengan peningkatan dosis, bersifat antioksidan dan *dose dependent manner* di rentang dosis 65 mg/kg BB. Kelompok fibrolisis, FL G262 dan FL G65 menunjukkan gambaran makroskopis paru berupa tampak sedikit kerusakan jaringan paru, beberapa bagian tampak seperti jaringan paru normal. Efek fibrolisis gambir semakin meningkat dengan peningkatan dosis, bersifat *dose dependent manner* di rentang dosis 262 mg/kg BB. Penelitian mengenai pemberian gambir yang dapat mengurangi atau mencegah fibrosis paru pada manusia dan hewan coba, belum pernah dilakukan.

Gambir diketahui memiliki efek antioksidan yang tinggi karena memiliki senyawa katekin yang tinggi.^{74,83,84} Penelitian yang dilakukan oleh Melia et al. mengungkapkan bahwa gambir selain menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi juga menunjukkan aktivitas antimikroba.⁸⁵ Penyakit *idiopathic pulmonary fibrosis* (IPF) yang merupakan penyakit paru fatal, ditandai dengan fibrosis kronik, progresif yang dapat mengganggu fungsi paru dan stres oksidatif merupakan jalur utama dalam IPF.⁸⁶ Menurut Tsai et al.⁸⁷ efek antifibrosis, antiinflamasi dan antioksidatif dari katekin telah dilaporkan oleh banyak studi. Beberapa studi *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan efek katekin dapat melemahkan proliferasi sel fibroblas, meningkatkan sistem pertahanan antioksidan dan menghambat inflamasi. Dalam penelitian ini, perbandingan positif dan gambir dapat menghambat dan mengurangi efek fibrosis yang ditimbulkan oleh pemberian bleomisin. Pemberian gambir fibrolisis dosis 262 mg/kg BB dan dosis 65 mg/kg BB, dapat mengurangi kerusakan jaringan paru yang terlihat secara makroskopis dibandingkan dengan kelompok pemberian bleomisin saja. Pemberian gambir fibropreventif dosis 65 mg/kg BB dapat mengurangi kerusakan jaringan paru makroskopis dibandingkan dengan kelompok bleomisin. Pemberian gambir fibropreventif 131 mg/kg BB menunjukkan kerusakan jaringan paru luas. Hasil tersebut sama dengan kelompok gambir fibrolisis dosis 131 mg/kg BB, menunjukkan kerusakan jaringan paru yang cukup luas, ditandai dengan edema paru, timbul benjolan-benjolan, perdarahan dan paru tampak berwarna merah kebiruan. Gambaran yang ditemukan pada dosis 131 mg/kg BB tersebut mungkin

disebabkan oleh sistem eliminasi efek samping obat yang terganggu dan merupakan dosis toksik pemberian gambir pada paru hewan coba.

5.3 Jumlah Sel Radang Kelompok Kontrol, Pembanding Positif dan Gambir

Jumlah sel radang dari pemeriksaan BAL pada kelompok fibropreventif menunjukkan median hitung jenis sel radang yang paling rendah terlihat pada FP G262 diikuti oleh FP G65 sedangkan median hitung jenis sel radang paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G131. Terdapat perbedaan bermakna antara KB dengan FP G262 dan FP G65. Nilai selisih rerata (D) kontrol bleomisin dengan hitung jenis sel radang juga menunjukkan bahwa fibropreventif gambir dosis 262 mg/kg BB (FP G262) menunjukkan nilai selisih yang lebih besar diikuti FP G65 yang tidak berbeda jauh walaupun tidak lebih besar dibandingkan dengan pembanding positif yaitu teh hijau. Penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum pemberian gambir fibropreventif dapat menurunkan jumlah sel radang yang diinduksi oleh pemberian bleomisin walaupun tidak lebih baik dibandingkan dengan pembanding positif yaitu teh hijau. Gambir dosis 65 mg/kg BB dapat menjadi pilihan sebagai fibropreventif gambir terbaik walaupun FP G262 menunjukkan median jumlah sel radang yang lebih rendah dan nilai rerata selisih yang lebih tinggi. Hal tersebut dikarenakan median jumlah sel radang tertinggi ditemukan pada FP G131 dan perbedaan median antara FP G65 dan FP G262 yang tidak jauh berbeda.

Kelompok fibrolisis yang memiliki median hitung jenis sel radang paling rendah terlihat pada FL G262, sedangkan median hitung jenis sel radang paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL G131 diikuti FL G65. Nilai selisih rerata (D) kontrol belomisin dengan hitung jenis sel radang juga menunjukkan bahwa fibrolisis gambir dosis 262 mg/kg BB (FL G262) menunjukkan nilai selisih yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok fibrolisis gambir lainnya dan pembanding positif. Penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum pemberian gambir fibrolisis dapat menurunkan jumlah sel radang yang diinduksi oleh pemberian bleomisin. Gambir dosis 262 mg/kg BB dapat menjadi pilihan sebagai fibrolisis terbaik jika dibandingkan dengan kelompok fibrolisis gambir lainnya dan fibrolisis pembanding positif walaupun tidak ditemukan perbedaan bermakna secara statistik antara FL G262 dengan kelompok kontrol dan fibrolisis lainnya. Jika dilihat dari rerata delta

kelompok fibropreventif/fibrolisis, tidak ditemukannya kecenderungan suatu dosis dalam meningkatkan/menurunkan jumlah sel radang.

Jaringan paru yang mengalami fibrosis akan mengalami inflamasi selular pada awalnya dan secara histologi terdapat akumulasi sel-sel radang seperti limfosit, makrofag, sel plasma, eosinofil dan netrofil. Respons inflamasi merupakan salah satu jalur yang dapat menyebabkan terjadinya fibrosis paru.⁸⁸ Penelitian Tsai et al.⁸⁷ mengatakan bahwa beberapa studi in vitro dan in vivo menunjukkan efek katekin pada fibroblas seperti menekan proliferasi sel, meningkatkan sistem pertahanan antioksidan dan menghambat inflamasi.

5.4 Kadar TGF- β 1 Kelompok Kontrol, Pembanding Positif dan Gambir

Kadar TGF- β 1 pada kelompok fibropreventif menunjukkan median kadar TGF- β 1 paling rendah terlihat pada FP G65, sedangkan median kadar TGF- β 1 paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G262. Nilai selisih rerata (D) kontrol belomisin dengan kadar TGF- β 1 juga menunjukkan bahwa fibropreventif gambir dosis 65 mg/kg BB (FP G65) menunjukkan nilai selisih yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok fibropreventif gambir lainnya dan pembanding positif. Penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum pemberian gambir fibropreventif dan pembanding positif fibropreventif dapat menurunkan kadar TGF- β 1 yang diinduksi oleh pemberian bleomisin. Gambir dosis 65 mg/kg BB (FP G65) dapat menjadi pilihan sebagai fibropreventif terbaik jika dibandingkan dengan kelompok fibropreventif gambir lainnya dan fibropreventif pembanding positif walaupun tidak ditemukan perbedaan bermakna secara statistik antara FP G65 dengan kelompok kontrol dan fibrolisis lainnya.

Kelompok fibrolisis yang memiliki median kadar TGF- β 1 paling rendah terlihat pada FL G262, sedangkan median kadar TGF- β 1 paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL G65. Nilai selisih rerata (D) kontrol belomisin dengan kadar TGF- β 1 juga menunjukkan bahwa fibrolisis gambir dosis 262 mg/kg BB (FL G262) menunjukkan nilai selisih yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok fibrolisis gambir lainnya dan pembanding positif. Penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum pemberian gambir fibrolisis dan pembanding positif fibrolisis dapat menurunkan kadar TGF- β 1 yang diinduksi oleh pemberian bleomisin. Gambir dosis

262 mg/kg BB dapat menjadi pilihan sebagai fibrolisis terbaik jika dibandingkan dengan kelompok fibrolisis gambir lainnya dan fibrolisis pembanding positif walaupun tidak ditemukan perbedaan bermakna secara statistik antara FL G262 dengan kelompok kontrol dan fibrolisis lainnya. Jika dilihat dari rerata delta kelompok gambir fibropreventif, tidak ditemukannya kecenderungan suatu dosis dalam meningkatkan/menurunkan kadar TGF- β 1, berbeda dengan rerata kelompok fibrolisis gambir yang menunjukkan semakin tinggi dosis gambir semakin baik dalam menurunkan kadar TGF- β 1 (penaikkan delta rerata kadar TGF- β 1 sejalan dengan peningkatan dosis gambir)

TGF- β memicu proliferasi miofibroblas, menginduksi sintesis protein matriks ekstraselular dan menekan degradasi ECM dengan cara induksi antiproteinase atau reduksi metaloprotease yang dapat menimbulkan fibrosis. TGF- β 1 juga menstimulasi produksi ROS yang dapat menyebabkan stres oksidatif dengan cara mengurangi kekuatan antioksidan di paru dan hepatosit seperti katalase, GSH, SOD yang memiliki kemampuan untuk menghambat respons fibrogenik akibat stres oksidatif.⁷ Penelitian yang dilakukan oleh Bonniaud et al.³¹ menyatakan bahwa ekspresi berlebihan TGF- β 1 aktif dalam 7–10 hari dengan *adenoviral vector gene transfection* di paru tikus, menginduksi fibrosis berat dan progresif selama 60 hari. Pemberian bleomisin pada paru tikus model, akan meningkatkan kadar sitokin dan kemokin pada hari ke-7 dan ke-14 dibandingkan kelompok kontrol.²⁵ Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian bleomisin secara intratrakeal dan pemberian pembanding positif teh hijau fibropreventif dapat menurunkan kadar TGF- β 1 yang dapat menginduksi fibrosis. . Studi Tabuchi et al.⁸⁹ mengungkapkan bahwa teh hijau dapat menekan TGF- β 1 dengan interaksi TGF- β reseptor tipe 2. Studi You et al.⁹⁰ mengungkapkan EGCG juga dapat menghambat proliferasi miofibroblas dengan menekan sekresi TGF- β 1. Studi Lago et al.⁹¹ mengungkapkan bahwa antifibrosis golongan flavonoid dapat menghambat induksi dan menurunkan kadar TGF- β 1 pada paru hewan mencit model yang mengalami fibrosis. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian gambir terutama kelompok fibrolisis 265 mg/kg BB dapat menurunkan kadar TGF- β 1 yang dapat menginduksi fibrosis.

5.5 Kadar NF- κ B Kelompok Kontrol, Pembanding Positif dan Gambir

Kadar NF- κ B pada kelompok fibropreventif menunjukkan median kadar NF- κ B paling rendah terlihat pada FP G65, sedangkan median kadar NF- κ B paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G131. Nilai selisih rerata (D) kontrol bleomisin dengan kadar NF- κ B juga menunjukkan bahwa fibropreventif gambir dosis 65 mg/kg BB (FP G65) menunjukkan nilai selisih yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok fibropreventif gambir lainnya walaupun tidak lebih besar dibandingkan fibropreventif pembanding positif.

Penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum pemberian gambir fibropreventif dapat menurunkan kadar NF- κ B yang diinduksi oleh pemberian bleomisin. Gambir dosis 65 mg/kg BB (FP G65) dapat menjadi pilihan sebagai fibropreventif terbaik jika dibandingkan dengan kelompok fibropreventif gambir lainnya dan tidak kalah jika dibandingkan dengan pembanding positif walaupun secara statistik tidak ditemukan perbedaan bermakna antara FP G65 dengan kelompok kontrol dan fibrolisis lainnya.

Kelompok fibrolisis yang memiliki median kadar NF- κ B paling rendah terlihat pada FL G262, sedangkan median kadar NF- κ B paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL G65. Nilai selisih rerata (D) kontrol bleomisin dengan kadar NF- κ B juga menunjukkan bahwa fibrolisis gambir dosis 262 mg/kg BB (FL G262) menunjukkan nilai selisih yang lebih besar diikuti FL G131. Penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum pemberian gambir fibrolisis dapat menurunkan kadar NF- κ B yang diinduksi oleh pemberian bleomisin. Gambir dosis 262 mg/kg BB dapat menjadi pilihan sebagai fibrolisis terbaik jika dibandingkan dengan kelompok fibrolisis gambir lainnya dan fibrolisis pembanding positif walaupun tidak ditemukan perbedaan bermakna secara statistik antara FL G262 dengan kelompok kontrol dan fibrolisis lainnya. Jika dilihat dari rerata delta kelompok fibropreventif gambir menunjukkan semakin tinggi dosis gambir semakin meningkatkan kadar NF- κ B serta hasil rerata delta yang semakin negatif. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian gambir/pembanding positif meningkatkan kadar NF- κ B dan lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol bleomisin. Dapat disimpulkan bahwa pemberian gambir/pembanding positif secara fibropreventif bersifat pro oksidan.

NF- κ B merupakan sejenis protein regulator sistem imunitas dan respons inflamasi.⁶⁴ Jaringan paru yang rusak mengaktifkan NF- κ B melalui fosforilasi yang dimediasi oleh IKK (I κ B kinase) dan degradasi molekul penghambat, seperti I κ B α dan fosforilasi subunit p65 NF- κ B. NF- κ B yang diaktifkan kemudian ditranslokasikan ke dalam nukleus yang mengikat sekuens spesifik DNA untuk mengatur beberapa ekspresi gen inflamasi. Selain itu, terdapat peran dari NF- κ B yang mengatur tiga aspek utama yaitu aktivasi, kelangsungan hidup, dan respons inflamasi. Aktivasi NF- κ B memegang peran penting dalam jalur sinyal profibrogenik. Berdasarkan hasil penelitian, setelah pemberian bleomisin maka terjadi peningkatan kadar NF- κ B yang signifikan, memicu sitokin–sitokin inflamasi seperti TNF- α , IL-1 β , kemokin seperti MCP-1 (*Monocytes chemoattractant protein-1*). Pembanding positif berfungsi sebagai agen antifibrotik tidak hanya melalui hambatan terhadap aktivasi NF- κ B namun juga melalui perannya sebagai antiinflamasi dan antioksidan.

Teh hijau dapat menekan jalur pro-inflamasi yang terkait dengan sebagian besar penyakit kronik dan menghambat produksi TNF serta persinyalan sel yang diperantarai oleh TNF di berbagai jenis sel.^{64,65,92} Penelitian yang dilakukan oleh S. Beigh et al.⁹³ menemukan bahwa TNF- α dan faktor transkripsi NF- κ B keduanya meningkat pada jaringan paru yang fibrosis ketika diinduksi oleh bleomisin secara intratrakeal dengan dosis 5 mg/kg. Selain itu dalam penelitiannya menunjukkan bahwa penekanan jalur sinyal NF- κ B dapat mencegah diferensiasi miofibroblas dan fibrosis yang diakibatkan oleh pemberian bleomisin yang diikuti dengan penurunan ekspresi β -catenin. Teh hijau bersifat antioksidan, menghambat aktivasi NF- κ B dengan menekan pembentukan kolagen, TIMP-1 terutama melalui mekanisme fibrolisis secara in vivo pada hati.^{12,14}

Gambir terbukti memiliki efek antioksidan dalam berbagai mekanisme dan salah satunya adalah melalui penghambatan aktivasi NF- κ B. Gambir berfungsi sebagai agen antifibrotik tidak hanya melalui hambatan terhadap aktivasi NF- κ B namun juga melalui perannya sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Gambir dapat menekan jalur pro-inflamasi yang terkait dengan sebagian besar penyakit kronik dan menghambat produksi TNF serta persinyalan sel yang diperantarai oleh TNF di berbagai jenis sel. Penelitian yang dilakukan oleh Beigh et al.⁹³ menemukan bahwa TNF- α dan faktor transkripsi NF- κ B keduanya meningkat pada jaringan paru yang fibrosis ketika diinduksi oleh bleomisin

secara intratrakeal dengan dosis 5 mg/kg. Selain itu dalam penelitiannya menunjukkan bahwa penekanan jalur sinyal NF- κ B dapat mencegah diferensiasi miofibroblas dan fibrosis yang diakibatkan oleh pemberian bleomisin yang diikuti dengan penurunan ekspresi β -catenin. Gambir bersifat antioksidan, menghambat aktivasi NF- κ B dengan menekan pembentukan kolagen, TIMP-1 melalui mekanisme fibrolisis dan fibropreventif secara in vivo pada hati.^{12,14} Studi Paola etl al.⁹² mengatakan katekin mengurangi tingkat eksudat TNF-alpha, sitokin aktif, beberapa jalur pensinyalan, yang mengarah ke aktivasi faktor transkripsi NF- κ B. Polifenol menghambat induksi faktor nekrosis tumor-alfa pada makrofag dengan menekan aktivasi NF- κ B. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian gambir terutama kelompok fibrolisis 262 mg/kg BB dapat menurunkan kadar NF- κ B yang dapat menginduksi fibrosis.

Berdasarkan penelitian ini, disimpulkan bahwa peningkatan dosis fibropreventif tidak sejalan dengan penurunan jumlah sel radang, kadar TGF- β 1 dan kadar NF- κ B, namun sebaliknya dosis lebih rendah menunjukkan penurunan jumlah sel radang, kadar TGF- β 1 dan kadar NF- κ B lebih baik. Di sisi lain, peningkatan dosis fibrolisis gambir sejalan dengan dengan penurunan jumlah sel radang, kadar TGF- β 1 dan kadar NF- κ B yang lebih rendah. Hal tersebut menarik, untuk mencapai fibropreventif yang adekuat dibutuhkan dosis yang rendah/sub optimal sedangkan fibrolisis yang adekuat dicapai dengan dosis yang lebih tinggi

5.6 Ekspresi TIMP-1 Kelompok Pembanding Positif dan Gambir

Ekspresi TIMP-1 pada kelompok fibropreventif menunjukkan median hitung jenis sel radang yang paling rendah terlihat pada FP PP diikuti FP G65, sedangkan median persentase TIMP-1 paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G262. Nilai selisih rerata (D) kontrol belomisin dengan ekspresi TIMP-1 menunjukkan bahwa fibropreventif gambir dosis 65 mg/kg BB (FP G65) menunjukkan nilai selisih yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok fibropreventif lainnya. Penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum pemberian gambir fibropreventif dapat menurunkan ekspresi TIMP-1 yang diinduksi oleh pemberian bleomisin. Gambir dosis 65 mg/kg BB dapat menjadi pilihan sebagai fibropreventif gambir terbaik karena memiliki median TIMP-1 yang rendah dan nilai rerata selisih tertinggi dibandingkan kelompok fibropreventif lainnya.

Kelompok fibrolisis yang memiliki median ekspresi TIMP-1 paling rendah terlihat pada FL G262 diikuti FL G131, sedangkan median ekspresi TIMP-1 paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL G65. Nilai selisih rerata (D) kontrol belomisin dengan ekspresi TIMP-1 menunjukkan bahwa fibrolisis gambir dosis 131 mg/kg BB (FL G131) menunjukkan nilai selisih yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok fibrolisis gambir lainnya dan pembanding positif. Penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum pemberian gambir fibrolisis dapat menurunkan ekspresi TIMP-1 yang diinduksi oleh pemberian bleomisin. Gambir dosis 131 dan 262 mg/kg BB dapat menjadi pilihan sebagai fibrolisis terbaik jika dibandingkan dengan kelompok fibrolisis gambir lainnya dan fibrolisis pembanding positif walaupun tidak ditemukan perbedaan bermakna secara statistik.

Berdasarkan penelitian ini, disimpulkan bahwa peningkatan dosis fibropreventif tidak sejalan dengan penurunan ekspresi TIMP-1 namun sebaliknya dosis lebih rendah menunjukkan penurunan ekspresi TIMP-1 yang lebih baik. Di sisi lain, peningkatan dosis fibrolisis gambir sejalan dengan ekspresi TIMP-1. Hal tersebut menarik, untuk mencapai fibropreventif yang adekuat dibutuhkan dosis yang rendah sedangkan fibrolisis yang adekuat dicapai dengan dosis yang lebih tinggi. Tsai et al.⁸⁷ menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan gambir, dosis yang lebih rendah akan menghasilkan respons yang sub optimal sedangkan dosis yang lebih tinggi dapat menyebabkan toksik.

Tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs) merupakan protein spesifik, inhibitor endogen dari *matrix metalloproteinases* (MMPs). Peningkatan kadar TIMPs menghasilkan akumulasi dari ECM sehingga menimbulkan fibrosis paru.⁹⁴ Penelitian Dona et al.⁹⁵ mengungkapkan hasil PCR katekin meningkatkan transkripsi kolagen I dan TIMP-1, tapi tidak memengaruhi transkripsi α SMA dan mengurangi transkripsi TIMP-1. Katekin menghambat produksi kolagen I, meningkatkan MMP, sehingga diyakini katekin merupakan terapi potensial untuk fibrosis. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ningsih menunjukkan bahwa pemberian ekstrak gambir dapat menurunkan ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I yang dapat menekan perkembangan fibrosis hati.¹³

5.7 Ekspresi Kolagen I Kelompok Pembanding Positif dan Gambir

Ekspresi Kolagen I pada kelompok fibropreventif menunjukkan median hitung jenis sel radang yang paling rendah terlihat pada FP G131 diikuti FP PP, sedangkan median persentase Kolagen I paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G262. Nilai selisih rerata (D) kontrol belomisin dengan ekspresi Kolagen I menunjukkan bahwa fibropreventif teh hijau (FP PP) menunjukkan nilai selisih yang lebih besar diikuti FP G262 dibandingkan dengan kelompok fibropreventif lainnya. Penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum pemberian gambir fibropreventif dapat menurunkan ekspresi Kolagen I yang diinduksi oleh pemberian bleomisin namun pembanding positif (teh hijau) menjadi pilihan sebagai fibropreventif terbaik dibandingkan gambir karena memiliki median ekspresi Kolagen I yang rendah dan konsisten dengan nilai rerata selisih yang besar. Dalam hal ini pembanding positif lebih baik dibandingkan dengan gambir.

Kelompok fibrolisis yang memiliki median ekspresi Kolagen I paling rendah terlihat pada FL G131, sedangkan median ekspresi Kolagen I paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL G65. Nilai selisih rerata (D) kontrol belomisin dengan ekspresi Kolagen I menunjukkan bahwa fibrolisis gambir dosis 131 mg/kg BB (FL G131) menunjukkan nilai selisih yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok fibrolisis gambir lainnya dan pembanding positif. Penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum pemberian gambir fibrolisis dapat menurunkan ekspresi Kolagen I yang diinduksi oleh pemberian bleomisin. Gambir dosis 131 dan 262 mg/kg BB dapat menjadi pilihan sebagai fibrolisis terbaik jika dibandingkan dengan kelompok fibrolisis gambir lainnya dan fibrolisis pembanding positif walaupun tidak ditemukan perbedaan bermakna secara statistik.

Berdasarkan penelitian ini, disimpulkan bahwa peningkatan dosis fibropreventif gambir sejalan dengan penurunan ekspresi Kolagen I. Di sisi lain, peningkatan/penurunan dosis fibrolisis gambir tidak memengaruhi ekspresi Kolagen I. Hemmann et al.⁹⁶ menyebutkan MMP dan penghambat fisiologisnya-TIMP-1, diyakini memainkan peran penting dalam pengembangan jaringan fibrotik. Zhen et al.⁹⁷ mengungkapkan selama fibrosis, sel-sel fibroblas menunjukkan peningkatan proliferasi dan migrasi, peningkatan ekspresi protein matriks, peningkatan produksi MMP dan TIMP, dan menyebabkan penggantian

kolagen interstitial atau matriks ekstraselular. Nakamuta et al.⁹⁸ mengungkapkan dosis katekin yang diberikan memengaruhi produksi kolagen dan aktivitas MMP. Katekin dapat menghambat produksi kolagen dan meningkatkan MMP pada fibrosis hati.

5.8 Gambaran Histopatologi Jaringan Paru dengan Pewarnaan Hematoksin-Eosin dan Masson-Trichome berdasarkan Skor Modifikasi Aschroft

Karakteristik histopatologi dengan metode Hematoksin-Eosin dan Masson-Trichome ditemukan kesamaan derajat gambaran histopatologi pada kedua metode. Karakteristik histopatologi ditemukan gambaran histopatologi yang terberat berdasarkan skor modifikasi aschroft yaitu derajat 7 pada KB, sedangkan derajat yang terendah yaitu derajat 0 terlihat pada gambaran histopatologi KN.

Jika dilihat dari gambaran histopatologi kelompok fibropreventif yang memiliki derajat terendah berdasarkan skor Modifikasi Aschroft adalah FP G65 dan FP PP (derajat 5), sedangkan kelompok fibropreventif yang memiliki derajat tertinggi berdasarkan skor Modifikasi Aschroft adalah FP G131 dan FP G262 (derajat 6). Hal ini menunjukkan bahwa fibropreventif gambir secara umum dapat memberikan perbaikan gambaran histopatologi dibandingkan dengan KB (derajat 7) namun peningkatan dosis fibropreventif tidak sejalan dengan perbaikan gambaran histopatologi. Di sisi lain, kelompok fibrolisis yang memiliki derajat terendah berdasarkan skor Modifikasi Aschroft adalah FL G262 (derajat 3), sedangkan kelompok fibrolisis yang memiliki derajat tertinggi berdasarkan skor Modifikasi Aschroft adalah FL PP, FL G65 dan FL G131 (derajat 5). Hal tersebut menarik karena peningkatan dosis fibrolisis sejalan dengan perbaikan gambaran histopatologi.

Pemberian bleomisin dapat meningkatkan ekspresi sitokin inflamasi, diikuti oleh peningkatan mediator pro-fibrotik seperti TGF- β dan *lysophosphatidic acid* (LPA) serta deposisi matriks. Gen matriks metaloprotease (MMP) termasuk gen MMP12, MMP19, dan juga *lysyl oxidase-like* (LOXL).⁷⁸ Gambir dan pembanding positif yaitu teh hijau dipercaya dapat menekan ekspresi sitokin inflamasi dan mediator pro-fibrotik, salah satunya ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I yang sudah dibuktikan oleh penelitian yang dilakukan oleh Ningsih mengenai peran ekstrak gambir dalam

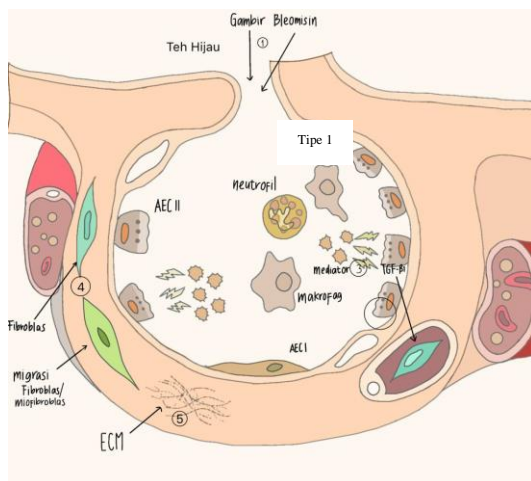
menekan perkembangan fibrosis hati.¹³ Penelitian Seger et al.⁹⁹ tentang analisis gambaran histopatologi pada paru yang mengalami fibrosis, tampak akumulasi jaringan fibrosis dan deposit kolagen di septum alveoli dengan pewarnaan masson trichome yang spesifik.

5.9 Interaksi Gambir dan NF- κ B dengan Metode *Western Blott*

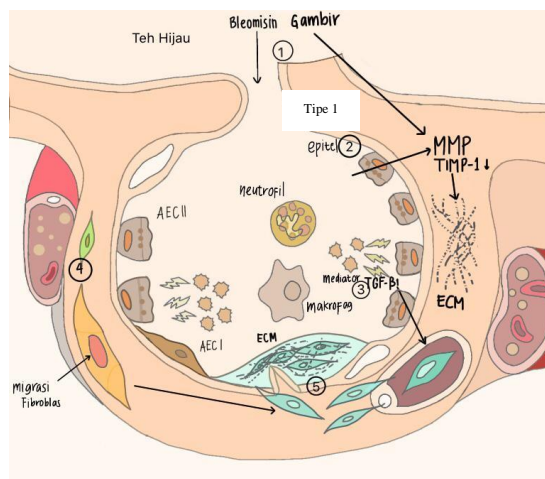
Pemeriksaan dengan menggunakan *western blott* menunjukkan bahwa pada FP G65, FP G131, FP G262 dan FL G65, FL G131, FL G262 terlihat di band spesifik untuk ukuran dimer NF- κ B p65. Hal tersebut menunjukkan interaksi gambir yang diberikan dapat mengikat NF- κ B sehingga tidak translokasi ke nukleus, yang menyebabkan tidak terjadinya proses inflamasi/fibrogenesis. Pada KN, KB, FP PP dan FL PP tidak terlihat band spesifik seperti pada kelompok gambir (lampiran). Penelitian Bitzer et al.¹⁰⁰ menunjukkan efek proteksi suatu antifibrosis berhubungan dengan tingginya kadar smad7, inaktivasi jalur sinyal NF- κ B dan TGF- β 1 dengan analisis *western blott* antibodi I κ B α dan NF- κ Bp65.

Mekanisme kerja fibropreventif dan fibrolisis pembeding positif dan gambir yang ditemukan pada penelitian ini adalah:

A. Fibropreventif



B. Fibrolisis



Gambar 5.1. Mekanisme Kerja Fibropreventif dan Fibrolisis Gambir

- A. (1) Gambir diberikan awal untuk menekan produksi ECM dengan mengganggu proses aktivasi sel epitel paru tipe 1, menekan aktivitas ROS dan mediator dan sel inflamasi kemudian diikuti dengan pemberian bleomisin awal minggu ke 2 dan 4, (2) kerusakan epitel paru tipe 1 berkurang, (3) berkurangnya aktivasi

ROS, sel radang neutrofil, makrofag, limfosit, mediator inflamasi/TGF- β 1, kadar NF- κ B dan ekspresi TIMP-1/kolagen, (4) aktivasi dan proliferasi fibroblas dan miofibroblas menurun (5) deposit matriks ekstraselular akan menurun (terutama pada kelompok FP PP)

- B. (1) Bleomisin diberikan awal akan membentuk fibrosis, kemudian diikuti dengan pemberian gambir dan pembanding positif awal minggu ke 3 yang dapat meresolusi, melisiskan ECM serta menekan aktivasi sel epitel tipe 1, (2) kerusakan epitel paru tipe 1 membaik, (3) menekan aktivasi ROS, sel radang neutrofil, makrofag, limfosit, mediator inflamasi/TGF- β 1, kadar NF- κ B dan ekspresi TIMP-1/kolagen (4) aktivasi fibroblast dan miofibroblas menurun dan (5) terjadi lisis matriks ekstraselular (terutama pada kelompok FL G262).

Secara umum pemberian gambir dapat menurunkan jumlah sel radang, kadar TGF- β 1, NF- κ B, ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I. Secara fibropreventif, peningkatan dosis fibropreventif gambir tidak sejalan dengan penurunan kadar TGF- β 1 dan ekspresi TIMP-1 namun sebaliknya dosis lebih rendah menunjukkan penurunan kadar TGF- β 1 dan ekspresi TIMP-1 lebih baik. Kelompok fibrolisis gambir menunjukkan, peningkatan dosis gambir sejalan dengan penurunan kadar TGF- β 1, NF- κ B dan ekspresi TIMP-1 yang lebih rendah. Gambir dosis 65 mg/kg BB dapat menjadi pilihan sebagai fibropreventif gambir terbaik, sedangkan gambir dosis 262 mg/kg BB dapat menjadi pilihan sebagai fibrolisis terbaik. Hal tersebut juga didukung dengan gambaran makroskopik dan mikroskopik yang menunjukkan sedikit kerusakan jaringan paru dan derajat fibrosis berdasarkan skor modifikasi ascroft yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol bleomisin dan kelompok gambir lainnya

BAB 6

SIMPULAN DAN SARAN

6.1 Simpulan

1. Terdapat perbedaan jumlah sel radang BAL pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
2. Tidak terdapat perbedaan kadar TGF- β 1 BAL pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
3. Tidak terdapat perbedaan kadar NF- κ B jaringan paru pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
4. Tidak terdapat perbedaan ekspresi TIMP-1 jaringan paru pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB antara kelompok fibropreventif/ fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
5. Tidak terdapat perbedaan ekspresi kolagen I jaringan paru pada pemberian gambir dosis 65 mg/kg BB, 131 mg/kg BB, 262 mg/kg BB antara kelompok fibropreventif/fibrolisis dengan pembanding positif dan kontrol.
6. Gambaran histopatologi terberat berdasarkan skor Modifikasi Ascroft terlihat pada KB. Kelompok fibropreventif yang memiliki derajat terendah berdasarkan skor Modifikasi Ascroft adalah FP G65 dan FP PP (derajat 5). Kelompok fibrolisis yang memiliki derajat terendah berdasarkan skor Modifikasi Ascroft adalah FL G262 (Derajat 3).

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut ekspresi MMP, ROS dan jumlah fibroblas setelah pemberian gambir dosis 262 mg/kg BB selama 7 minggu pada hewan coba.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui keamanan pemberian gambir dosis setara 262 mg/kg BB selama 7 minggu yang tepat pada manusia.

RINGKASAN

LATAR BELAKANG

Fibrosis paru adalah kelainan berupa terbentuknya jaringan parut (*scar*) yang melibatkan infiltrasi sel inflamasi, proliferasi fibroblas, *reactive oxygen species* (ROS) serta penumpukan matriks ekstraselular yang berlebihan di jaringan parenkim paru dan dapat mengganggu fungsi paru.^{1,2} Pemeriksaan biopsi paru yang mengalami fibrosis, menunjukkan gambaran jaringan parut yang bercampur dengan jaringan paru normal, perubahan struktur epitel seperti hiperplasia dan metaplasia, banyaknya sel fibroblas dan miofibroblas.

Uncaria gambir (Hunter) Roxb adalah tanaman yang termasuk famili Rubiaceae, banyak ditemukan di Asia Tenggara khususnya kawasan Sumatera yang juga mengandung flavonoid (+)-katekin dan sudah diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Katekin terbukti mampu memperbaiki kerusakan hati akibat induksi alkohol melalui mekanisme antiinflamasi jalur NF- κ B secara *in vivo*. Berdasarkan hasil penelitian tersebut sangat mungkin gambir juga dapat dimanfaatkan sebagai antifibrosis paru.^{12,14}

Untuk itu perlu dilakukan penelitian *in vivo* yang membuktikan mekanisme kerja gambir sebagai fibrolisis dan/atau fibropreventif. Pemberian bleomisin secara intratrakeal merupakan uji preklinik model hewan coba yang terbaik. Bleomisin dapat menginduksi stres oksidatif di jaringan paru yang akan mencetuskan reaksi inflamasi serta terbentuknya jaringan fibrosis. Dalam menemukan terapi baru untuk mengatasi fibrosis paru yang selama ini bersifat menetap, pemberian gambir diharapkan dapat mencegah luas area paru yang mengalami fibrosis pada tikus model. Sebagai pembanding positif digunakan teh hijau yang sudah diketahui bersifat fibropreventif.

METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Unit Pengelola Hewan Laboratorium FKH IPB, Laboratorium Patologi FKH IPB. Penelitian berlangsung dari bulan September 2018–Maret 2019. Penelitian analitik dengan desain eksperimental secara *in vivo* acak pada subjek tikus putih jantan galur *Sprague Dawley* usia 10 minggu dengan

berat badan \pm 200–250 gram, 10 kelompok hewan coba tikus, menganalisis efek antifibrosis pemberian gambir pada paru tikus model yang mengalami fibrosis akibat pemberian bleomisin. Dosis bleomisin yang digunakan adalah 4 mg/kg BB secara intratrakeal. Dosis gambir yang digunakan adalah 65 mg, 131 mg dan 262 mg/kg BB peroral, serta dosis pembanding positif yaitu teh hijau adalah 125 mg/kg BB peroral. Seluruh kelompok hewan coba diterminasi pada akhir minggu ke-7 atau hari ke-50, organ paru yang telah bersih, diambil sebagian untuk dilakukan analisis jumlah sel radang, kadar TGF- β 1 dalam cairan BAL dengan metode ELISA, kolagen tipe I, TIMP-1 secara imunohistokimia (IHK) dan aktivasi NF- κ B secara ELISA dan *western blott*. Data penelitian dianalisis menggunakan SPSS ver.20. Uji Anova dilakukan untuk melihat perbedaan dari variabel yang diteliti dan dilanjutkan dengan analisis *posthoc* jika menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna.

HASIL

Subjek penelitian adalah 10 kelompok tikus jantan model yang masing-masing terdiri atas 3 tikus dengan berat badan sekitar 200–250 g serta berusia 10 minggu. Rerata berat badan tikus terendah terlihat pada kelompok FP G262 sebesar 210 g, sedangkan rerata berat badan tikus tertinggi terlihat pada kelompok FP PP sebesar 246 g. Bobot paru seluruh subjek penelitian berkisar antara 2,8–4,1 g. Berat organ relatif ditemukan dengan bobot paru dibagi dengan berat badan. Kelompok KN mempunyai berat organ relatif adalah 0,016. Kelompok KB dan FL G65 memiliki berat organ relatif yang tertinggi yaitu 0,018 sedangkan berat organ relatif terendah dijumpai pada kelompok FP G262 dan FL G262 yaitu 0,013.

Hasil hitung jenis sel radang dari pemeriksaan BAL antara kelompok kontrol, pembanding positif dan gambir ditemukan median (min–max) dari KN, KB, FP PP, FL PP, FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G262 adalah 2,90 (2,3–4,0); 5,70 (5,0–5,8); 2,25 (2,0–2,8); 3,35 (2,7–3,4); 3,0 (2,8–3,2); 4,75 (4,6–5,3); 2,60 (2,0–3,5); 3,70 (1,6–3,8); 4,00 (3,9–4,8); 2,10 (2,0–3,5). Hasil uji statistik didapati perbedaan hitung sel radang BAL yang berbeda bermakna $p = 0,017$ ($p < 0,05$). Analisis *post hoc* menunjukkan perbedaan bermakna antara KB dengan KN, FP PP, FL PP, FP G65, FP G262, dan FL G262 ($P = 0,037, 0,002,$

0,033 0,023, 0,008 dan 0,005). Kelompok fibropreventif yang memiliki median hitung jenis sel radang yang paling rendah terlihat pada FP PP, sedangkan median hitung jenis sel radang paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G131. Kelompok fibrolisis yang memiliki median hitung jenis sel radang yang paling rendah terlihat pada FL G262, sedangkan median hitung jenis sel radang paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL G131. Analisis *post hoc* perbedaan hitung sel radang antara kelompok pembanding positif dan gambir fibropreventif serta fibrolisis ditemukan perbedaan bermakna yaitu FP PP vs. FP G131 (0,009) dan FL PP vs. FL 131 ($p = 0,023$).

Hasil pemeriksaan kadar TGF- β 1 (pg/mg protein) antara kelompok kontrol, pembanding positif dan gambir ditemukan median (min-max) dari KN, KB, FP PP, FL PP, FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G262 adalah 0,88 (0,3-2,3); 4,52 (2,6-6,2); 1,14 (0,1-2,6); 2,30 (1,0-4,4); 1,12 (0,4-1,6); 2,58 (1,2-6,7); 2,97 (1,6-3,5); 1,50 (0,3-2,3); 1,02 (0,1-3,1); 0,64 (0,5-0,8). Hasil uji statistik tidak ditemukan perbedaan kadar TGF- β 1 yang berbeda bermakna 0,117 ($p > 0,05$). Kelompok fibropreventif yang memiliki median kadar TGF- β 1 yang paling rendah terlihat pada FP G65, sedangkan median kadar TGF- β 1 paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G262. Kelompok fibrolisis yang memiliki median kadar TGF- β 1 yang paling rendah terlihat pada FL G262, sedangkan median kadar TGF- β 1 paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL PP. Hal tersebut menunjukkan bahwa dalam fibropreventif, pemberian gambir (FP G65) lebih baik dibandingkan dengan kelompok fibropreventif lainnya termasuk pembanding positif yaitu teh hijau. Kelompok fibrolisis, pemberian gambir (FL G262) lebih baik dibandingkan dengan kelompok fibrolisis lainnya termasuk pembanding positif yaitu teh hijau.

Hasil Pemeriksaan NF- κ B (pg/mg protein) antara kelompok kontrol, pembanding positif dan gambir ditemukan median (min-max) dari KN, KB, FP PP, FL PP, FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G262 adalah 3,34 (2,5-5,1); 2,41 (1,0-3,5); 2,62 (2,2-2,8); 1,89 (1,9-3,2); 2,89 (2,2-5,3); 4,38 (3,4-5,6); 4,36 (3,3-5,7); 2,79 (1,7-3,1); 1,59 (1,0-3,0); 0,70 (0,6-4,2). Hasil uji statistik tidak ditemukan perbedaan kadar NF- κ B yang berbeda bermakna $p = 0,134$ ($p > 0,05$).

Kelompok fibropreventif yang memiliki median kadar NF- κ B paling rendah terlihat pada FP PP diikuti oleh FP G65, sedangkan median kadar NF- κ B paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G262. Kelompok fibrolisis yang memiliki median kadar NF- κ B paling rendah terlihat pada FL G262, sedangkan median kadar NF- κ B paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL G65. Hal tersebut menunjukkan bahwa dalam fibropreventif, pemberian teh hijau lebih baik dibandingkan dengan kelompok gambir, namun median FP PP dan FP G65 tidak jauh berbeda. Kelompok fibrolisis, pemberian gambir (FL G262) lebih baik dibandingkan kelompok fibrolisis lainnya termasuk pembanding positif yaitu teh hijau.

Hasil hitung pemeriksaan persentase TIMP-1 (%) antara kelompok kontrol, pembanding positif dan gambir ditemukan median (min-max) dari KN, KB, FP PP, FL PP, FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G262 adalah 26,77 (16,76–28,77); 40,5 (32,44–40,6); 27,28 (21,36–43,34); 28,56 (22,62–35,70); 27,87 (23,14–28,41); 30,37 (20,97–34,70); 35,30 (32,46–43,13); 34,58 (26,50–35,51); 27,84 (22,28–28,20); 24,52 (23,03–33,22). Hasil uji statistik tidak ditemukan perbedaan ekspresi TIMP-1 yang berbeda bermakna $p = 0,31$ ($p > 0,05$). Kelompok fibropreventif yang memiliki median persentase TIMP-1 paling rendah terlihat pada FP PP, sedangkan median persentase TIMP-1 paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G262. Kelompok fibrolisis yang memiliki median persentase TIMP-1 paling rendah terlihat pada FL G262, sedangkan median persentase TIMP-1 paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL G65. Hal tersebut menunjukkan bahwa dalam fibropreventif, pemberian teh hijau sebagai pembanding positif lebih baik dibandingkan dengan gambir. Kelompok fibrolisis, pemberian gambir (FL G262) lebih baik dibandingkan kelompok fibrolisis lainnya termasuk pembanding positif yaitu teh hijau.

Hasil hitung pemeriksaan persentase Kolagen I (%) antara kelompok kontrol, pembanding positif dan gambir adalah 29,2 (26,35–32,03); 48,36 (44,51–49,02); 36,04 (26,17–39,99); 38,02 (29,40–38,64); 36,82 (34,88–47,71); 35,59 (32,53–48,90); 38,4 (29,82–38,77); 39,46 (33,43–39,93); 28,41 (26,42–43,57); 39,43 (37,95–41,40). Hasil uji statistik tidak ditemukan perbedaan ekspresi Kolagen

I yang berbeda bermakna $p = 0,168$ ($p > 0,05$). Kelompok fibropreventif yang memiliki median persentase Kolagen I paling rendah terlihat pada FP G131 sedangkan median persentase Kolagen I paling tinggi pada kelompok fibropreventif terlihat pada FP G262. Kelompok fibrolisis yang memiliki median persentase Kolagen I paling rendah terlihat pada FL G131, sedangkan median persentase Kolagen I paling tinggi pada kelompok fibrolisis terlihat pada FL G65. Hal tersebut menunjukkan bahwa dalam fibropreventif dan fibrolisis pemberian gambir (FP G131 dan FP G262) lebih baik dibandingkan dengan kelompok fibropreventif dan fibrolisis termasuk pembanding positif yaitu teh hijau.

Delta nilai hitung selisih didapatkan melalui pengurangan rerata kelompok bleomisin terhadap rerata kelompok perlakuan. Delta jumlah sel radang terbesar terlihat pada FP PP. Delta kadar TGF- β 1 dan NF- κ B terbesar terlihat pada FL G262. Delta TIMP-1 dan Kolagen I terbesar terlihat pada FL G131. Kelompok fibropreventif FP PP memiliki delta terbesar dibandingkan kelompok fibropreventif lainnya berdasarkan jumlah sel radang (3,15), kadar NF- κ B (-0,22) dan ekspresi Kolagen I (13,23) diikuti oleh FP G65 yang juga memiliki delta terbesar dibandingkan kelompok fibropreventif lainnya berdasarkan kadar TGF- β 1 (3,38) dan ekspresi TIMP-1 (11,37).

Kelompok fibropreventif gambir menunjukkan delta terbesar jumlah sel radang terlihat pada FP G262, namun tidak terlihat adanya pengaruh semakin tinggi/rendahnya suatu dosis dalam menurunkan jumlah sel radang. Di lain sisi, delta terbesar kadar TGF- β 1 dan ekspresi Kolagen I pada kelompok terlihat pada FP G65 serta terlihat adanya pengaruh semakin rendah dosis gambir semakin baik dalam menurunkan kadar TGF- β 1 dan ekspresi Kolagen I (penurunan delta rerata kadar TGF- β 1 dan ekspresi Kolagen I sejalan dengan peningkatan dosis gambir). Delta rerata kadar NF- κ B pada kelompok fibropreventif menunjukkan hasil negatif yang berarti pemberian fibropreventif gambir dan pembanding positif memiliki rerata kadar NF- κ B yang lebih tinggi dibandingkan kelompok bleomisin serta semakin tinggi dosis gambir semakin meningkatkan kadar NF- κ B.

Kelompok fibrolisis FL G262 memiliki delta terbesar dibandingkan kelompok fibrolisis lainnya berdasarkan jumlah sel radang (0,63), kadar TGF- β 1 (3,80) dan kadar NF- κ B (0,48) diikuti oleh FL G131 yang juga memiliki delta terbesar dibandingkan dengan kelompok fibrolisis lainnya berdasarkan kadar NF- κ B (0,48), kadar TIMP-1 (11,74) dan kadar Kolagen I (14,50). Delta rerata jumlah sel radang dan ekspresi Kolagen I tidak terlihat adanya pengaruh semakin tinggi/rendahnya suatu dosis dalam menurunkan jumlah sel radang dan ekspresi Kolagen I. Di sisi lain, kadar TGF- β 1, NF- κ B dan ekspresi TIMP-1 menunjukkan semakin tinggi dosis gambir semakin baik dalam menurunkan kadar TGF- β 1, NF- κ B dan ekspresi TIMP-1 (penaikkan delta rerata kadar TGF- β 1, NF- κ B dan ekspresi TIMP-1 I sejalan dengan peningkatan dosis gambir). Nilai selisih (D) dapat terlihat bahwa kelompok FP G65 memberikan efek fibropreventif paling besar, sedangkan kelompok FL G262 memberikan efek fibrolisis yang paling besar.

Berdasarkan skor Modifikasi Ascroft ditemukan bahwa gambaran histopatologi derajat terendah yaitu derajat 0 terdapat pada KN. Gambaran histopatologi terberat berdasarkan skor Modifikasi Ascroft terlihat pada KB. Kelompok fibropreventif yang memiliki derajat terendah berdasarkan skor Modifikasi Ascroft adalah FP G65 dan FP PP (derajat 5). Kelompok fibrolisis yang memiliki derajat terendah berdasarkan skor Modifikasi Ascroft adalah FL G262 (Derajat 3). Pemeriksaan *western blot* menunjukkan kelompok fibropreventif dan fibrolisis gambir terlihat di band spesifik ukuran p65, sedangkan pada kelompok pembanding positif tidak adanya ikatan band spesifik.

PEMBAHASAN

Penelitian ini menunjukkan secara umum pemberian gambir dan teh hijau dapat menurunkan jumlah sel radang, kadar TGF- β 1, NF- κ B, ekspresi TIMP-1 dan Kolagen I dibandingkan dengan kontrol bleomisin namun hanya jumlah sel radang yang menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok secara statistik. Pada kelompok fibropreventif gambir, kelompok FP G65 memiliki median jumlah sel radang, kadar TGF- β 1, NF- κ B dan ekspresi TIMP-1 yang lebih rendah dibandingkan kelompok lainnya. Sedangkan pada kelompok fibrolisis gambir,

kelompok FL G262 memiliki median jumlah sel radang, kadar TGF- β 1, NF- κ B dan ekspresi TIMP-1 yang lebih rendah dibandingkan kelompok lainnya. Gambir diketahui memiliki efek antioksidan yang tinggi karena memiliki senyawa katekin yang tinggi.^{74,83,84} Jaringan paru yang mengalami fibrosis akan mengalami inflamasi selular pada awalnya dan secara histologi terdapat akumulasi sel-sel radang seperti limfosit, makrofag, sel plasma, eosinofil dan netrofil. Respons inflamasi merupakan salah satu jalur yang dapat menyebabkan terjadinya fibrosis paru.⁸⁸ Penelitian Tsai et al.⁸⁷ mengatakan bahwa beberapa studi in vitro dan in vivo menunjukkan efek katekin pada fibroblas seperti menekan proliferasi sel, meningkatkan sistem pertahanan antioksidan dan menghambat inflamasi. Paru yang mengalami fibrosis juga mengalami peningkatan TGF- β yang memicu proliferasi miofibroblas, menginduksi sintesis protein matriks ekstraselular dan menekan degradasi ECM dengan cara induksi antiproteinase atau reduksi metaloprotease. You et al.⁹⁰ mengungkapkan EGCG dapat menghambat proliferasi miofibroblas dengan menekan sekresi TGF- β 1. Selain itu, aktivasi NF- κ B juga memegang peran penting dalam jalur sinyal profibrogenik. Gambir berfungsi sebagai agen antifibrotik tidak hanya melalui hambatan terhadap aktivasi NF- κ B namun juga melalui perannya sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Penelitian ini menunjukkan interaksi gambir yang dapat mengikat NF- κ B (terlihat di band spesifik p65) sehingga tidak translokasi ke nukleus, yang menyebabkan tidak terjadinya proses inflamasi/fibrogenesis. Bitzer et al.¹⁰⁰ menunjukkan efek proteksi suatu antifibrosis berhubungan dengan tingginya kadar smad7, inaktivasi jalur sinyal NF- κ B dan TGF- β 1 dengan analisis *western blott* antibodi I κ B α dan NF- κ Bp65. TIMP dan Kolagen I juga berperan dalam proses fibrosis paru. *Tissue inhibitors of metalloproteinase* (TIMPs) merupakan protein spesifik, inhibitor endogen dari *matrix metalloproteinases* (MMPs). Peningkatan kadar TIMPs menghasilkan akumulasi dari ECM sehingga menimbulkan fibrosis paru. Katekin menghambat produksi kolagen I, meningkatkan MMP, sehingga diyakini katekin merupakan terapi potensial untuk fibrosis.⁹⁵

Berdasarkan nilai selisih rerata (D) kelompok fibropreventif gambir. Semakin rendah dosis gambir semakin baik dalam menurunkan kadar TGF- β 1 dan ekspresi TIMP-1 (penurunan delta rerata kadar TGF- β 1 dan ekspresi TIMP-1 sejalan dengan peningkatan dosis gambir). Hal tersebut berlawanan dengan delta

Kolagen I yang menunjukkan semakin tinggi dosis gambir semakin baik dalam menurunkan ekspresi Kolagen I. Di lain sisi, Delta rerata kadar NF- κ B pada kelompok fibropreventif menunjukkan hasil negatif. Tsai et al.⁸⁷ menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan gambir, dosis yang lebih rendah akan menghasilkan respons yang sub optimal sedangkan dosis yang lebih tinggi dapat menyebabkan toksik.

Kelompok fibrolisis gambir menunjukkan semakin tinggi dosis gambir semakin baik dalam menurunkan kadar TGF- β 1, NF- κ B dan ekspresi TIMP-1 (penaikan delta rerata kadar TGF- β 1, NF- κ B dan ekspresi TIMP-1 sejalan dengan peningkatan dosis gambir) sedangkan delta rerata jumlah sel radang dan ekspresi Kolagen I tidak terlihat adanya pengaruh semakin tinggi/rendahnya suatu dosis dalam menurunkan jumlah sel radang dan ekspresi Kolagen I. Hal tersebut menarik, untuk mencapai fibropreventif yang adekuat dibutuhkan dosis yang rendah sedangkan fibrolisis yang adekuat dicapai dengan dosis yang lebih tinggi.

Gambaran histopatologi kelompok fibropreventif yang memiliki derajat terendah berdasarkan skor Modifikasi Ascroft adalah FP G65 dan FP PP (derajat 5). Kelompok fibrolisis yang memiliki derajat terendah berdasarkan skor Modifikasi Ascroft adalah FL G262 (derajat 3), Hal tersebut menarik karena peningkatan dosis fibrolisis sejalan dengan perbaikan gambaran histopatologi. Gambir dan pembanding positif yaitu teh hijau dipercaya dapat menekan ekspresi sitokin inflamasi dan mediator pro-fibrotik. Penelitian Seger et al.⁹⁹ tentang analisis gambaran histopatologi pada paru yang mengalami fibrosis, tampak akumulasi jaringan fibrosis dan deposit kolagen di septum alveoli dengan pewarnaan masson trichome yang spesifik.

SIMPULAN

Terdapat perbedaan bermakna jumlah sel radang antara kelompok kontrol dan perlakuan, sedangkan pada TGF- β 1 BAL, NF- κ B ekspresi TIMP dan Kolagen tidak ditemukan perbedaan bermakna. Berdasarkan hasil penelitian, peningkatan dosis fibropreventif gambir tidak sejalan dengan penurunan kadar TGF- β 1 dan ekspresi TIMP-1 namun sebaliknya dosis lebih rendah menunjukkan penurunan

kadar TGF- β 1 dan ekspresi TIMP-1 lebih baik. Kelompok fibrolisis gambir menunjukkan, peningkatan dosis gambir sejalan dengan penurunan kadar TGF- β 1, NF- κ B dan ekspresi TIMP-1 yang lebih rendah. Gambir dosis 65 mg/kg BB dapat menjadi pilihan sebagai fibropreventif gambir terbaik, sedangkan gambir dosis 262 mg/kg BB dapat menjadi pilihan sebagai fibrolisis terbaik. Hal tersebut juga didukung dengan gambaran makroskopik dan mikroskopik yang menunjukkan sedikit kerusakan jaringan paru dan derajat fibrosis berdasarkan skor modifikasi ascroft yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol bleomisin dan kelompok gambir lainnya. Interaksi gambir juga dapat mengikat NF- κ B sehingga tidak translokasi ke nukleus, yang menyebabkan tidak terjadinya proses inflamasi/fibrogenesis. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut ekspresi MMP, ROS, jumlah fibroblas serta keamanan setelah pemberian fibropreventif gambir dosis 65 mg/kg BB dan fibrolisis gambir dosis 262 mg/kg BB selama 7 minggu pada hewan coba.

SUMMARY

BACKGROUND

Pulmonary fibrosis is a condition of scar tissue formation which involved the infiltration of inflammatory cells, proliferation of fibroblasts, reactive oxygen species (ROS), and excessive extracellular matrix accumulation in the pulmonary parenchymal tissue which can inhibit pulmonary function.^{1,2} Lung biopsy on pulmonary fibrosis showing a scar tissue mixed with normal tissue, hyperplasia and metaplasia epithel, increasing fibroblast and myofibroblast cells.

Uncaria gambir (Hunter) Roxb is a member of the Rubiaceae family and abundantly found in South East Asia, especially around Sumatera region. This plant also has flavonoid (+)-catechin, which is known for its strong antioxidant activity. Catechin has been proven to repair alcohol-induced liver damage through the mechanism of *in vivo* NF- κ B anti-inflammatory pathway. Based on the study, gambir can also be utilized as anti-pulmonary fibrosis.^{12,13}

Therefore, an *in vivo* study is needed to prove the working mechanism of gambir as a fibrolysis and/or fibropreventive substance. Intratracheal bleomycin induction is the best preclinical test on animal models. Bleomycin can induce oxidative stress in the pulmonary tissue, which will trigger an inflammatory reaction and the formation of fibrotic tissues. In developing a new therapy for pulmonary fibrosis that is currently permanent, the administration of gambir is expected to prevent extensive pulmonary fibrosis in rat models. Green tea was used as a positive comparison.

METHODS

This study was conducted in the Laboratory of Surgery Section of the Faculty of Veterinary Medicine, Bogor Agricultural University from September 2018–2019. A random *in vivo* analytical study with an experimental design was performed on ten 10-week-old male Sprague Dawley rats with an average weight of \pm 200-250 grams. This study analyzed the effect of anti-fibrosis from gambir on rats with bleomycin-induced fibrosis. The dose of bleomycin used was 4 mg/kg body weight, given intratracheally. The doses of gambir given were 65 mg, 131 mg, and 262 mg/kg body weight orally, while the dose of green tea given was 125 mg/kg body

weight orally. All animal models were terminated at the end of week 7 or day 50, with a clean pulmonary organ. Part of the organ was taken for analysis of inflammatory cells, TGF- β 1 level in BAL using the ELISA method, type I collagen, TIMP-1 using immunohistochemistry (IHC), and NF- κ B activation using the ELISA and western blot methods. The data were analyzed with the help of SPSS ver. 20. ANOVA test was performed to determine the differences between variables, followed by post hoc test if the result revealed a significant difference.

RESULTS

The subjects were 10 groups of male rats, each consisted of three 10-week-old rats, weighing around 200–250 g. The lowest mean weight of the rats was seen in group FP 6262, with 210 g. Meanwhile, the highest mean weight of rats was seen in group FP PP, with 246 g. The lung weight of all subjects was around 2.8–4.1 g. Relative organ weight was calculated from lung weight divided by body weight. Group KN had 0.016 relative organ weight. Group KB and FL G65 had the highest relative organ weight, which was 0.018, while the lowest relative organ weight was found in group FP G262 and FL G262, which was 0.013.

The inflammatory cell count from BAL between control groups, positive comparison, and gambir found the median of (min–max) of KN, KB, FP PP, FL PP, FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G131, FL G262 were 2.90 (2.3–4.0); 5,70 (5,0–5,8); 2.25 (2.0–2.8); 3.35 (2.7–3.4); 3.0 (2.8–3.2); 4,75 (4,6–5,3); 2.60 (2.0–3.5); 3.70 (1.6–3.8); 4.00 (3.9–4.8); 2.10 (2.0–3.5). Statistical test showed significant difference in BAL inflammatory cell count $p = 0.017$ ($p < 0.05$). The post hoc analysis showed significant differences between KB and KN, FP PP, FL PP, FP G65, FP G262, and FL G262 ($P = 0.037, 0.002, 0.033, 0.023, 0.008$ and 0.005). In fibropreventive group, the lowest median of inflammatory cell count was seen in FP G262 followed by FP G65 while the highest median of inflammatory cell count was seen in FP G131. In fibrolysis group, the lowest median of inflammatory cell count was seen in FL G262, while the highest median of inflammatory cell count was seen in FL G131 followed by FL G65. Post hoc analysis of inflammatory cell count between fibropreventive/fibrolysis positive comparison (green tea) and gambir found significant difference, FP PP vs. FP G131 (0.009) and FL PP vs. FL 131 ($p = 0.023$).

TGF- β 1 level between control groups, positive comparison, and gambir found the median (min-max) of KN, KB, FP PP, FL PP, FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G131, FL G262 were 0.88 (0.3-2.3); 4.52 (2.6-6.2); 1.14 (0.1-2.6); 2.30 (1.0-4.4); 1.12 (0.4-1.6); 2.58 (1.2-6.7); 2.97 (1.6-3.5); 1.50 (0.3-2.3); 1.02 (0.1-3.1); 0.64 (0.5-0.8). Statistical results showed insignificant difference in TGF- β 1 level ($p = 0.117$; $p > 0.05$). In fibropreventive group, the lowest median of TGF- β 1 levels was seen in FP G65, while the highest median of TGF- β 1 level was seen in FP G262. In fibrolysis group, the lowest median of TGF- β 1 level was seen in FL G262, while the highest median of TGF- β 1 level was seen in FL G65.

NF- κ B level between control groups, positive comparison, and gambir found the median of (min-max) of KN, KB, FP PP, FL PP, FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G131, FL G262 were 3.34 (2.5-5.1); 2.41 (1.0-3.5); 2.62 (2.2-2.8); 1.89 (1.9-3.2); 2.89 (2.2-5.3); 4.38 (3.4-5.6); 4.36 (3.3-5.7); 2.79 (1.7-3.1); 1.59 (1.0-3.0); 0.70 (0.6-4.2). Statistical results showed insignificant difference in NF- κ B level ($p = 0.134$; $p > 0.05$). In fibropreventive group, the lowest median of NF- κ B level was seen in FP G65, while the highest median of NF- κ B levels was seen in FP G131. In fibrolysis group, the lowest median of NF- κ B levels was seen in FL G262, while the highest median of NF- κ B levels was seen in FL G65.

TIMP-1 expression using Image J level between control groups, positive comparison, and gambir found the median of (min-max) of KN, KB, FP PP, FL PP, FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G131, FL G262 were 26.77 (16.76-28.77); 40.5 (32.44-40.6); 27.28 (21.36-43.34); 28.56 (22.62-35.70); 27.87 (23.14-28.41); 30.37 (20.97-34.70); 35.30 (32.46-43.13); 34.58 (26.50-35.51); 27.84 (22.28-28.20); 24.52 (23.03-33.22). Statistical results showed insignificant difference in TIMP-1 expression ($p = 0.31$; $p > 0.05$). In fibropreventive group, the lowest median of TIMP-1 expression was seen in FP PP followed by FP G65, while the highest median of TIMP-1 expression was seen in FP G262. In fibrolysis group, the lowest median of TIMP-1 expression was seen in FL G262 followed by FL G131, while the highest median of TIMP-1 expression was seen in FL G65.

Collagen I expression using Image J level between control groups, positive comparison, and gambir found the median of (min-max) of KN, KB, FP PP, FL PP, FP G65, FP G131, FP G262, FL G65, FL G131, FL G131, FL G262 were 29.2 (26.35–32.03); 48.36 (44.51–49.02); 36.04 (26.17–39.99); 38.02 (29.40–38.64); 36.82 (34.88–47.71); 35.59 (32.53–48.90); 38.4 (29.82–38.77); 39.46 (33.43–39.93); 28.41 (26.42–43.57); 39.43 (37.95–41.40). Statistical results showed insignificant difference in Kolagen I expression ($p = 0.168$; $p > 0.05$). In fibropreventive group, the lowest median of Collagen I expression was seen in FP G131 followed by FP PP, while the highest median of Collagen I expression was seen in FP G262. In fibrolysis group, lowest median of Collagen I expression was seen in FL G131, while the highest median of Collagen I expression was seen in FL G65.

Mean delta values were obtained through the reduction of mean value of bleomycin group against the mean value of treatment group. The highest delta of inflammatory cell count was seen in FP PP. The highest delta of TGF- β 1 and NF- κ B levels were seen in FL G262. The highest delta of TIMP-1 and Collagen expressions were seen in FL G131. In fibropreventive, FP PP had the highest delta compared to other fibropreventive group based on inflammatory cell count (3.15), NF- κ B levels (-0.22) dan Collagen I expression (13.23) followed by FP 65 had the highest delta compared to other fibropreventive group based on TGF- β 1 levels (3.38) dan TIMP-1 expressions (11,37). Based on inflammatory cell count, there is no influence of the higher/lower the gambir dose in reducing the inflammatory cells count. On the other hand, based on TGF- β 1 levels dan Collagen I expressions, there is influence of the lower the gambir dose the better in reducing TGF- β 1 levels and Collagen I expressions (decreasing mean delta of TGF- β 1 levels and Collagen I expression in line with increasing in gambier doses). Mean delta of NF- κ B levels showing a negative result which is the fibropreventive gambir and positive comparison administration had a higher mean level of NF- κ B compared to bleomycin group and the higher the gambir dose, the higher the NF- κ B level.

The FL G262 fibrolysis group had the largest delta compared to other fibrolysis groups based on the number of inflammatory cells (0.63), TGF- β 1 levels (3.80) and NF- κ B levels (0.48) followed by FL G131 which also had the largest delta

compared with other fibrolysis groups based on NF- κ B levels (0.48), TIMP-1 levels (11.74) and Collagen I levels (14.50). Western blot examination showed fibropreventive groups and *gambir* fibrolysis was seen in a specific band of p65 size, whereas there was no specific band binding in the positive comparison group.

DISCUSSION

This study showed in general the administration of gambir and green tea can reduce the inflammatory cells count, TGF- β 1 levels, NF- κ B, TIMP-1 and Collagen I expression compared with bleomycin control. Statistical test showed significant difference in BAL inflammatory cell count. In gambir fibropreventive, FP G65 had a lower median of inflammatory cells count, TGF- β 1, NF- κ B and TIMP-1 expression compared to other groups. Whereas in gambir fibrolysis, FL G262 had a lower median of inflammatory cells count, TGF- β 1, NF- κ B and TIMP-1 expression compared to other groups. Gambir has a high antioxidant activity because it has high catechin compounds.^{74,83,84} The fibrotic lung tissue will initially experience a cellular inflammation and histologically, there is an accumulation of inflammatory cells such as lymphocytes, macrophages, plasma cells, eosinophils and neutrophils. The inflammatory response is one of the pathways which can cause pulmonary fibrosis.⁸⁸ Tsai et al.⁸⁷ revealed several in vitro and in vivo studies showing catechin effects on fibroblasts such as suppressing cell proliferation, increasing the antioxidant defense system and inhibiting inflammation. The fibrotic lung will also experience an increase in TGF- β which triggers myofibroblast proliferation, induces the synthesis of extracellular matrix proteins and suppresses ECM degradation by antiproteinase induction or metalloprotease reduction which can cause fibrosis. You et al.⁹⁰ revealed EGCG can also inhibit myofibroblast proliferation by suppressing TGF- β 1 secretion. Activation of NF- κ B also plays an important role in the profibrogenic signaling pathway. Role of gambir as an antifibrotic agent not only through inhibition of NF- κ B activation but also through its role as an antiinflammatory and antioxidant. This study showed gambir bind to NF- κ B (seen in specific bands p65) so that they are not translocated to the nucleus, which causes no inflammatory/fibrogenesis process. Bitzer et al.¹⁰⁰ revealed the protective effect of antifibrosis associated with high levels of smad7, inactivation

of NF- κ B and TGF- β 1 signaling pathways by western blott analysis I κ B α and NF- κ Bp65 antibodies. TIMP and Collagen I also play a role in the process of pulmonary fibrosis. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) are specific proteins, endogenous inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs). Increased levels of TIMPs result in accumulation of ECM resulting in pulmonary fibrosis. Catechins inhibit collagen I production, increase MMP, so it is believed that catechins are a potential therapy for fibrosis.

Based on the mean delta (D) of gambir fibropreventive group. The lower the gambir dose, the better in reducing TGF- β 1 levels and TIMP-1 expression (decreasing mean delta levels of TGF- β 1 and TIMP-1 expression in line with increasing gambir doses). This is in contrast to Collagen I which showed the increasing the dose of gambir, the better in reducing the expression of Collagen I. On the other hand, the mean delta of NF- κ B levels in fibropreventive group showed negative results. Tsai et al.⁸⁷ revealed antioxidant activity in gambir showed lower doses will produce sub-optimal response while higher doses may result in toxicity. Fibrolysis gambir group showed, the increasing the dose of gambir, the better in reducing TGF- β 1, NF- κ B levels and TIMP-1 expression (increasing mean delta of TGF- β 1, NF- κ B levels and TIMP-1 expression in line with increasing gambir doses) while mean delta of inflammatory cells count and Collagen I expression did not show any effect of the higher/lower gambir doses in reducing inflammatory cells count and Collagen I expression. It is interesting, to achieve adequate fibropreventive low doses are needed while adequate fibrolysis is achieved at higher doses.

The histopathological features of fibropreventive group showed the lowest degree based on Modified Ashcroft score were FP G65 and FP PP (5th degree). Fibrolysis group showed the lowest degree based on Modified Ashcroft score was FL G262 (3rd degree). In gambir fibrolysis, the increasing of gambir doses was in line with the improvement in histopathological features. Gambir and green tea are believed to suppress the expression of inflammatory cytokines and pro-fibrotic mediators. Seger et al.⁹⁹ in analysis of histopathological features in fibrotic lungs showed fibrosis tissue accumulation and collagen deposits in the alveoli septum.

CONCLUSION

There were significant differences of inflammatory cells count between the control and treatment groups, whereas in TGF- β 1 BAL, NF- κ B, TIMP and Collagen expression were not found to be significant differences. Based on the results of the study, the increasing of gambir fibropreventive doses is not in line with decreasing in TGF- β 1 levels and TIMP expression, but conversely lower gambir fibropreventive doses showed a decreasing in TGF- β and TIMP expression. Gambir fibrolysis group showed, the increasing of gambir doses was in line with the decreasing of TGF- β 1, NF- κ B and TIMP-1 expression. Gambir 65 mg/kg may serve as the best option for gambir fibropreventive while gambir 262 mg/kg may serve as the best option for gambir fibrolysis. Macroscopic and microscopic images showing a slight damage on lung and lower degree of fibrosis based on Modified Ashcroft score compared to bleomycin and other gambir groups. Gambir may bind to NF- κ B (seen in specific bands p65) so that they are not translocated to the nucleus, which causes no inflammatory/fibrogenesis process. Further research is needed on MMP expression, ROS, fibroblasts cells count and the safety after administration of gambir fibropreventive 65 mg/kg and gambir fibrolysis 262 mg/kg for seven weeks in experimental animals.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tsukioka T, Takemura S, Minamiyama Y, Mizuguchi S, Toda M, Okada S. Attenuation of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats with S-Allyl Cysteine. *Molecules*. 2017;22(4):543–53.
2. Decolonne N, Kolb M, Margetts PJ, Menetrier F, Artur Y, Garrido C, et al. TGF- β 1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. *Immunol*. 2007;179(9):6043–51.
3. Tatler AL, Jenkins G. TGF- β activation and lung fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2012;9(3):130–6.
4. Nalysnyk L, Cid-Ruzafa J, Rotella P, Esser D. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *Eur Respir Rev*. 2012;21(126):355–61.
5. Raimundo K, Chang E, Broder MS, Alexander K, Zazzali J, Swigris JJ. Clinical and economic burden of idiopathic pulmonary fibrosis: a retrospective cohort study. *BMC Pulm Med*. 2016;16(1):2–8.
6. Maharaj S, Shimbori C, Kolb M. Fibrocytes in pulmonary fibrosis: a brief synopsis. *Eur Respir Rev*. 2013;22(130):552–7.
7. Cheres P, Kim S-J, Tulasiram S, Kamp DW. Oxidative stress and pulmonary fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(7):1028–40.
8. Kinnula VL, Fattman CL, Tan RJ, Oury TD. Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(4):417–22.
9. Varga J, Pasche B. Anti-TGF- β therapy in fibrosis: recent progress and implications for systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2008;20(6):720–28.
10. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92(8):827–39.
11. Kandhare AD, Mukherjee A, Ghosh P, Bodhankar SL. Efficacy of antioxidant in idiopathic pulmonary fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *EXCLI J*. 2016;15:636–51.

12. Hussin MH, Kassim MJ, Physics. The corrosion inhibition and adsorption behavior of *Uncaria gambir* extract on mild steel in 1 M HCl. *Mater Chem Phys*. 2011;125(3):461–8.
13. Ningsih S. Efek hepatoprotektor gambir (*Uncaria gambir* (Hunter)Roxb.) dalam menghambat pembentukan kolagen dengan menekan TIMP-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase-1) in vivo. Disertasi program doktor ilmu biomedik FK UI. 2015.
14. Bharrhan S, Koul A, Chopra K, Rishi P. Catechin suppresses an array of signalling molecules and modulates alcohol-induced endotoxin mediated liver injury in a rat model. *PLoS One*. 2011;6(6):e20635.
15. Tashiro J, Rubio GA, Limper AH, Williams K, Elliot SJ, Ninou I, et al. Exploring animal models that resemble idiopathic pulmonary fibrosis. *Front Med*. 2017;4 (118):1–18.
16. Roya Y, Tooba G. Substance P Potentiates TGF- β 1 Production in Lung Epithelial Cell Lines. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2009:19–24.
17. Dong L-H, Jiang Y-Y, Liu Y-J, Cui S, Xia C-C, Qu C, et al. The anti-fibrotic effects of mesenchymal stem cells on irradiated lungs via stimulating endogenous secretion of HGF and PGE2. *Sci Rep*. 2015;5:8713.
18. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001;134(2):136–51.
19. Wilson M, Wynn T. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol*. 2009;2(2):103–21.
20. Kumar A, Kapnadak SG, Girgis RE, Raghu G. Lung transplantation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Rev Respir Med*. 2018;12(5):375–85.
21. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007;117(3):524–9.
22. Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med*. 2011;208(7):1339–50.
23. Glasser SW, Hagood JS, Wong S, Taype CA, Madala SK, Hardie WD. Mechanisms of lung fibrosis resolution. *Am J Pathol*. 2016;186(5):1066–77.

24. Amara N, Goven D, Prost F, Muloway R, Crestani B, Boczkowski J. NOX4/NADPH oxidase expression is increased in pulmonary fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates TGF β 1-induced fibroblast differentiation into myofibroblasts. *Thorax*. 2010;65(8):733–8.
25. Li D, Guabiraba R, Besnard A-G, Komai-Koma M, Jabir MS, Zhang L, et al. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134(6):1422–32. e11.
26. Newman DR, Sills WS, Hanrahan K, Ziegler A, Tidd KM, Cook E, et al. Expression of WNT5A in idiopathic pulmonary fibrosis and its control by TGF- β and WNT7B in human lung fibroblasts. *J Histochem Cytochem*. 2016;64(2):99–111.
27. Lovgren AK, Kovacs JJ, Xie T, Potts EN, Li Y, Foster WM, et al. β -arrestin deficiency protects against pulmonary fibrosis in mice and prevents fibroblast invasion of extracellular matrix. *Sci Transl Med* 2011;3(74):74ra23–74ra23.
28. Sakai N, Tager AM. Fibrosis of two: Epithelial cell-fibroblast interactions in pulmonary fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832(7):911–21.
29. Denis M. Neutralization of transforming growth factor-beta 1 in a mouse model of immune-induced lung fibrosis. *Immunology*. 1994;82(4):584–90.
30. Maden E, Hatice T, Turgut T, Korkmaz C, Kiyici H, Imecik O, et al. The Effect of Cigarette Smoke in Bleomycin Induced Pulmonary Fibrosis in the Rat Model. *Int J Hematol*. 2011;28(4):141–6.
31. Bonniaud P, Margetts PJ, Kolb M, Schroeder JA, Kapoun AM, Damm D, et al. Progressive transforming growth factor β 1-induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171(8):889–98.
32. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors*. 2011;29(5):196–202.
33. Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: tale of a strained relationship. *Matrix Biol*. 2015;47:54–65.

34. Prud'Homme GJ. Pathobiology of transforming growth factor β in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab Invest.* 2007;87(11):1077–91.
35. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin C-H. Smad regulation in TGF- β signal transduction. *J Cell Sci.* 2001;114(24):4359–69.
36. Gu L, ZHU Yj, Yang X, GUO ZJ, XU Wb, TIAN XI. Effect of TGF- β /Smad signaling pathway on lung myofibroblast differentiation 4. *Acta Pharmacol Sin.* 2007;28(3):382–91.
37. Kim SI, Choi ME. TGF- β -activated kinase-1: New insights into the mechanism of TGF- β signaling and kidney disease. *Kidney Res Clin Pract* 2012;31(2):94–105.
38. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol.* 2014;5(123):1–13.
39. Kenyon N, Ward R, McGrew G, Last JA. TGF- β 1 causes airway fibrosis and increased collagen I and III mRNA in mice. *Thorac.* 2003;58(9):772–7.
40. Warshamana GS, Pociask DA, Fisher KJ, Liu JY, Sime PJ, Brody AR. Titration of non-replicating adenovirus as a vector for transducing active TGF- β 1 gene expression causing inflammation and fibrogenesis in the lungs of C57BL/6 mice. *Int J Exp Pathol* 2002;83(4):183–202.
41. Clarke DL, Carruthers AM, Mustelin T, Murray LA. Matrix regulation of idiopathic pulmonary fibrosis: the role of enzymes. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2013;6(20)(1):1–9.
42. Blaauboer ME, Boeijen FR, Emson CL, Turner SM, Zandieh-Doulabi B, Hanemaaijer R, et al. Extracellular matrix proteins: a positive feedback loop in lung fibrosis? *Matrix Biol.* 2014;34:170–8.
43. Kim JY, Choeng HC, Ahn C, Cho S-H. Early and late changes of MMP-2 and MMP-9 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Yonsei Med J* 2009;50(1):68–77.
44. Wang C, Song X, Li Y, Han F, Gao S, Wang X, et al. Low-dose paclitaxel ameliorates pulmonary fibrosis by suppressing TGF- β 1/Smad3 pathway via miR-140 upregulation. *PLoS One.* 2013;8(8):e70725.

45. Golan-Gerstl R, Wallach-Dayana SB, Zisman P, Cardoso WV, Goldstein RH, Breuer R. Cellular FLICE-like inhibitory protein deviates myofibroblast fas-induced apoptosis toward proliferation during lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;47(3):271–9.
46. Ramos C, Montaña M, Becerril C, Cisneros-Lira J, Barrera L, Ruiz V, et al. Acidic fibroblast growth factor decreases α -smooth muscle actin expression and induces apoptosis in human normal lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;291(5):L871–L9.
47. Hecker L, Jagirdar R, Jin T, Thannickal VJ. Reversible differentiation of myofibroblasts by MyoD. *Exp Cell Res.* 2011;317(13):1914–21.
48. Reddy AT, Lakshmi SP, Zhang Y, Reddy RC. Nitrated fatty acids reverse pulmonary fibrosis by dedifferentiating myofibroblasts and promoting collagen uptake by alveolar macrophages. *FASEB J.* 2014;28(12):5299–310.
49. Hecker L, Logsdon NJ, Kurundkar D, Kurundkar A, Bernard K, Hock T, et al. Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance. *Sci Transl Med.* 2014;6(231):231ra47–ra47.
50. Artaud-Macari E, Goven D, Brayer S, Hamimi A, Besnard V, Marchal-Somme J, et al. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 nuclear translocation induces myofibroblastic dedifferentiation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(1):66–79.
51. Huang W-T, Akhter H, Jiang C, MacEwen M, Ding Q, Antony V, et al. Plasminogen activator inhibitor 1, fibroblast apoptosis resistance, and aging-related susceptibility to lung fibrosis. *Exp Gerontol.* 2015;61:62–75.
52. Garrison G, Huang SK, Okunishi K, Scott JP, Kumar Penke LR, Scruggs AM, et al. Reversal of myofibroblast differentiation by prostaglandin e2. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013;48(5):550–8.
53. Zhou Y, Huang X, Hecker L, Kurundkar D, Kurundkar A, Liu H, et al. Inhibition of mechanosensitive signaling in myofibroblasts ameliorates experimental pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 2013;123(3):1096–108.
54. Sisson TH, Ajayi IO, Subbotina N, Dodi AE, Rodansky ES, Chibucos LN, et al. Inhibition of myocardin-related transcription factor/serum response factor

- signaling decreases lung fibrosis and promotes mesenchymal cell apoptosis. *Am J Pathol.* 2015;185(4):969–86.
55. Horowitz JC, Ajayi IO, Kulasekaran P, Rogers DS, White JB, Townsend SK, et al. Survivin expression induced by endothelin-1 promotes myofibroblast resistance to apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(1):158–69.
 56. Kulasekaran P, Scavone CA, Rogers DS, Arenberg DA, Thannickal VJ, Horowitz JC. Endothelin-1 and transforming growth factor- β 1 independently induce fibroblast resistance to apoptosis via AKT activation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;41(4):484–93.
 57. Sanders YY, Tollefsbol TO, Varisco BM, Hagood JS. Epigenetic regulation of thy-1 by histone deacetylase inhibitor in rat lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45(1):16–23.
 58. Ajayi IO, Sisson TH, Higgins PD, Booth AJ, Sagana RL, Huang SK, et al. X-linked inhibitor of apoptosis regulates lung fibroblast resistance to Fas-mediated apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013;49(1):86–95.
 59. Hostettler KE, Zhong J, Papakonstantinou E, Karakiulakis G, Tamm M, Seidel P, et al. Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2014;15(157)(1).
 60. Moore MW, Herzog EL. Regulation and relevance of myofibroblast responses in idiopathic pulmonary fibrosis. *Curr Pathobiol Rep.* 2013;1(3):199–208.
 61. MacKinnon AC, Gibbons MA, Farnworth SL, Leffler H, Nilsson UJ, Delaine T, et al. Regulation of transforming growth factor- β 1-driven lung fibrosis by galectin-3. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185(5):537–46.
 62. Huang M, Sharma S, Zhu LX, Keane MP, Luo J, Zhang L, et al. IL-7 inhibits fibroblast TGF- β production and signaling in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest.* 2002;109(7):931–7.
 63. McCormick LL, Zhang Y, Tootell E, Gilliam AC. Anti-TGF- β treatment prevents skin and lung fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease: a model for human scleroderma. *J Immunol.* 1999;163(10):5693–9.

64. Zheng C, Yin Q, Wu H. Structural studies of NF- κ B signaling. *Cell Res.* 2011;21(1):183–95.
65. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(4):a000034.
66. Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004;25(6):280–8.
67. Chen J, Chen ZJ, Cooi. Regulation of NF- κ B by ubiquitination. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(1):4–12.
68. Yang J, Cui Y, Kolb M. How useful is traditional herbal medicine for pulmonary fibrosis? *Respirology.* 2009;14(8):1082–91.
69. Taniguchi S, Kuroda K, Doi K-i, Inada K, Yoshikado N, Yoneda Y, et al. Evaluation of gambir quality based on quantitative analysis of polyphenolic constituents. *Yakugaku zasshi.* 2007;127(8):1291–300.
70. Dhalimi A. Permasalahan gambir (*Uncaria gambir* L.) di Sumatera Barat dan alternatif pemecahannya. *Perspektif.* 2015;5(1):46–59.
71. Roufiq N HE, Hasibuan AM. Status teknologi dan budidaya pengolahan gambir. *Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian.* 2014.
72. Denian A, Hadad M. Karakteristik Pohon Induk Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) di Sentra Produksi Sumatera Barat dan Riau. 2008:18–38.
73. S S. Recognize *Uncaria gambir*. *Yakushigaku Zasshi* 2004;39(2):355–62.
74. Anggraini T, Tai A, Yoshino T, Itani T. Antioxidative activity and catechin content of four kinds of *Uncaria gambir* extracts from West Sumatra, Indonesia. *J Biochem.* 2011;5(1):33–8.
75. Edward Z. The function utilization of gambier (*Uncaria gambir*) as the hepatoprotector. *Riset Kimia.* 2009;2(2).
76. Siegers C-P, Völpel M, Scheel G, Younes M. Effects of dithiocarb and (+)-catechin against carbon tetrachloride-alcohol-induced liver fibrosis. *Agents Actions.* 1982;12(5):743–8.
77. Hübner R-H, Gitter W, Eddine El Mokhtari N, Mathiak M, Both M, Bolte H, et al. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques.* 2008;44(4):507–17.

78. Peng R, Sridhar S, Tyagi G, Phillips JE, Garrido R, Harris P, et al. Bleomycin induces molecular changes directly relevant to idiopathic pulmonary fibrosis: a model for “active” disease. *PloS One*. 2013;8(4):e59348.
79. Grande NR, Peão MN, De Sá CM, Águas AP. Lung fibrosis induced by bleomycin: structural changes and overview of recent advances. *Scanning Microsc*. 1998;12(3):487–94.
80. B. Moore B, Lawson WE, Oury TD, Sisson TH, Raghavendran K, Hogaboam CM. Animal models of fibrotic lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;49(2):167–79.
81. Decolonne N, Wettstein G, Kolb M, Margetts P, Garrido C, Camus P, et al. Bleomycin induces pleural and subpleural fibrosis in the presence of carbon particles. *Eur Respir J*. 2010;35(1):176–85.
82. El-Safti FA, Zolfakar AS, El-Sherif NM, Alafify AS. Effect of Green Tea Extract on Experimentally Induced Lung Fibrosis in Adult Male Albino Rat. *Journal of American Science*. 2014;10(8):234–47.
83. Ferita I, Jamsari J, Suliansyah I, Gustian G. Studi hubungan karakter morfologi anatomi dan molekuler terkait potensi kadar katekin pada tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.). *Respository Universitas Andalas*. 2015.
84. Rauf R, Santoso U, Suparmo S. Aktivitas penangkapan radikal DPPH ekstrak gambir (*Uncaria gambir* Roxb.). *AgriTECH*. 2010;30(1).
85. Melia S, Novia D, Juliyarsi I. Antioxidant and antimicrobial activities of gambir (*uncaria gambir roxb*) extracts and their application in rendang. *Pak J Nutr*. 2015;14(12):938–41.
86. Fois AG, Paliogiannis P, Sotgia S, Mangoni AA, Zinellu E, Pirina P, et al. Evaluation of oxidative stress biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis and therapeutic applications: a systematic review. *Respir Res*. 2018;19(1):51.
87. Tsai M-J, Chang W-A, Liao S-H, Chang K-F, Sheu C-C, Kuo P-L. The Effects of Epigallocatechin Gallate (EGCG) on Pulmonary Fibroblasts of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF)—A Next-Generation Sequencing and Bioinformatic Approach. *Int J Mol Sci*. 2019;20(1958).

88. Todd NW, Luzina IG, Atamas SP. Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(1):11.
89. Tabuchi M, Hayakawa S, Honda E, Ooshima K, Itoh T, Yoshida K, et al. Epigallocatechin-3-gallate suppresses transforming growth factor-beta signaling by interacting with the transforming growth factor-beta type II receptor. *World J Exp Med*. 2013;3:100–7.
90. You H, Wei L, Sun W-L, Wang L, Yang Z-L, Liu Y, et al. The green tea extract epigallocatechin-3-gallate inhibits irradiation-induced pulmonary fibrosis in adult rats. *Int J Mol Med*. 2014;34(1):92–102.
91. Lago JHG, Toledo-Arruda AC, Mernak M, Barrosa KH, Martins MA, Tibério IF, et al. Structure-activity association of flavonoids in lung diseases. *Molecules*. 2014;19(3):3570–95.
92. Di Paola R, Mazzon E, Muià C, Genovese T, Menegazzi M, Zaffini R, et al. Green tea polyphenol extract attenuates lung injury in experimental model of carrageenan-induced pleurisy in mice. *Respir Res*. 2005;6(66):1–13.
93. Beigh S, Rashid H, Sharma S, Parvez S, Raisuddin S. Bleomycin-induced pulmonary toxicopathological changes in rats and its prevention by walnut extract. *Biomed Pharmacother*. 2017;94:418–29.
94. Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol*. 2015;44:247–54.
95. Donà M, Dell'Aica I, Calabrese F, Benelli R, Morini M, Albin A, et al. Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis. *J Immunol*. 2003;170(8):4335–41.
96. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis—a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol*. 2007;46(5):955–75.
97. Zhen M-c, Huang X-h, Wang Q, Sun K, Liu Y-j, Li W, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses rat hepatic stellate cell invasion by inhibition of MMP-2 expression and its activation. *Acta Pharmacol Sin*. 2006;27(12):1600–7.
98. Nakamuta M, Higashi N, Kohjima M, Fukushima M, Ohta S, Kotoh K, et al. Epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea, suppresses

- both collagen production and collagenase activity in hepatic stellate cells. *Int J Mol Med*. 2005;16(4):677–81.
99. Seger S, Stritt M, Vezzali E, Nayler O, Hess P, Groenen PM, et al. A fully automated image analysis method to quantify lung fibrosis in the bleomycin-induced rat model. *PloS one*. 2018;13(3):1–12.
100. Bitzer M, von Gersdorff G, Liang D, Dominguez-Rosales A, Beg AA, Rojkind M, et al. A mechanism of suppression of TGF- β /SMAD signaling by NF- κ B/RelA. *Genes Dev*. 2000;14(2):187–97.

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Persetujuan Komisi Etik FKH IPB



KOMISI ETIK HEWAN FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
(Animal Ethics Committee Faculty of Veterinary Medicine)
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
(Bogor Agricultural University)

PERSETUJUAN ETIK

=====

(ETHICAL APPROVAL)

Nomor: 114/KEH/SKE/XII/2018

Komisi Etik Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, telah mengkaji dengan teliti proposal penelitian yang menggunakan subjek Hewan Coba dalam penelitian yang berjudul:
(*The Animal Ethics Committee Faculty of Veterinary Medicine Bogor Agricultural University, has been thoroughly reviewed proposal for research with animal subjects in research entitled:*)

Efek Fibropreventif dan Fibrolisis Pemberian Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) pada Paru dan Pleura Tikus Model Fibrosis

(Fibropreventive and Fibrolysis Effects of Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) on the Lung and Pleural Rat With Fibrosis Models)

Nama Peneliti Utama (Principal Reseacher)	: Dr. Desdiani, MKK, Sp.P
Pembimbing (Supervisor)	: 1. Dr. Iris Rengganis, SpPD-KAI 2. Prof. Dr. Samsuridjal Djauzi, SpPD-KAI 3. Prof. Drh. Agus Setiyono, PhD, ApVet
Nama Institusi (Institution)	: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Program Doktor Ilmu Kedokteran

proposal tersebut dapat disetujui pelaksanaannya.
(*hereby declare that the proposal is approved.*)

Ditetapkan di (Issued in) : Bogor
Tanggal (Date) : 19 Desember 2018

Ketua,
Chairman,

Prof Drh Arief Boediono, PhD, PAVet(K)
NIP 19640305 198803 1 002

Keterangan (Notes):

Persetujuan etik ini berlaku selama satu tahun sejak tanggal ditetapkan
(*This ethical clearance is effective for one year from the due date.*)

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan ke komis etik hewan.

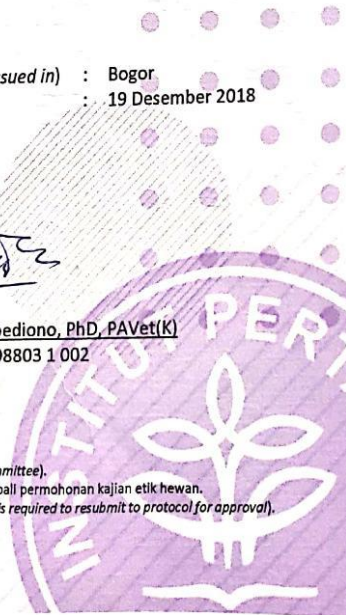
(*In the end of research, progress and final summary report should be submitted to the animal ethics committee.*)

Jika ada perubahan atau penyimpangan protokol dan/perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik hewan.

(*If there be any protocol modification of divilation and/or extension of the study, the pricipal investigator is required to resubmit to protocol for approval.*)

Jika ada kejadian serius yang tidak diinginkan harus segera dilaporkan ke komis etik hewan.

(*If there serious adverse events should be immadietely reported to the animal ethics committee.*)



Lampiran 2. Surat Persetujuan Komisi Etik FK Universitas Indonesia



UNIVERSITAS INDONESIA FAKULTAS KEDOKTERAN

Gedung Fakultas Kedokteran UI
Jl. Salemba Raya No.6, Jakarta 10430
PO.Box 1358
T. 62.21.3912477, 31930371, 31930373,
3922977, 3927360, 3153236
F. 62.21.3912477, 31930372, 3157288
E. humas@fk.ui.ac.id, office@fk.ui.ac.id
fk.ui.ac.id

Nomor: 0060 /UN2.F1/ETIK/I/2019
Hal : Persetujuan Lolos Kaji Etik

21 Januari 2019

Yth. Dr. Desdiani, MKK, Sp.P
Peneliti Utama
Mahasiswa Doktoral Ilmu Kedokteran FKUI
Jakarta

Sehubungan dengan surat Saudara pada tanggal 17 Januari 2019, perihal Permohonan *Ethical Approval* untuk penelitian yang berjudul: "Efek Fibropreventif dan Fibrolisis Pemberian Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) pada Paru dan Pleura Tikus Model Fibrosis".

Peneliti Utama : Dr. Desdiani, MKK, Sp.P
Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Program Doktor Ilmu Kedokteran
Tempat Penelitian : Unit Pengelola Hewan Laboratorium FKH IPB, Laboratorium Patologi FKH IPB, Pusat Riset Virologi dan Kanker Patobiologi FKUI-RSCM.

Komite Etik Penelitian Kesehatan FKUI-RSCM dengan ini menyampaikan bahwa:

- Surat Persetujuan Etik (*Ethical Approval*) dari Komisi Etik Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor dengan Nomor: 114/KEH/SKE/XII/2018 tanggal 19 Desember 2018 dapat diterima, sehingga penelitian boleh dilaksanakan berdasarkan surat tersebut.

Atas laporan dan kerjasamanya, kami ucapkan terima kasih.



Prof. dr. Rita Sita Sitorus, PhD, SpM(K)
Ketua

Semua prosedur persetujuan dilakukan sesuai dengan standar ICH-GCP.
All procedures of Ethical Approval are performed in accordance with ICH-GCP standard procedure.

Lampiran 3. Lembar Izin Penelitian

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIT PENGELOLA HEWAN LABORATORIUM
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga
Telp +62 251 8629460 / HP. 081384739935

SURAT KETERANGAN

Bersama ini kami memberikan surat keterangan dengan biodata peneliti :

Nama : dr. Desdiani, MKK, Sp.P
Program Studi : Kedokteran Strata 3, Universitas Indonesia
NPM : 1606840424

Peneliti tersebut akan melakukan penelitian untuk tugas akhir yang akan dilaksanakan di Unit Pengelola Hewan Laboratorium, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

Demikian surat keterangan ini dibuat agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Bogor, 8 Oktober 2018
Unit Pengelola Hewan Laboratorium,
Ketua

Dr Drh Aulia Andi Mustika, MSi
NIP. 1982 1031 201212 1 002

Lampiran 4. Lembar Izin Penelitian Hewan



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIT PENGELOLA HEWAN LABORATORIUM
 FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
 INSTITUT PERTANIAN BOGOR
 Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga
 Telp +62 251 8629460 / HP. 081384739935

SURAT KETERANGAN

Bersama ini kami memberikan surat keterangan untuk hewan dengan *signalement*:

Jenis hewan : Tikus
 Strain : *Sprague dawley*
 Jenis kelamin : Jantan
 Jumlah : 30 ekor
 Bobot badan : 200-250 gram
 Asal Hewan : BPOM RI

Hewan tersebut sesuai dengan kriteria diatas dan akan digunakan untuk kepentingan penelitian oleh dr. Desdiani, MKK, Sp.P (NPM 1606840424), mahasiswa Program Studi Kedokteran Strata 3, Universitas Indonesia. Secara klinis hewan tersebut sehat dan tidak menunjukkan adanya kelainan medis, serta belum pernah dilakukan untuk kepentingan penelitian sebelumnya.

Demikian surat keterangan ini dibuat agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Bogor, 8 Oktober 2018
 Unit Pengelola Hewan Laboratorium,
 Ketua

Dr Drh Aulia Andi Mustika, MSi
 NIP. 1982 1031 201212 1 002

Lampiran 5. Penyiapan Ekstrak Gambir

Bahan baku gambir diperoleh dari daerah Payakumbuh Sumatera Barat. Sampel uji adalah ekstrak gambir yang dibuat dengan mengekstrak getah kering gambir menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstraksi dilakukan dengan cara sebagai berikut, sebanyak 25 gram serbuk getah gambir kering diekstraksi menggunakan 100 mL etanol dengan cara maserasi dengan pengadukan kecepatan 120-150 rpm selama sekitar 16-18 jam pada suhu kamar. Selanjutnya, filtrat dipisahkan dengan penyaringan menggunakan kertas saring dan dikeringkan secara vakum menggunakan alat *rotary evaporatour* pada suhu 40⁰-50⁰C hingga diperoleh masa berupa ekstrak kental, dilanjutkan pengeringan menggunakan oven suhu 37⁰-40⁰C hingga diperoleh ekstrak kering. Ekstrak dihaluskan menggunakan mesin blender, diayak mesh40 dan disimpan dalam wadah kedap untuk pengujian selanjutnya.

Lampiran 6. Metode Penyiapan Suspensi Sediaan Uji Ekstrak Gambir

Ekstrak gambir diberikan dalam 3 tingkatan dosis, yaitu Dosis-1 65 mg/kg BB, Dosis-2 131 mg/kg BB dan Dosis-3 262 mg/kg BB.

- a) Larutan pembawa adalah 0,5% CMC (karboksi metil selulosa)
- b) Cara pembuatan larutan pembawa: ditimbang sebanyak 0,5 g CMC, dimasukkan ke dalam beaker gelas, ditambah dengan akuades hingga 100 mL. Selanjutnya, dipanaskan sambil diaduk dengan menggunakan magnetik stirer.
- c) Volume pemberian: 1 mL/100 g BB hewan coba
- d) Cara penghitungan suspensi sampel uji untuk Dosis-1 = 65 mg/kg BB

$$65 \text{ mg/kg BB} = 65 \text{ mg}/1000 \text{ g BB} = 6,5 \text{ mg}/100 \text{ g BB}$$

$$\text{Volume pemberian} = 1 \text{ mL}/100 \text{ g BB}$$

$$\text{Untuk 1 ekor tikus (BB 100 g)} = 6,5 \text{ mg}/1 \text{ mL larutan pembawa}$$

$$\text{Untuk 5 ekor tikus} = 6,5 \text{ mg} \times 5 / 1 \times 5 \text{ mL larutan pembawa}$$

$$\text{Untuk 3 hari} = 6,5 \text{ mg} \times 5 \times 3 / 1 \times 5 \times 3 \text{ mL larutan pembawa}$$

$$= 97,5 \text{ mg}/15 \text{ mL larutan pembawa}$$

- Cara pembuatan suspensi sampel uji:
 - a. Ditimbang sebanyak 97,5 mg serbuk gambir, dimasukkan dalam mortar, ditambahkan sebanyak 5 mL larutan 0,5% CMC dan digerus hingga homogen.
 - b. Suspensi dimasukkan ke dalam labu gelas yang sudah ditara (15 mL), di tambahkan larutan 0,5% CMC hingga tanda batas.
 - c. Suspensi di atas di aduk hingga homogen.
 - d. Suspensi siap diberikan pada hewan percobaan. Sisa suspensi disimpan dalam botol tertutup rapat, dimasukkan dalam lemari es suhu 4C dan digunakan untuk pemberian berikutnya.
 - e. Untuk Dosis-2, ditimbang sebanyak 195 mg serbuk gambir dengan volume pembawa 15 mL. Penyiapan sama seperti prosedur a-d diatas.
 - f. Untuk Dosis-3, ditimbang sebanyak 390 mg serbuk gambir dengan volume pembawa 15 mL. Penyiapan sama seperti prosedur a-d diatas.

Lampiran 7. Analisis Sel Inflamasi pada Cairan BAL

1. Cairan BAL diperoleh secara menguras sebanyak 2x dengan 1 mL PBS (pH 7,2) dan menggunakan kanula trakea.
2. Sampel cairan setiap hewan model disimpan dalam es, kemudian disentrifus pada 700 x g selama 5 menit dengan suhu 4⁰C.
3. Endapan sel dimasukkan dalam 50 μ L PBS dan diwarnai dengan Diff-Quik/Cytospin.
4. Jumlah total sel, neutrofil, makrofag dan limfosit dihitung dengan hemositometer.

Lampiran 8. Analisis Kadar TGF- β 1 dalam BAL dengan Metode ELISA

1. Alat dan Bahan

- Mikropipet.
- Mikropipet *multichannel*.
- Mikrotube.
- Sentrifuse.
- Rat TGF- β 1 ELISA Kit (Arigo Biolaboratories).
- Inkubator *microplate*.
- ELISA *reader*.

2. Persiapan Reagen ELISA dan Pembuatan Standar

2.1. Persiapan Reagen

- a) 1 x *Wash buffer* : 15 mL larutan stok *wash buffer* dilarutkan dH₂O sampai volume 300 mL.
- b) 1 x *Antibody conjugate* : Larutkan stok *antibody conjugate concentrate* 30 kali dengan *antibody diluent buffer*, dilarutkan 20 menit sebelum digunakan.
- c) 1 x *HRP-Streptavidin solution* : Larutkan stok *HRP-Streptavidin concentrate solution* 30 kali dengan *HRP-Streptavidin diluent buffer*, dilarutkan 20 menit sebelum digunakan.

2.2. Pembuatan Standar

1. Rekonstitusi stok standar dengan menambahkan 800 μ L *standar diluent buffer* sehingga didapat stok standar dengan konsentrasi 2000 pg/mL.
2. Inkubasi stok standar pada suhu ruang selama 15 menit.
3. Siapkan 7 mikrotube dan masing-masing diisi dengan *standar diluent buffer* sebanyak 250 μ L.
4. Ambil stok standar sebanyak 250 μ L dan campurkan ke tabung pertama yang telah berisi 250 μ L *standar diluent buffer*.
5. Selanjutnya lakukan pengenceran bertingkat, tabung

terakhir dibiarkan sebagai standar 0

3. Prosedur ELISA

1. Semua sampel dan bahan dibiarkan di suhu ruang sebelum memulai prosedur.
2. Sampel berupa cairan BAL disentrifugasi 5000 rpm selama 5 menit pada suhu ruang untuk memisahkan *debris*.
3. Sampel dan standar dimasukkan sebanyak 100 μL ke dalam *well* dan di inkubasi 90 menit pada suhu 37°C.
4. Buang isi *well*, dan cuci 5 kali. 1 kali pencucian dilakukan dengan mengisi *well* dengan 300 μL 1 x *wash buffer* dan didiamkan selama 30 detik.
5. Tambahkan ke masing-masing *well* 100 μL 1 x *antibody conjugate* dan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
6. Buang dan cuci 5 kali.
7. Tambahkan ke masing-masing *well* 100 μL 1 x *HRP-Streptavidin solution*
8. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dalam gelap.
9. Buang dan cuci 5 kali.
10. Tambahkan 100 μL *TMB Reagent* pada tiap *well*, inkubasi 15 menit pada suhu 37°C dalam gelap.
11. Tambahkan 100 μL *stop solution*.
12. Baca serapan di ELISA *reader* pada panjang gelombang $\lambda = 450 \text{ nm}$

4. Analisis Hasil ELISA

Hasil absorbansi pada standar dihitung rata-rata, lalu ditabulasi dan dibuat diagram konsentrasi terhadap absorbansi. Setelah didapat rumus persamaan linier, menggunakan data absorbansi, konsentrasi sampel dapat dihitung.

Lampiran 9. Analisis Kuantitatif dengan Teknik *Image J* pada Pemeriksaan Jaringan Paru dengan Imunohistokimia

Tahap pengukuran persentase luas fibrosis dengan program *Image J*

1. Buka program *Image J*
2. Klik *file* → *open*
3. Klik *image* → *type* → *HSB stock*
4. Pilih warna yang paling kontras diantara ke-3 gambar dengan cara menggeser bar yang ada dibagian bawah gambar.
5. Klik *image* → *adjust* → *threshold*
6. Klik B & W (Kolagen akan tersaji dalam bentuk salur hitam dengan latar belakang putih)
7. Atur *threshold* dengan menggeser bar hingga diperoleh warna hitam-putih yang sesuai dengan gambar aslinya → klik *Set* dan atur *lower threshold level* = 18 ± 2 dan *upper threshold level* = 0. Saat mengatur *threshold* dilakukan perbandingan dengan gambar asli.
8. Bersihkan bagian yang mengganggu → klik *image* → *color* → *color picker* (akan muncul sederetan warna, pilih warna yang sesuai dengan warna latar belakang yaitu putih dengan mengklik kedua bagian kotak (F dan B) hingga berwarna putih)
9. Lakukan penghilangan bagian yang tidak diinginkan dengan menggunakan *freehand selection tool*.
10. Klik *apply*
11. Klik *analyze* → *set measurement* → klik kotak *area*, *area fraction*, *limit to threshold* dan *display label*.
12. Klik *analyze* → *measure*
13. Hasil akan keluar dalam bentuk tabel
14. Simpan tabel dan gambar yang telah diolah

Tahapan pengukuran ekspresi TIMP-1 dan kolagen I dengan *ImageJ*

1. Buka program *Image J*
2. Klik *file* → *open*
3. Klik *image* → *type* → *RGB stock*

4. Pilih warna yang paling kontras diantara ke-3 gambar dengan cara menggeser bar yang ada dibagian bawah gambar.
5. Klik *image* → *adjust* → *threshold*.
6. Atur *threshold* pada posisi *auto* kemudian pastikan posisi nilai *threshold* dengan menggeser *bar* hingga posisi *lower threshold level* = 103-105 dan *upper threshold level* = 0. Saat mengatur *threshold* dilakukan dengan membandingkan dengan gambar asli
7. Bersihkan bagian yang mengganggu → klik *image* → *color* → *color picker*.
8. Lakukan penghilangan bagian yang tidak diinginkan dengan menggunakan *freehand selection tool*.
9. Klik *apply*.
10. Klik *analyze* → *measurement*.
11. Hasil akan keluar dalam bentuk tabel.
12. Simpan tabel dan gambar yang telah diolah.

Lampiran 10. Pemeriksaan Kadar NF- κ B dengan Metode ELISA

1. Alat dan Bahan

- Mikropipet.
- Mikropipet *multichannel*.
- Mikrotube.
- Mikropestle.
- Neraca analitik.
- *Homogenizer*.
- Sentrifuse.
- NF- κ B p65 ELISA Kit.
- ELISA *reader*.

2. Homogenisasi Jaringan

1. Jaringan ditimbang sebanyak 100 mg ke dalam mikrotube.
2. Kedalam mikrotube ditambahkan PBS pH 7.4 0.1 M sebanyak 1000 μ L.
3. Jaringan dihancurkan menggunakan homogenizer dan mikropestle.
4. Sentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 10000 \times *g*.
5. Supernatan diambil dan dipindahkan ke mikrotube baru, lalu disimpan dalam kulkas suhu -20°C.

3. Persiapan Reagen ELISA dan Pembuatan Standar

3.1. Persiapan Reagen

- a) **Satu kali Wash buffer:** 15 mL larutan stok *wash buffer* dilarutkan dH₂O sampai volume 150 mL.
- b) **Antibody cocktail:** campurkan 3 mL *Capture antibody* dan 3 mL *Detector anti- body*.

3.2. Pembuatan standar

1. NF- κ B p65 *Control lysate* direkonstitusi dengan menambahkan 250 μ L dH₂O, dicampur, lalu diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang. Ini adalah stok standar.
2. Mikrotube selanjutnya disiapkan dan diberi label no. 1 sampai 8.
3. Satu kali *Cell extraction buffer PTR* dimasukkan ke masing-masing tabung sebanyak 125 μ L.
4. Dari tabung stok diambil sebanyak 125 μ L dan dimasukkan ke tabung no. 1 lalu dicampur perlahan.
5. Dari tabung no. 1 diambil 125 μ L dan dimasukkan ke tabung no. 2, lalu dicampur perlahan. Pengenceran bertingkat ini dilanjutkan terus sampai tabung no. 7.
6. Tabung no. 8 dibiarkan sebagai *blank*.

4. Prosedur ELISA

1. Standar dan sampel yang sudah berupa homogenat dimasukkan ke dalam *well* mikroplate sebanyak 50 μ L.
2. *Antibody cocktail* dimasukkan ke dalam *well* sebanyak 50 μ L.
3. Mikroplate diinkubasi dalam gelap selama 1 jam pada suhu ruang.
4. Setelah inkubasi, semua larutan di dalam *well* mikroplate dibuang.
5. *Well* dicuci dengan 1 x *Wash buffer PT* sebanyak 3 kali. Masing-masing 300 μ L.

6. Substrat TMB dimasukkan ke dalam *well* sebanyak 100 μL .
7. Inkubasi dalam gelap pada suhu ruang selama 15 menit.
8. Setelah inkubasi langsung *Stop solution* dimasukkan sebanyak 100 μL .
9. *Shake* selama 1 menit pada suhu ruang.
10. Hasil dibaca di ELISA *reader* pada $\lambda = 450\text{nm}$.

5. Analisis hasil ELISA

Hasil absorbansi pada standar dihitung rata-rata, lalu ditabulasi dan dibuat diagram konsentrasi terhadap absorbansi. Setelah didapat rumus persamaan linier, menggunakan data absorbansi, konsentrasi sampel dapat dihitung.

Lampiran 11. Pemeriksaan Ekspresi Protein NF- κ B dengan Metode *Western Blott*

1. Jaringan paru lobus tengah disimpan pada suhu -80°C
2. Jaringan paru kemudian dihomogenisasi dalam PBS yang mengandung inhibitor protease.
3. Setelah homogen, disentrifus selama 15 menit, 14000 rpm pada suhu 4°C
4. Supernatan jaringan paru dikumpulkan dan konsentrasi protein setiap sampel diukur dengan *bicinchoninic acid assay kit*, dengan menggunakan BSA sebagai standard
5. Sejumlah protein sebesar 150 μg dari setiap sampel dilarutkan dalam 10% *Tris-glycine SDS polyacrylamide gel*.
6. *Protein bands* dipindahkan ke membrane nitrocellulose. Setelah inkubasi selama 1 jam dalam cairan (5% susu kering dan *Tris buffered saline-Tween 20*) pada suhu kamar, membran diinkubasi selama 24 jam dengan anti TGF- β 1 . Antibodi sekunder ditambahkan pada 1 : 10.000 *dilution* dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam.

I. Spesimen

Protein hasil ekspresi atau hasil purifikasi. Protein pada lisat kultur sel atau jaringan

II. Prinsip :

Blotting protein merupakan teknik untuk memindahkan protein ke membrane fassa solid. Teknik tersebut telah menjadi teknik yang dikenal luas untuk visualisasi dan identifikasi protein. Saat protein telah terikat pada membrane, maka menjadi lebih mudah untuk dilakukan analisis imunologi atau biokimia, pewarnaan kuantitatif, atau melihat interaksi protein-protein atau protein-ligan. Blotting protein memiliki dua proses yang utama, yaitu transfer dan deteksi. Proses transfer melibatkan pemindahan protein dari larutan atau gel ke membrane sintetik. Transfer dapat dilakukan secara langsung atau dot-blotting protein yang berada didalam larutan, atau dengan transfer elektroforesis protein dari gel ke membrane.

III. Cara Kerja

1. Lakukan SDS-PAGE terhadap antigen/sampel yang akan di western blot (lihat SOP SDS-PAGE)
2. Bahan-bahan yang diperlukan :
 - Transfer buffer (Tris, Glycin, Methanol) sebanyak 800 ml untuk *wet transfer* atau 30 ml untuk *semi-dry transfer*
 - PBS-Tween 0,05% (untuk washing solution)
 - 5% blocking grade buffer (susu skim) dalam PBS-Tween 0,05% (untuk blocking solution)
 - 0,25% Blocking grade buffer (susu skim) dalam PBS-tween 0,05% (antibody dilution)
3. Potong membran selulosa dengan ukuran 8x7 cm, buat garis batas umur elektroporesis pada membran dengan menggunakan pensil
4. Gel sandwich disiapkan
 - (i) Wet transfer
 - a. Letakkan cassette dengan sisi hitam pada bagian bawah di atas permukaan yang bersih
 - b. Letakkan fiber pad yang telah dibasahi dengan transfer di atas sisi hitam cassette
 - c. Letakkan 6 lembar kertas saring (9x8 cm) yang telah dibasahi dengan transfer buffer diatas fiber pad
 - d. Letakkan gel SDS-PAGE di atas kertas saring
 - e. Letakkan membrane selulosa yang telah dibasahi dengan transfer buffer di atas kertas saring
 - f. Letakkan kembali 6 lembar kertas saring yang telah dibasahi dengan transfer buffer diatas membrane selulosa
 - g. Letakkan fiber pad yang telah dibasahi dengan transfer buffer di kertas saring
 - h. Tutup cassette dengan rapat, pastikan tidak ada gelembung udara yang terperangkap di antara membran, gel, dan kertas saring
 - i. Letakkan cassette pada modul

- (ii) Semi-dry transfer
 - a. Letakkan 6 lembar kertas saring (9x8 cm) (thin blot paper) yang telah dibasahi dengan transfer buffer diatas ‘anode plate assembly’
 - b. Letakkan membrane selulosa yang telah dibasahi dengan transfer buffer
 - c. Letakkan gel SDS-PAGE di atas membrane
 - d. Letakkan kembali 6 lembar kertas saring yang telah dibasahi dengan transfer buffer di atas gel SDS-PAGE
 - e. Pastikan tidak ada gelembung udara yang terperangkap diantara membrane, gel, dan kertas saring
 - f. Letakkan ‘Cathode plate assembly’ dan ‘Safety Lid’
5. Masukkan modul dan cooling unit ke dalam tangki elektroporesis. Isi dengan transfer buffer yang telah didinginkan terlebih dahulu
6. Transfer dilakukan selama 4 jam dengan voltase 14 volt untuk *wet transfer* atau selama 30 menit dengan voltase 20-25 Volt untuk *semi-dry transfer*
7. Setelah proses transfer selesai dilakukan, letakkan membrane di dalam wadah yang telah dibersihkan dengan alkohol 70%
8. Warnai membrane dengan ponceau, potong membrane sesuai dengan ukuran, letakkan di wadah western blot
9. Cuci membrane hingga bersih dengan 1X PBS-Tween 0,05%
10. Blocking membrane dengan 2 ml 5% Blocking grade buffer. Inkubasi pada suhu ruang selama 1 jam dishaker atau overnight pada suhu 4 derajat Celcius
11. Cuci membran dengan 2 ml 1X PBS-Tween 0,05% sebanyak 3x masing-masing selama 5 menit
12. Masukkan 2 ml antibody pertama (dilarutkan dalam 0,25% blocking grade buffer). Inkubasi pada suhu ruang selama 1 jam dishaker atau overnight pada suhu 4 derajat C.
13. Cuci membran dengan 2 ml 1X PBS-Tween 0,05% sebanyak 3x masing-masing selama 5 menit

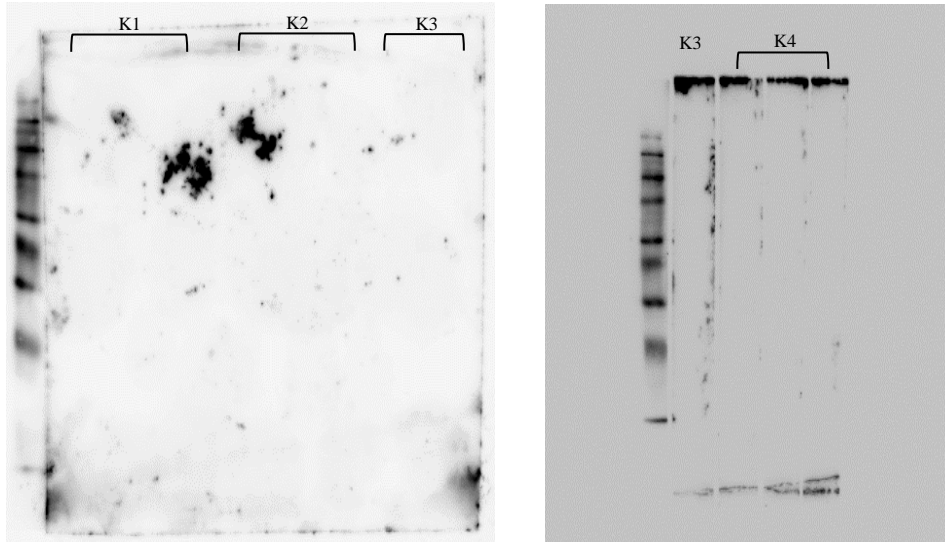
14. Masukkan 2 ml antibody pertama (dilarutkan dalam 0,25% blocking grade buffer). Inkubasi pada suhu ruang selama 1 jam dishaker atau overnight pada suhu 4 derajat C.
15. Cuci membran dengan 2 ml 1X PBS-Tween 0,05% sebanyak 3x masing-masing selama 5 menit
16. Masukkan 2 ml streptavidin-HRP (dilarutkan dalam PBS-Tween 0,05%). Inkubasi pada suhu ruang selama 1 jam dishaker atau overnight pada suhu 4 derajat C.
17. Cuci membran dengan 2 ml 1X PBS-Tween 0,05% sebanyak 3x masing-masing selama 5 menit
18. Siapkan substrat :
 - a. Chemiluminescence dengan menambahkan reagen imunstar (Biorad) dengan perbandingan 1:1. Letakkan membrane di atas plastik selofan (ukuran 9x10 cm), tetesi permukaan membran dengan substrat dan tutup kembali dengan plastik selofan. Inkubasi selama 1 menit dalam kondisi gelap
 - b. Chromogenic dengan menambahkan DAB substrat : buffer perbandingan 1 : 9. Teteskan substrat ke permukaan membrane pada well tray. Inkubasi selama 5-15 menit. Lalu hentikan reaksi dengan mengganti substrat dengan air steril.
19. Lakukan deteksi dan imaging dengan mesin imageQuant LAS 4000 GE Healthcare.

IV. Jaminan Kualitas

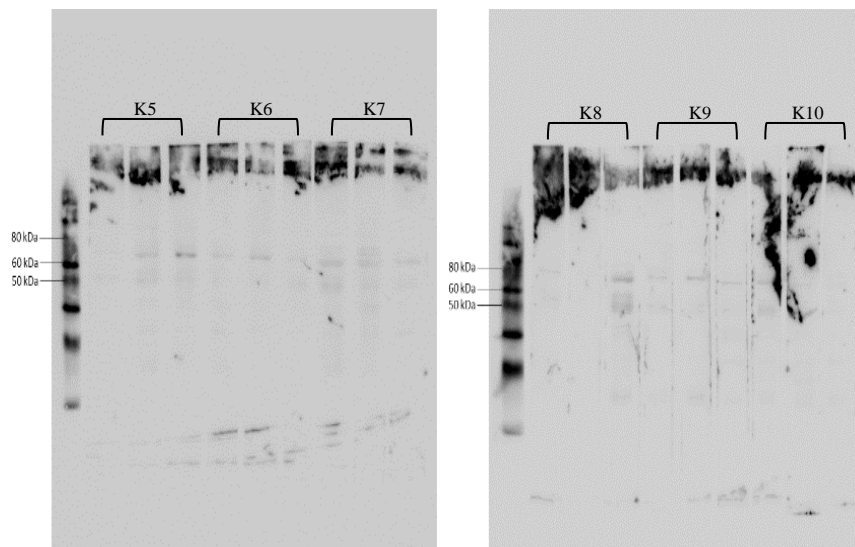
- Selalu menggunakan sarung tangan
- Transfer buffer harus dingin dan baru
- Blocking grade buffer (susu skim) yang dilarutkan dalam PBS-Tween 0,05% harus baru
- Deteksi membran dengan pewarnaan ponceau S setelah proses transfer selesai dilakukan, jika tidak terlihat ada pita protein maka hentikan proses
- western blot

- Konsentrasi antibodi pertama dan kedua serta streptavidin-HRP yang akan digunakan diperoleh dari referensi

- Tampilan *Western Blott* pada Kelompok Pembanding positif



- Tampilan *Western Blott* pada Kelompok Gambar



DRAFT MANUSCRIPT

**In Vitro Assay and Study Interaction of *Uncaria gambir* (Hunter)
Roxb. as Anti-fibrotic Activity Against A549 Cell Line**

Desdiani Desdiani¹, Iris Rengganis², Samsuridjal Djauzi², Agus Setiyono³,
Mohamad Sadikin⁴, Sri Widia A. Jusman⁴, Nuryati Chairani Siregar⁵, Suradi⁶, Putri
C. Eyanoe⁷

¹Doctoral Degree Student of Faculty of Medicine, University of Indonesia
Faculty of Medicine, University of Sultan Ageng Tirtayasa, Cilegon, Banten,
Indonesia

²Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Indonesia,
Jakarta, Indonesia

³Faculty of Veterinary Medicine IPB, Bogor, Indonesia

⁴Department Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University
of Indonesia, Depok, Indonesia

⁵Department Anatomical Pathology, Faculty of medicine, University of Indonesia,
Jakarta, Indonesia

⁶Department of Pulmonology and Respiratory Medicine, Faculty of medicine,
University of Sebelas Maret, Surakarta, Indonesia

⁷Department of Community Medicine, Faculty of Medicine, University of Sumatera
Utara, Medan, Indonesia

Further communication about the manuscript should be directed to :

Desdiani, Faculty of Medicine, University of Sultan Ageng Tirtayasa, Cilegon,
Banten, Indonesia.

Jalan Jendral Sudirman Km 03 Cilegon, Banten, Indonesia 42435

Phone : (+62-254) 280330; Fax: (+62-254) 281254

Mobile Phone : +62 87878000671

E-mail : desdianimuchlis@gmail.com

Address reprint requests to :

Desdiani, Faculty of Medicine, University of Sultan Ageng Tirtayasa, Cilegon,
Banten, Indonesia.

Jalan Jendral Sudirman Km 03 Cilegon, Banten, Indonesia 42435

E-mail : desdianimuchlis@gmail.com

ABSTRACT

Gambiriin A and B one of the main components of *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. Fruit (65-85%), is known to possess various medicinal properties like enhancing anti fibrosis. Fibrosis ultimately results in cirrhosis and complications such as portal hypertension, liver failure, hepatocellular carcinoma. The objective of this work was to elucidate the biological properties ethanol extract of *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. fruit at molecular level using an integrated in silico and in vitro approaches. The results from docking analysis observed that compounds from gambir fruit contain anti-fibrotic activity which act by inhibiting DNA transcription of NF- κ B and TGF- β 1 receptors. The compound Procyanidin B3, an essential amino acid, contains a hydrogen bond with the greatest NF- κ B inhibitory activity on Gly214 and Lys337. Compounds from *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. can be an inhibitor to TGF β 1, all the compounds are on the active site of TGF β 1, and use native ligand which is an inhibitor of TGF β 1 (Naphtyridine). The positive compound catechin has the highest inhibitory activity. Gambiriin B1 and Gambiriin A2 are the most identical compounds with similar affinity binding value. *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. is already a proven anti fibrosis which is further confirmed by (IC50: $19,255 \pm 1.08 \mu\text{g/ml}$, $p < 0.05$) in A549 cell line. The results demonstrated that Gambirin have cytotoxic effects and was found anti Fibrosis by MTT assay.

Keywords: gambiriin compounds, inhibitor of p50 NF- κ B, TGF- β 1 receptors, pulmonary fibrosis, molecular docking

INTRODUCTION

Pulmonary fibrosis is a condition of scar tissue formation that involves infiltration of inflammatory cells, fibroblasts proliferation, reactive oxygen species (ROS), and excessive accumulation of extracellular matrices to the pulmonary parenchymal tissues and can cause dysfunction to pulmonary function.^{1,2} The appropriate treatment for pulmonary fibrosis is still a challenge. The use of chemical substances effective for pulmonary fibrosis treatment does not always provide consistent significant results due to adverse events.³ Several methods to prevent and reduce pulmonary fibrosis have been widely conducted using drugs that interact with TGF β and have the potential to activate anti-fibrosis. The drugs were tranilast (inhibit the activity and secretion of TGF β), losartan (TGF β induction blockade), PPAR- γ agonists (damaging Smad3 signal transduction), pirfenidone (inhibit the production of TGF β), and halofuginone.³ The effectivity limitations of these chemical substances in overcoming pulmonary fibrosis lead to the utilization of natural ingredients as an alternative.

Anti-fibrotic drugs such as Pyfenidone were developed for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. Because fibroblast activities in inflammatory conditions have the same characteristics as cancer-related fibroblasts that actively

contribute to phenotype, the search for anti-fibrotic drugs can be through a repurposed approach as an anti-cancer drug⁴. Furthermore, it has been shown that drug such as pirfenidone can inhibits proliferation, and epithelial-mesenchymal transition of a human epithelial cell line⁵, disrupted tumor-stromal interactions in pancreatic cancer⁶, and inhibited TGF β 1 induced overexpression of collagen type I in A549 cells⁷.

TGF- β is involved in pulmonary fibrosis promoting progression by both autocrine and paracrine mechanisms [8]. Studies in adenovirus transfected or transgenic revealed that TGF- β contributed to HSC activation and fibrotic damage, and that blocking TGF- β signalling inhibited the fibrotic process [9][10]. TGF- β 1/Smads signalling is required for fibrosis [11].

However, there is lack in studies addressing the exact molecular mechanism behind this effect, which is a common challenge in the natural products research [12]. Therefore, molecular docking studies can explain the interactions between phytochemicals and the molecular targets, which could be a successful approach to develop new drugs [13].

Gambir or *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. is a specific local plant in South East Asia, especially Indonesia and Malaysia. Gambir contains polyphenol substances with its main component of flavonoid (+)-catechin comprises of 40-80% dry extract weight, and (-)-epicatechin 1.5%, procyanidin B1, procyanidin B3, and gambirinin each comprises of 1%. The most commonly used chemical substance of gambir is catechin and tannin, which is the polymer form of catechin [14]. Gambir has antioxidant properties, can inhibit the activation of NF κ B by suppressing the formation of collagen, TIMP-1 through *in vivo* fibrolysis, and fibropreventive mechanism in the liver [15]. The main component of Gambir is a flavonoid (+)-catechin, which comprises of 40-80% of dried sap and had been proven to have a strong antioxidant activity, almost comparable to vitamin C *in vitro*, and inhibits the activation of NF κ B *in vivo*. Thus, enables its role as anti-fibrotic therapy in the lungs and pleura [16].

Structure-based drug design (SBDD) is a chemical computation method which utilizes the information from target protein structures to determine protein active site that bonds with substances. Based on the active site prediction, the expected substance can be designed to attach with the target protein and provide biological activity. Using the information of target structure and ligand physicochemical property, screening of interaction between known active substances (ligand) on the prediction of protein active site can be performed. Based on the obtained information, this new substance design is expected to be more potent than the available substances. One of the commonly used SBDD methods is molecular docking [17].

In silico examination there is a term for an experiment or an exam conducted by a computer simulation method. The in silico test has become a method used to initiate the discovery of new compounds and to increase efficiency in optimizing the activity of parent compounds. The purpose of psycho exams is to predict, give hypotheses, make new discoveries or new advances in medicine and therapy. One of the in silico tests was carried out by the molecular docking method of a prospective compound of a drug compound with the selected receptor. Docking is an attempt to align between ligands which are small molecules into receptors which are large protein molecules, by paying attention to the properties of both [18]. This study conducted *in silico* testing of the molecular docking method of binding affinity results of molecular docking and the interaction of amino acids on the binding site with substances in the gambir plant was analyzed to determine its potential as a herbal-based therapy candidate for liver fibrosis.

RESULTS AND DISCUSSION

In silico pharmacokinetic properties and toxicities were predicted using ADME property explorer using DruLiTo is an open source virtual screening tool [19]. It's calculation is based on the various druglikeness rules like Lipinski's rule. druglikeness rules like Lipinski's rule were predicted of chemical constituents from extract of gambir analysis by online software at http://www.niper.gov.in/pi_dev_tools/DruLiToWeb/DruLiTo_index.html. Results of ADME analysis are shown in Table 1.

Table 1. druglikeness Lipinski's rule of chemical constituents of *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb

Compounds name	Molecular Weight g/mol	TPSA A ²	LogP	Lipinski
(+)-Catechin	322.74	86.99	1.70	Y
Epigallocatechin gallate	299.32	81.78	2.33	Y
(+)-Epicatechin	285.29	92.78	1.64	Y
Gambiriin A1	316.31	96.22	2.66	Y
Gambiriin A2	368.77	116.45	2.33	Y
Gambiriin B1	344.36	85.22	3.20	Y
Gambiriin B2				Y
Gambiriin C				Y
Procyanidin B1				Y
Procyanidin B3				Y

Druglikeness can be estimated for any molecule, and does not evaluate the actual specific effect that the drug achieves ([biological activity](#)). Simple rules are not always accurate and may unnecessarily limit the chemical space to search: many best-selling drugs have features that cause them to score low on various druglikeness indices.⁷ It is estimated from the molecular structure before the substance is even synthesized and tested. A druglike molecule has properties such as Solubility in both water and fat, Potency at the [biological target](#), and [Ligand efficiency](#) and [lipophilic efficiency](#) [20]

Docking is an attempt to align between ligands which are small molecules into receptors which are large protein molecules, by paying attention to the properties of both. Result of docking approach with ligand from gambir extract with **NF- κ B p50 and TGF- β 1** in above

1. Substance docking with NF- κ B p50

All substances studied were tethered to the binding site of the receptor (ID PDB: 1SVC) using AutodockVina. The grids were prepared for each protein with a similar center and border-box size set at 0.375 Å distance, with a grid box size of 60 x 60 x 60. The grid center coordinate was (x = 37.569; y = 24.716; z = 38.430) (Fig.1).



Figure 1. 3D structure of NF- κ B p50 homodimer (PDB ID: 1SVC)

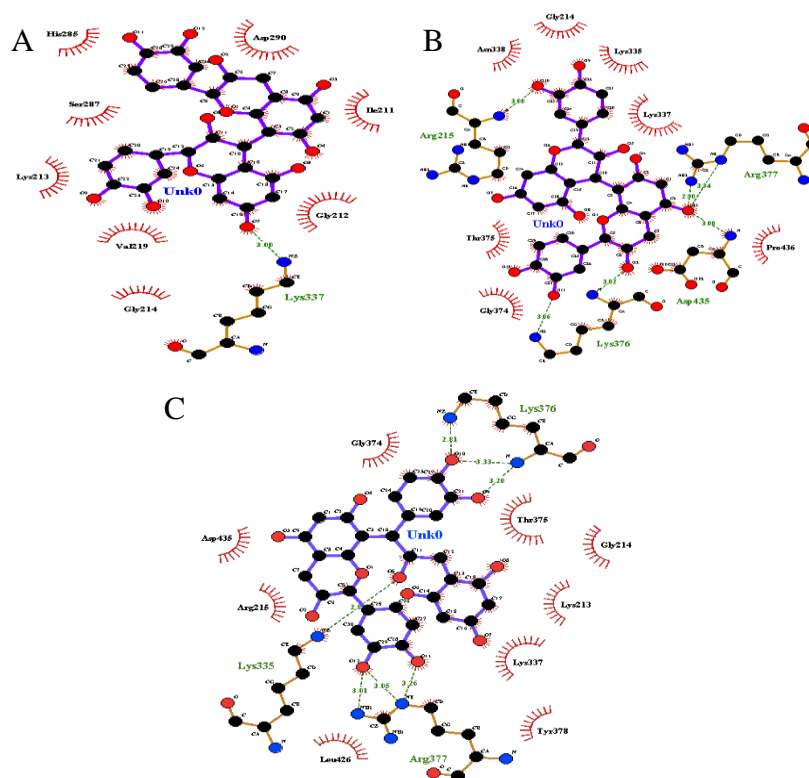


Figure 2. 2D interaction between substances and amino acid residues (A: procyanidin B3, B: procyanidin B1, C: gambiririn A1)

NF- κ B is the regulation center of the stress response, activated by various stress conditions, including physical and oxidative stress. From the docking results, the substances acted in DNA transcription inhibition of NF- κ B. Based on molecular docking results, three compounds from gambir plant: gambiririn A1, procyanidin B1 and procyanidin B3 have the best binding affinity score -8.4; -8.4; and -8.6 kcal/mol (Table 1). Procyanidin B3 had a hydrogen bond with the highest inhibitory activity (Fig. 2). Residuals interacted with Procyanidin B3, Procyanidin B1 and Gambiririn A1 ligands were in the IPT domain of NF- κ B transcription factor (251-352), GRR area (374-396), and interaction domain of CFLAR/CASP8 and FADD-like apoptosis regulator (437-970). These three ligands had similar amino acid bonding on Gly214 and Lys337. The three ligands in successive order were Procyanidin B3, Procyanidin B1, and Gambiririn A1 had 9, 11, and 12 interactions with amino acid residue (Table 2). This showed that even though Procyanidin B3 had the fewest amino acid interaction, the interacting amino acid was an essential amino acid important to determine the binding affinity. The interaction of substances in the Gambir plant is expected to inhibit the transcription of NF- κ B.

2. Docking of substance with TGF- β 1

All substances were attached to the receptor binding site (PDB ID: 1VJY) using AutodockVina. The grids were prepared for each protein with a similar center and

border-box size determined at 0.375 Å distance with a grid box size of 40 x 40 x 40. The grid center coordinate was (x = 14.129; y = 67.092; z = 5.249) (Fig. 3).

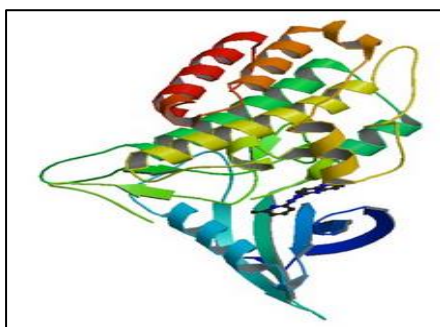


Figure 3. 3D structure of TGF-β1 (PDB ID: 1VJY)

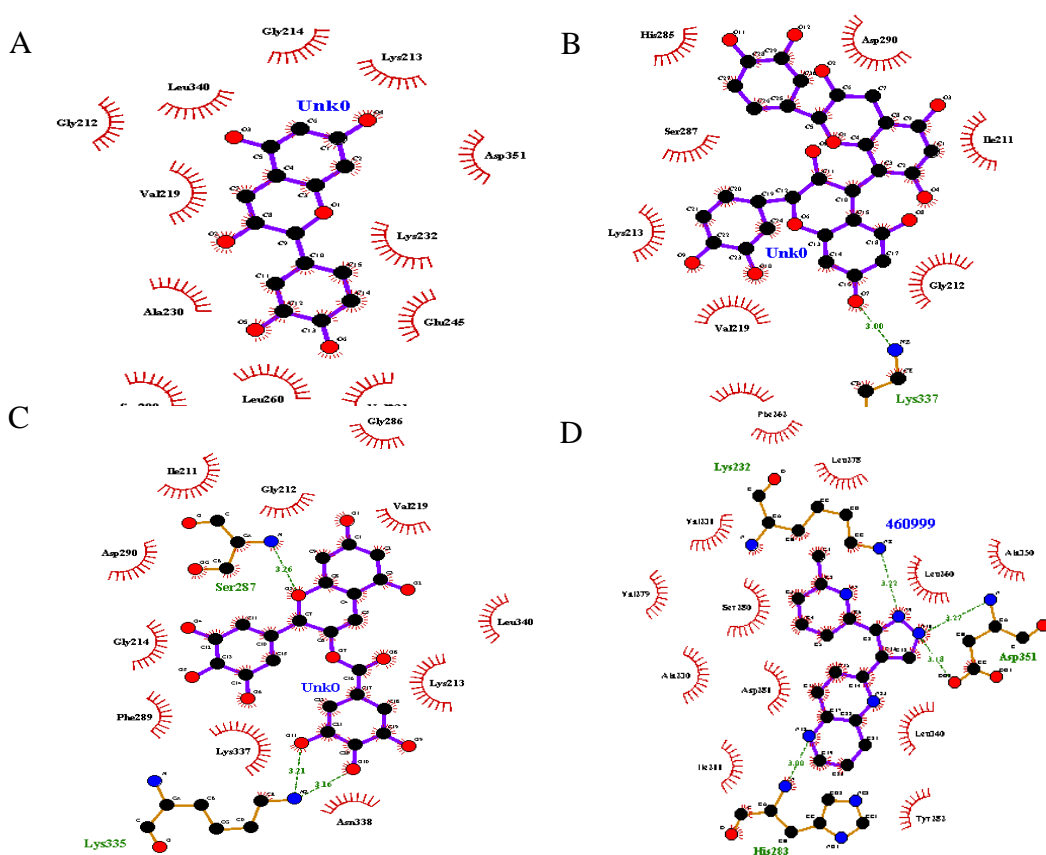


Figure 4. 2D interaction between substances with amino acid residues (A: catechin, B: procyanidin B3, C: epigallocatechin gallate, D: native ligand)

From the results of the docking, the substances in the Gambir plant can be TGFβR1 inhibitors. Three compounds from gambir such as catechin, epigallocatechin gallate and procyanidin B3 showed best binding affinity score -9.4; -9.0 and -9.3 kcal/mol (Table 3). From the analysis result of ligand-receptor, all substances were in the

active site of TGFBR1 (211..215, 219, 230, 232, 260, 280, 283, 287, 289, 333, 335, 337, 338, 340, 351, 354, 374..377), as well as the native ligand, which was a TGFBR-1 inhibitor (Naphthyridine). The high inhibitory activity of (+)-catechin can be caused by interaction similarity between native ligand, which was not seen in other substances, i.e. at 230, 232, 260, 280, 340, 351. The amino acid residual interactions of (+)-catechin, Procyanidin B3, and (+)-Epigallocatechin gallate were 13, 9, and 12, respectively (Table 4). Seen from the amino acid interaction mapping between (+)-catechin ligand with the native ligand, the binding affinity value was inferior to native ligand due to several interactions that had no hydrogen bond (Fig. 4).

HepG2 MTT Assay

Viability and Characterization of Cell lines A549 lung fibrosis used in the MTT test. The cytotoxicity activity of the ethanolic extract of *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. was carried out by using MTT assay with different concentration on A459 cell lines. Results of anticancer activity on A459 are shown in Table 2.

Antifibrosis inhibitors and agents, commonly fibroblasts in inflammatory conditions agents are used in management of tumor growth factors (e.g., vascular endothelial-derived growth factor, transforming growth factor beta (TGF β), hepatocyte growth factor, epidermal growth factor, and fibroblast growth factor. The ethanolic extract of *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. shows the concentration dependent inhibition. The ethanolic extract of *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb was found to have strong inhibitory activity (IC₅₀ 19,255 \pm 1.08 μ g/ml) while, considering the standard drug cisplatin (1,02121E-06 \pm 0.03 μ g/ml) (Fig. 5) with R 0,9178 and 0,9373 respectively. In consequence, the IC₅₀ of ethanolic extract of *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb extracts might be due to the presence of phenols, phenolic total.

Table 2. IC₅₀ value of ethanolic extract of *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb with A549 cell line

Concentration	Log concentration	Absorbance	%inhibition	Ic50	Absorbance	%inhibition	Ic50
		Standart Cisplatin			ethanolic extract of <i>Uncaria gambir</i>		
1,5625	0,19382002	0,159	77,69985975	1,02121E-06 \pm 0.03	0,459	-	19,255 \pm 1.08 μ g/ml
3,125	0,49485002	0,145	79,61664329		0,624	12,4824684	
6,25	0,79588001	0,125	82,42169238		0,355	-	
12,5	1,09691001	0,121	82,9827022		0,321	54,9789621	
50	1,69897000	0,100	86,02150538		0,266	62,6928471	

100	2	0,101	85,8345021	0,133	81,3464235
200	2,30102999	0,121	-	0,125	82,5151940
	Control	0,713		0,713	

IC₅₀ value less than 100 is considered as an active extract with anticancer activity. As shown in Table 2, ethanolic extract of *Uncaria gambir* have IC₅₀ value lower than 100 µg/mL, that is assigned as active extract. ethanol extracts showed strong anticancer activity with Thus. Consistent and agree with the computational *in silico* molecular docking the substances in the Gambir plant can be TGFβR1 inhibitors. Three compounds from gambir such as catechin, epigallocatechin gallate and procyanidin B3 showed best binding affinity score -9.4; -9.0 and -9.3 kcal/mol respectively and compare with IC₅₀ value of 19,255 ± 1.08 µg/ml. This result indicates that ethanol extract of *Uncaria gambir* potential to be developed as an anti fibrosis drug assessment, ethanol extract of *Uncaria gambir* presence of polyphenols (56.4 + 6.47 mg eq. QE/g Ext), demonstrated the greater anticancer activity than the other extract on A549 lung cancer cells.

EXPERIMENTAL SECTION

Computational methods

All computational studies to perform the *in silico* experiments were carried out using MacBook Air with operating system Mac OS High Sierra 10.13.3, processor Intel Core i5 1.8GHz, RAM 8 GB, 1600 MHz DDR3. Marvin Sketch to draw ligand structure in 2 and 3 dimensions. AutoDockVina for docking process. AutoDockTools for docking result analysis and 3D visualization of the ligand-receptor complex. LigPlus for analysis of residual amino acids of the ligand-receptor complex in 2D.

Druglikeness

DruLiTo is open source software to can calculate different molecular properties and screen the molecules based on drug likeness rules using 'The Lipinski rule of five' (Lipinski 2004)²¹

Protein preparation

Structures of protein targets (+)-Catechin. Epigallocatechin gallate, (+)-Epicatechin, Gambiriin A1, Gambiriin A2, Gambiriin B1, Gambiriin B2, Gambiriin C, Procyanidin B1, Procyanidin B3.

Receptor preparation

Download receptor from www.rcsb.org in .pdb format. Separate chain receptor and ligand. Eliminate water using delete water in Autodock software. Add hydrogen atom (polar only) and merge non-polar. Add Gasteiger charges on the receptor. Save file in .pdbqt.

Ligand preparation

Separate the original PDB ligand from a receptor-ligand complex (specific to ligands from receptor-ligand PDB complex). Draw 17 substances in .pdb format using Marvin Sketch.

Docking method validation

Conduct docking on PDB ligand using the optimization of grid box size and center grid position. Choose the optimal size of the grid box and grid center by determining the result of docking.

Docking and Docking Result Analysis

Make 1 folder containing protein and ligand in .pdbqt format. Configure docking (protein file name, ligand file name, grid box coordinate, grid box size, output file name, and model numbers produced) Implement docking using AutodockVina through the Terminal. The best docking model from docking file output (.pdbqt) was separated using vina_split. Analysis and visualization of the ligand-receptor complex through Ligplus [22].

Preparation of Extract: The fresh fruits of *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb were washed under running water and shade dried. Finely powdered by mechanical grinder and extracted with 90% ethanol by maseration maintaining at room temperature 3 x 24 hours. Evaporated the solvent by rotary evaporator and brownish gummy exudates were obtained ²³. The crude *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb extract was used for cytotoxicity properties. The fraction yield of extract *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb was calculated by using the formula.

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{weight of crude extract}}{\text{weight of raw material}} \times 100$$

The fraction yield of ethanolic extract of *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb was found to be 7.15% w/w.

Total Phenol Content: The estimation of the total phenol content was done by using folin ciocalteu reagent method. 2.5ml of saturated Na₂CO₃ was added to the pre incubated 0.5ml of EOEt extract with 0.1ml of folin ciocalteu reagent (0.5N) for 15min in optimum temperature. Measure the absorbance at 760nm using quercetin as standard ²⁴. The total phenol content was uttered as standard equivalent (mg/g).

Total Flavonoid Content: The total flavonoid content was estimated by using Aluminum chloride method ²⁵. The mixture (3.0ml) contains 1.0ml extract of *Uncaria gambir*, 0.5ml of aluminum chloride (1.2%) and 0.5 ml of 120 mM potassium acetate were pre-incubated in room temperature for 30 min and at 415

nm the absorbance was measured using catechin as standard. The total flavonoid content was uttered in terms of standard equivalent (mg/g).

HepG2 MTT Assay

Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) supplemented with 10% FBS; DMEM and RPMI1640 are also alternatives that work well. Aspirate and add fresh culture medium every 2-3 days. A549 cell doubling time is 48 hours. To passage cells, rinse cell monolayer with 1x PBS twice and add pre-warmed (37°C) 0.05% Trypsin-EDTA solution to cover the bottom of the flask; incubate for 5 – 7 minutes. As cells detach, neutralize the Trypsin by adding 4x volume of complete growth medium with 10% FBS and gently resuspend the cells by pipetting

To avoid clumping do not agitate the cells by shaking the flask while waiting for detachment

Split cells 1:4 every 3 days or 1:8 every 6 days. Cultures should be incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. If cells are difficult to detach the suggestions are cell-to-cell junctions are tight due to cell growth being 100% confluent and dissociation agent cannot reach cell interface; subculture cells before confluent. Use higher concentration of dissociation agent; incubate flask at 37°C to increase enzymatic activity. Wash flask twice with sterile 1x PBS prior to addition of the dissociation agent.

CONCLUSION

Molecular docking simulation of gambir compounds to discover its anti-fibrotic activity has been done to explore its potential for inhibiting DNA transcription of NF- κ B, TGF- β 1 receptors. Three compounds from gambir such as catechin, epigallocatechin gallate and procyanidin B3 showed best binding affinity score -9.4; -9.0 and -9.3 kcal/mol respectively and compere with IC₅₀ value of 19,255 \pm 1.08 μ g/ml. This result indicates that ethanol extract of *Uncaria gambir* potential to be developed as an anti fibrosis drug assessment, ethanol extract of *Uncaria gambir* presence of polyphenols (56.4 + 6.47 mg eq. QE/g Ext), demonstrated the greater anticancer activity than the other extract on A549 lung cancer cells.

REFERENCES

1. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest [Internet]. 2005 Feb 1;115(2):209–18. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/24282>
2. Yao X-X. Current research of hepatic cirrhosis in China. World J Gastroenterol [Internet]. 2005;11(5):617. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v11/i5/617.htm>
3. Xu R, Zhang Z, Wang F-S. Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated

- liver injury. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2012 Jul 12;9(4):296–301. Available from: <http://www.nature.com/articles/cmi201153>
4. 4. Mediavilla-Varela, M., Boateng, K., Noyes, D. *et al.* The anti-fibrotic agent pirfenidone synergizes with cisplatin in killing tumor cells and cancer-associated fibroblasts. *BMC Cancer* **16**, 176 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2162-z>
 5. Kozono S, Ohuchida K, Eguchi D, Ikenaga N, Fujiwara K, Cui L, et al. Pirfenidone inhibits pancreatic cancer desmoplasia by regulating stellate cells. *Cancer Res.* 2013;73:2345–56.
 6. Yang Y, Ye Y, Lin X, Wu K, Yu M. Inhibition of pirfenidone on TGF-beta2 induced proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition of human lens epithelial cells line SRA01/04. *PLoS One.* 2013;8:e56837.
 7. Hisatomi K, Mukae H, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Kakugawa T, Hara S, et al. Pirfenidone inhibits TGF-beta1-induced over-expression of collagen type I and heat shock protein 47 in A549 cells. *BMC Pulmonary Med.* 2012;12:24.
 8. Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, Gressner AM, Weiskirchen R. Identification of Endoglin in Rat Hepatic Stellate Cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Jan 28;280(4):3078–87. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M405411200>
 9. Dong C, Gongora R, Sosulski ML, Luo F, Sanchez CG. Regulation of transforming growth factor-beta1 (TGF-β1)-induced pro-fibrotic activities by circadian clock gene BMAL1. *Respir Res* [Internet]. 2016 Dec 12;17(1):4. Available from: <http://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-016-0320-0>
 10. Fan X, Zhang Q, Li S, Lv Y, Su H, Jiang H, et al. Attenuation of CCl4-Induced Hepatic Fibrosis in Mice by Vaccinating against TGF-β1. Mukhopadhyay P, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Dec 11;8(12):e82190. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0082190>
 11. Hafez MM, Hamed SS, El-Khadragy MF, Hassan ZK, Al Rejaie SS, Sayed-Ahmed MM, et al. Effect of ginseng extract on the TGF-β1 signaling pathway in CCl4-induced liver fibrosis in rats. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2017 Dec 13;17(1):45. Available from: <http://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-016-1507-0>
 12. Li JW-H, Vederas JC. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science* (80-) [Internet]. 2009 Jul 10;325(5937):161–5. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1168243>
 13. Domitrović R, Potočnjak I. A comprehensive overview of hepatoprotective

- natural compounds: mechanism of action and clinical perspectives. *Arch Toxicol* [Internet]. 2016 Jan 16;90(1):39–79. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-015-1580-z>
14. Dhalimi A. Permasalahan Gambir (*Uncaria gambir* L.) di Sumatera Barat dan Alternatif Pemecahannya. *Perspektif* [Internet]. 2015 Dec 7 [cited 2020 Jun 10];5(1):46–59. Available from: <http://ejurnal.litbang.pertanian.go.id/index.php/psp/article/view/2916>
 15. Hussin MH, Kassim MJ. The corrosion inhibition and adsorption behavior of *Uncaria gambir* extract on mild steel in 1M HCl. *Mater Chem Phys* [Internet]. 2011 Feb;125(3):461–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254058410008631>
 16. Sri Ningsih. Efek hepatoprotektor gambir (*Uncaria gambir* (Hunter)Roxb.) dalam menghambat pembentukan kolagen dengan menekan TIMP-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase-1) in vivo. Universitas Indonesia; 2015.
 17. Pranowo HD, Hetadi AKR. *Pengantar Kimia Komputasi*. Bandung: Penerbit Lubuk Agung; 2011.
 18. Ferreira L, dos Santos R, Oliva G, Andricopulo A. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules* [Internet]. 2015 Jul 22;20(7):13384–421. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/7/13384>
 19. http://www.niper.gov.in/pi_dev_tools/DruLiToWeb/DruLiTo_index.html.
 20. Smith GF (February 2011). "Designing drugs to avoid toxicity". *Prog. Med. Chem.* **50** (1): 1–47.
 21. Lipinski CA: Lead-and drug- like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2004; 1(4): 337-341.
 22. Thomsen R and Christensen MH: MolDock - A new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of medicinal chemistry* 2006; 49(11): 3315-3321
 23. Harborne JB: *Methods of extraction and isolation*. *Phytochemical methods*, Chapman and Hall, London, 1998; 60-66.
 24. Chang C, Yang M, Wen H and Chern J: Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 2002; 10: 178-182.
 25. Kim D, Jeong SW and Lee CY: Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry* 2003; 81: 321-326.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

TABLES

Table 1. Binding affinity score from docking gambir compounds with p50 NF- κ B

No	Compounds	ΔG (kcal/mol)
1	(+)-Catechin	-7.0
2	Epigallocatechin gallate	-7.2
3	(+)-Epicatechin	-6.5
4	Gambiriin A1	-8.4
5	Gambiriin A2	-8.4
6	Gambiriin B1	-7,8
7	Gambiriin B2	-8.3
8	Gambiriin C	-8.2
9	Procyanidin B1	-8.4
10	Procyanidin B3	-8.6

Table 2. Interaction analysis by mapping amino acid residues

Amino acid	Procyanidin B3	Procyanidin B1	Gambiriin A1
Ile211	√	-	-
Gly212	√	-	-
Lys213	√	-	√
Gly214	√	√	√
Arg215	-	√*	√
Val219	√	-	-
His285	√	-	-
Ser287	√	-	-
Asp290	√	-	-
Lys335	-	√	√*
Lys337	√*	√	√
Asn338	-	√	-

Amino acid	Procyanidin B3	Procyanidin B1	Gambiriin A1
Gly374	-	√	√
Thr375	-	√	√
Lys376	-	√*	√*
Arg377	-	√*	√*
Tyr378	-	-	√
Leu426	-	-	√
Asp435	-	√*	√
Pro436	-	√	-
Total interaction	9	11	12

Residual analysis (* : hydrogen bond)

Table 3. Binding affinity score from docking gambir compounds with TGF- β 1

No	Compounds	ΔG (kcal/mol)
1	(+)-Catechin	-9.4
2	Epigallocatechin gallate	-9.0
3	(+)-Epicatechin	-8.6
4	Gambiriin A1	-8.4
5	Gambiriin A2	-8.0
6	Gambiriin B1	-8.4
7	Gambiriin B2	-8.2
8	Gambiriin C	-8.5
9	Procyanidin B1	-9.0
10	Procyanidin B3	-9.3
11	Native ligand	-9.7

Table 4. Interaction analysis by mapping amino acid residues

Amino acid	(+)-Catechin	Procyanidin B3	(+)- Epigallocatechin gallate	Native Ligand
211	-	√	√	√
212	√	√	√	-
213	√	√	√	-
214	√	√	√	-
219	√	√	√	-
230	√	-	-	√
231	√	-	-	√
232	√	-	-	√*
245	√	-	-	-
250	-	-	-	√
251	-	-	-	√
260	√	-	-	√
278	√	-	-	√
279	-	-	-	√
280	√	-	-	√
281	-	-	-	√
282	-	-	-	√
283	-	-	-	√*
285	-	√	-	-
287	-	√	√*	-
289	-	-	√	-
290	-	√	√	-

Amino acid	(+)-Catechin	Procyanidin B3	(+)- Epigallocatechin gallate	Native Ligand
335	-	-	√*	-
337	-	√*	√	-
338	-	-	√	-
340	√	-	√	√
350	-	-	-	√
351	√	-	-	√*
Total interaction	13	9	12	16

Residual analysis : (* : hydrogen bond)

Table 5. Binding affinity score from docking gambir compounds with TIMP-1

No	Compounds	ΔG (kcal/mol)
1	(+)-Catechin	-8.4
2	Epigallocatechin gallate	-9.5
3	(+)-Epicatechin	-7.3
4	Gambiriin A1	-8.4
5	Gambiriin A2	-9.7
6	Gambiriin B1	-10.0
7	Gambiriin B2	-9.7
8	Gambiriin C	-9.5
9	Procyanidin B1	-9.4
10	Procyanidin B3	-9.2

Table 6. Interaction analysis by mapping amino acid residues

Amino acid	Gambiriin B1	Gambiriin A2	Gambiriin B2
------------	--------------	--------------	--------------

Cys3	√	-	-
Pro5	√	-	-
Pro6	-	√	√
Ala11	-	-	√
Asn14	-	-	√*
Glu67	√	-	-
Tyr72	-	√*	-
Phe73	√	√*	-
Arg75	√*	√*	-
Phe83	-	√	-
Ala86	√	-	-
Lys88	-	-	√
His95	-	-	√
Thr97	-	-	√
Thr98	√	-	
Cys99	-	-	√
Ser100	-	√	√
Phe101	√	√	-
Val102	√	√	-
Ala103	√	√	-
Pro104	-	√	-
Glu156	√	√	-
Lys157	√	√*	-
Total interaction	12	12	8

Residual analysis : (* : hydrogen bond)

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama Lengkap : dr. Desdiani, M.K.K., Sp.P
Tanggal Lahir : 6 Mei 1972
Jenis Kelamin : Perempuan
Agama : Islam
No. HP : 087878000671
E-mail : desdiani@ymail.com
Orang Tua : Ir. Muchlis Anis, Bc.M. (Ayah)
 Almh. Nurleili, B.A. (Ibu)
Suami : Ir. Chandra Syahbunan, M.S.M.
Anak : Ananda Khansa Kiasati Chandra Syahbunan
 Afra Ghaisani Chandra Syahbunan
 Rousan Chandra Syahbunan
Alamat Kantor : Universitas Sultan Ageng Tirtayasa
 Jalan Raya Jakarta KM 4 Pakupatan Serang Banten
Alamat Rumah : Jalan Perikani IV No 20 Rawamangun Jakarta Timur
Jabatan : - Staf Pengajar Universitas Sultan Ageng Tirtayasa, Serang, Banten
 - Wakil Dekan 1 Bidang Akademik dan Kemahasiswaan Fakultas
 Kedokteran Universitas Sultan Ageng Tirtayasa, Serang, Banten

PENDIDIKAN:

No	Nama Institusi	Jenjang	Tahun
1	SD Vidatra Bontang Kalimantan Timur	Sekolah Dasar	1985
2	MTs Pondok Pesantren Darunnajah Ulujami Jakarta	Sekolah Menengah Pertama	1988
3	SMA Vidatra Bontang Kalimantan Timur	Sekolah Menengah Atas	1991
4	Universitas Airlangga	Program Pendidikan Dokter Strata 1	1997
5	Universitas Indonesia	Program Kedokteran Okupasi/Kerja Strata 2	2003
5	Universitas Indonesia	Program Pendidikan Dokter Spesialis Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi	2013
6	Universitas Sumatera Utara	Program Pendidikan Dokter Spesialis Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi	2015
7	Universitas Indonesia	Program Pendidikan Doktor Ilmu Kedokteran	2020

PENELITIAN DAN PUBLIKASI

No	Judul	Tahun	Keterangan
1	Pengaruh kerja gilir terhadap gangguan pencernaan pada pekerja laki-laki di pabrik semen	2004	Author
2	Hubungan pajanan debu tepung roti dan faktor-faktor lain dengan kejadian asma kerja pada pekerja roti	2014	Author
3	Effective treatment for giant intrapulmonary malignant peripheral nerve sheath tumour: a case report (Oral Presentation, APSR Bangkok)	2016	Author
4	HRCT Findings in Old Tuberculosis with Cystic Bronchiectasis and Bronchiole Ectasis (APSR Sydney)	2017	Author
5	Occupational asthma in female worker of detergent factory (WCSH Singapore)	2017	Author
6	Fibropreventive and fibrolysis effects of gambir (Uncaria Gambir (Hunter roxb.) in the lung and pleural rat of fibrosis models (CHEST, Bangkok)	2019	Author
7	Ekstrak Teh Hijau Mengurangi Luas Area Fibrosis Paru Tikus (Maj Patol Indones)	2020	Author
8	Giant intrapulmonary malignant peripheral nerve sheath tumour Desdiani (Respirology case report journal)	2020	Author
9	In Vitro Assay and Study Interaction of Uncaria gambir (Hunter) Roxb. as Anti-fibrotic Activity Against A549 Cell Line (Pharmacognosy Journal)	2020	Author

INTERNATIONAL MEETING

No		Tahun
1	Peserta, Asian Pacific Society of Respirology, Bangkok	2016
2	Peserta, Asian Pacific Society of Respirology, Sydney	2017
3	Peserta, World Congress on Safety and Health at Work, Singapore	2017
4	Peserta, Chest Annual Meeting, Bangkok	2019

RIWAYAT PEKERJAAN

No	Nama Pekerjaan	Instansi	Periode
1	Dokter Umum	Puskesmas Penajam, Kalimantan Timur	1998–2000
		Klinik Angkatan Laut, Poliklinik Ibnu Sina, Balikpapan	1998–2001
		RSU Balikpapan, Kalimantan Timur	2001
		Garuda Sentra Medika Jakarta	2001
		RS Bunda, Jakarta	2001–2003
		Badan Pemeriksa Keuangan RI	2001–2013
2	Konsultan Kesehatan dan Keselamatan Kerja		2005–sekarang
3	Staf pengajar Akademi Kebidanan	AKBID Farama Mulya	2005–2012
		AKBID Prestasi Agun	2007–2013
		AKBID Kartika Mitra Husada	2008–2017
		AKBID Mitra Persahabatan	2011
4	Staf pengajar tetap/PNS	Universitas Sultan Ageng Tirtayasa Serang, Banten	2013–sekarang
5	Dokter Spesialis Paru	RS Bhayangkara Brimob, Depok	2016–sekarang
		RS Harapan Jayakarta	2017–sekarang
6	Wakil Dekan 1 Bidang Akademik dan Kemahasiswaan	Fakultas Kedokteran, Universitas Sultan Ageng Tirtayasa Serang, Banten	2019–sekarang

KEGIATAN EKSTERNAL

No	Kegiatan	Tahun
1	Plant survey di PT Krakatau Steel, pabrik gelas PT, Kedaung dan PT Aneka Tambang	2001–2003
2	Ketua tim pembentukan fakultas kedokteran, ilmu kesehatan masyarakat dan gizi Universitas Sultan Ageng Tirtayasa	2016–2019

ORGANISASI

No	Organisasi
1	Anggota, IDI, Cabang Jakarta Pusat
2	Anggota, PDPI, Depok
3	Anggota, PERDOKI pusat

