

## Ekstrak Teh Hijau Mengurangi Luas Area Fibrosis Paru Tikus

<sup>1</sup>Desdiani, <sup>2</sup>Iris Rengganis, <sup>2</sup>Samsuridjal Djauzi, <sup>3</sup>Agus Setiyono, <sup>4</sup>Mohamad Sadikin,  
<sup>4</sup>Sri Widia A. Jusman, <sup>5</sup>Nuryati Chairani Siregar, <sup>6</sup>Suradi, <sup>7</sup>Putri C. Eyaner

<sup>1</sup>Program Studi S3 Kedokteran FKUI dan Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Tirtayasa,

<sup>2</sup>Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKUI Jakarta, <sup>3</sup>Fakultas Kedokteran Hewan IPB Bogor,

<sup>4</sup>Departemen Biokimia FKUI, <sup>5</sup>Departemen Patologi Anatomi FKUI Jakarta,

<sup>6</sup>Departemen Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta,

<sup>7</sup>Departemen IKK Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara, Medan

Penulis korespondensi: Dr. dr. Desdiani, MKK., Sp.P.

Fakultas Kedokteran Universitas Tirtayasa

Jl. Jend. Sudirman No.20, RT.10/RW.5, Kotabumi, Kec. Purwakarta, Kota Cilegon, Banten 42434.

e-mail: desdiani@ymail.com

### ABSTRAK

#### Latar belakang

Fibrosis paru sering ditemukan pada penyakit infeksi serta paparan zat kimia di lingkungan kerja. Efek anti fibrotik dapat bersifat fibropreventif dan fibrolisis. Bleomisin dapat menyebabkan inflamasi dan fibrosis paru. Kandungan katekin terbukti mampu memperbaiki kerusakan pada hati akibat induksi alkohol. Tujuan penelitian ini untuk melihat efek anti fibrotik teh hijau yang mengandung senyawa katekin terhadap pengurangan luas area fibrosis paru tikus.

#### Metode

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental *in vivo* acak di Unit Pengelolaan Hewan Laboratorium FKH IPB pada 4 kelompok hewan coba tikus, yang terdiri atas 3 ekor tikus kelompok kontrol negatif, 3 ekor kelompok kontrol positif, 3 ekor tikus kelompok tikus yang diberikan bleomisin hari ke-8 dan 28 serta ditambah ekstrak teh hijau setiap hari mulai hari ke-0 sampai ke-49 hari (fibropreventif), 3 ekor kelompok tikus yang diberikan bleomisin hari ke-0 dan 21 serta ditambah ekstrak teh hijau setiap hari mulai hari ke-15 sampai ke-49 (fibrolisis). Pemeriksaan histopatologi dilakukan terhadap semua kelompok tikus.

#### Hasil

Penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak teh hijau pada kelompok fibropreventif dan kelompok fibrolisis, dapat mengurangi luas area fibrosis pada paru tikus berdasarkan skala modifikasi Ashcroft.

#### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini didapatkan bahwa aktivitas anti fibrotik ekstrak teh hijau terbukti mampu menekan perkembangan fibrosis paru baik secara fibropreventif maupun fibrolisis.

**Kata kunci :** ekstrak teh hijau, fibrosis paru, skor modifikasi Ashcroft, fibropreventif, fibrolisis.

## Green Tea Extract Reduces Rat Lung Fibrotic

### ABSTRACT

#### Background

Pulmonary fibrosis is often found in infectious diseases and chemical exposure in the work environment. Antifibrotic effects can be fibropreventive and fibrolysis. Bleomycin can cause inflammation and pulmonary fibrosis. Catechin is proven can repair liver damages due to alcohol induction. The aim of this study is to examine the effect of antifibrotic green tea catechin on reducing the area of rat lung fibrotic.

#### Methods

This research was carried out *in vivo* experimentally in the Laboratory Animal Management Unit at Faculty of Veterinary Medicine IPB in 4 groups of rat experiments, consisting of 3 rats in the negative control group, 3 rats in the positive control group, 3 rats in the group of rats given bleomycin on the 8<sup>th</sup> day and 28<sup>th</sup> with green tea extract every day from day 0 to 49 days (fibropreventive), 3 groups of rats given bleomycin days 0 and 21 with green tea extract every day from day 15 to 49 (fibrolysis). Histopathological examination was performed for all groups of rats.

#### Results

This study showed that administration of green tea extract in fibropreventive groups and fibrolysis groups could reduce the fibrosis area in rat lungs based on Ashcroft's modified scale.

#### Conclusion

Based on the results of this study it was found that the anti-fibrotic activity of green tea extract was proven to be able to suppress the development of pulmonary fibrosis both by fibropreventive and fibrolysis

**Key words :** green tea extract, lung fibrotic, Ashcroft's modified scale, fibropreventive, fibrolysis.

## PENDAHULUAN

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 ke jaringan parenkim paru dan dapat menyebabkan gangguan fungsi paru.<sup>1,2</sup> Fibrosis paru dan dapat menyebabkan penyakit paru restriktif yang berat dan gagal napas. Fibrosis paru disebabkan oleh inflamasi, trauma, idiopatik seperti 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.<sup>2</sup>

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 sebanyak 5.000 kasus setiap tahunnya dan angka ketahanan hidup 5 tahun kurang dari 43%. Studi epidemiologi penyakit IPF yang dipublikasikan antara Januari 1990 sampai Agustus 2011 oleh *Excerpta Medica Database* (EMBASE) menyatakan insidens dan prevalens IPF dengan perhitungan data secara kuantitatif. Lima belas studi melaporkan, prevalens IPF di Amerika Serikat, bervariasi antara 14 sampai 27,9 kasus per 100.000 populasi. Prevalens dan insidens fibrosis paru yang disebabkan oleh penyakit paru lain sulit untuk diketahui, mengingat penyakit dasar penyebab fibrosis paru sangat banyak.<sup>3-5</sup> Prevalens penderita penyakit fibrosis paru di Indonesia mencapai 6,26 hingga 7,73 per 1.000.000 penduduk dan diprediksi akan terus meningkat, serta baru sekitar 700-1.500 penderita yang terdeteksi. Belum ada terapi yang efektif untuk mengatasi penyakit ini, walaupun sudah ada beberapa obat yang telah disetujui.<sup>6</sup>

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 pada jaringan parenkim serta subpleura, tampak seperti sarang lebah,

metaplasia peribronkial, hiperplasia otot halus, dan matriks ekstraselular. Jaringan parut pada paru disebabkan oleh penumpukan matriks ekstraselular yang berlebihan termasuk kolagen, proteoglikan dan glikoprotein. Antigen yang dihirup secara terus menerus menyebabkan lesi lokal, gangguan pada epitel saluran napas, menimbulkan proliferasi fibroblas, transformasi miofibroblas, peningkatan jumlah serat kolagen dan protein matriks ekstraselular lain yang memicu fibrosis pada parenkim paru dan subpleura. Mekanisme pasti proses akumulasi dan penumpukan kolagen masih belum jelas sepenuhnya, namun keterlibatan jalur sinyal yang banyak, mediator-mediator inflamasi, *growth factors*, sitokin termasuk *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor  $\beta$ 1* (TGF $\beta$ 1), *Tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ), endotelin dan *connective tissue growth factor* (CTGF), sudah diketahui.<sup>7</sup>

Patogenesis fibrosis yang kompleks melibatkan faktor pertumbuhan (TGF- $\beta$ ) sebagai mediator fibrosis yang penting, dan oleh karena itu merupakan target potensial untuk terapi anti fibrotik. Sitokin yang paling berperan aktif pada fibrosis adalah TGF $\beta$ 1. Sitokin multifungsional yang terlibat dalam patogenesis fibrosis ini bekerja melalui mekanisme sintesis matriks ekstraselular, diferensiasi fibroblas menjadi miofibroblas, dan *epithelial mesenchymal transition* (EMT). Sitokin pleiotropik tersebut menginduksi fibrosis paru secara progresif, mengatur proliferasi sel, migrasi, adhesi, diferensiasi, sintesis kolagen, penyembuhan luka, angiogenesis, metastasis, yang jalur sinyalnya sebagian dipengaruhi faktor genetik. Studi *in vitro* menunjukkan bahwa TGF $\beta$ 1 mengaktifkan ekspresi gen kolagen dan sintesis protein serta menurunkan aktivitas enzim matriks metalloproteinase (MMP). MMP atau elastase merupakan enzim proteinase yang mampu melisiskan protein sehingga berakibat luluhnya ECM di interstitial dan alveoli paru. Sejumlah sel dalam tubuh dapat mensintesis dan mengeluarkan TGF $\beta$ 1, termasuk makrofag, limfosit dan trombosit.<sup>8-10</sup> Intervensi terhadap aktivasi dan jalur sinyal TGF $\beta$ 1 merupakan strategi pengobatan kelainan fibrosis pada organ tubuh. Ada tiga strategi utama yang digunakan untuk terapi fibrosis yaitu menghalangi ligan TGF- $\beta$ , menghalangi aktivasi TGF- $\beta$  receptor (T $\beta$ R) dan menghambat selektif transduksi sinyal intraselular dengan menekan aktivitas *small mothers against decapentaplegic*

(Smads) serta koaktivator.<sup>11</sup>

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 *family* matriks metaloproteinase (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.<sup>11,12</sup>

Efek anti fibrotik suatu senyawa dapat bersifat fibropreventif dan fibrolisis.<sup>12</sup> Katekin terbukti mampu memperbaiki kerusakan hati akibat induksi alkohol melalui mekanisme anti inflamasi jalur NF $\kappa$ B secara *in vivo*.<sup>13</sup> Teh hijau (*Camellia Sinensis*) adalah salah satu contoh tanaman obat yang sudah lama dikenal sebagai sumber antioksidan. Kandungan utama teh hijau adalah senyawa kelompok flavonoid katekin yang mencapai 1/3 berat kering daun yang meliputi (+)-epikatekin (EC), (-)-epigallocatekin (EGC), (-)-epigallocatekin galat (EGCG). EGCG merupakan senyawa katekin utama dalam teh yang paling aktif dan banyak diteliti dalam pengobatan. EGCG berperan pada proses fibrosis dengan menghambat sinyal TGF $\beta$ 1 dan 2, menekan gen CTGF dan *pro-collagen* alfa-1.<sup>14</sup> Untuk membuktikan mekanisme tersebut, dilakukan pemberian ekstrak hijau pada hewan model fibrosis paru yang diinduksi oleh bleomisin dengan pendekatan mekanisme fibropreventif dan fibrolisis.

Bleomisin dapat menginduksi fibrosis paru dan paling sering dipakai dalam model eksperimental. Bleomisin adalah obat kemo-terapi yang telah diidentifikasi sebagai agen profibrotik pada pasien limfoma yang mengalami fibrosis setelah pemberian bleomisin intravena. Pemberian bleomisin secara intratrakeal merupakan uji preklinik model hewan coba yang terbaik. Studi pendahuluan yang sudah dilakukan, membuktikan bahwa pemberian bleomisin intratracheal dan intrapleura menimbulkan fibrosis paru pada tikus.<sup>15</sup> Penelitian ini mencoba mengungkap efek anti fibrotik ekstrak teh hijau melalui pendekatan fibropreventif dan fibrolisis

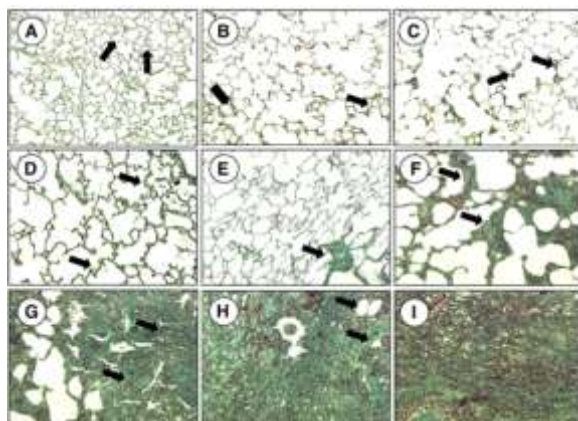
dengan mengevaluasi gambaran histopatologi.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian analitik dengan desain eksperimental secara *in vivo* acak pada 4 kelompok hewan coba tikus untuk menilai dan menganalisis efek anti fibrosis pemberian ekstrak teh hijau pada paru tikus model yang mengalami fibrosis akibat pemberian bleomisin. Subjek penelitian adalah 4 kelompok tikus putih jantan galur *Sprague Dawley* dengan berat badan sekitar 200-250gr dan berusia 10 minggu. Dosis bleomisin yang digunakan adalah 4 mg/kg BB secara intratracheal.<sup>16</sup> Dosis ekstrak teh hijau polyphenon60 yang digunakan adalah 125 mg/kg BB peroral, berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan oleh Sri Ningsih.<sup>17</sup> Kelompok tikus model tersebut terdiri atas kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif yaitu tikus model yang hanya diberikan bleomisin 4 mg/kg BB hari ke-0 dan hari ke-21, kelompok tikus model dengan pemberian bleomisin 4 mg/kg BB hari ke-8 dan hari ke-28 + ekstrak teh hijau polyphenon60 setiap hari selama 49 hari (fibropreventif), kelompok tikus model dengan pemberian bleomisin 4 mg/kg BB hari ke-0 dan hari ke-21+ekstrak teh hijau polyphenon60 setiap hari mulai hari ke-15 sampai ke-49 (fibrolisis). Penelitian dilaksanakan pada Unit Pengelola Hewan dan Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Penelitian berlangsung dari bulan November 2018 sampai Januari 2019. Seluruh kelompok hewan coba akan diterminasi pada akhir minggu ke-7 atau hari ke-50, sebelumnya diberikan anestesi menggunakan ketamine dosis letal, disakrifikasi 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.

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 dengan 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 memposisikan jaringan dalam mesin mikrotom sebelum dipotong. Selanjutnya *box cassette* diberi tanda khusus. Penyayatan jaringan dilakukan menggunakan mesin mikrotom pada ketebalan 3-5  $\mu\text{m}$ . Sebelum disayat, blok parafin disimpan pada  $-20^{\circ}\text{C}$  selama minimal 60 menit untuk memudahkan penyayatan. Penempelan sayatan pada gelas obyek 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 obyek 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 obyek 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. Pewarnaan HE dilakukan menggunakan reagen Hematoksilin-Mayer dan larutan Eosin serta Masson trichrome pada 4 kelompok tikus model. Gambaran fibrosis dianalisis dengan menggunakan modifikasi skala Ashcroft.



Gambar 1. Gambaran fibrosis paru dengan modifikasi skala Ashcroft.<sup>18</sup>

Tabel 1. Karakterisasi skala modifikasi Ashcroft<sup>18</sup>

| 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 $\leq 3\times$ dari normal. Struktur paru sebagian alveoli membesar, belum terlihat fibrosis             |
| 2                | Gambar C    | Septum alveoli: fibrosis tampak jelas, ketebalan septum $\geq 3\times$ dari normal. Struktur paru sebagian alveoli membesar, belum terlihat fibrosis         |
| 3                | Gambar D    | Septum alveoli: dinding mulai fibrosis, ketebalan $\geq 3\times$ 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 $\leq 50\%$ lapangan pandang, kerusakan struktur meluas.        |
| 6                | Gambar G    | Septum alveoli: bervariasi, sebagian besar berubah bentuk. Struktur paru: massa fibrotik besar, $\geq 50\%$ lapangan 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>                                                            |

Variabel bebas adalah ekstrak teh hijau polyphenon60. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah tingkat fibrosis paru dengan modifikasi skor Ashcroft. Setelah seluruh data penelitian diperoleh, selanjutnya dilakukan pengolahan data. Seluruh analisis dilakukan dengan menggunakan piranti lunak statistik. Uji statistik yang digunakan adalah uji bivariat dengan *chi-square test*, antara variabel kelompok atau jenis perlakuan (kategorik) dengan variabel derajat fibrosis (kategorik).

## HASIL

Tabel 2. Analisis skor fibrosis dengan skala modifikasi Ascroft.

| Variabel skor fibrosis (Derajat) | Kelompok   |            |            |            |
|----------------------------------|------------|------------|------------|------------|
|                                  | 1<br>N = 3 | 2<br>N = 3 | 3<br>N = 3 | 4<br>N = 3 |
| 0                                | 1          |            |            |            |
| 1                                | 2          |            |            |            |
| 2                                |            |            |            |            |
| 3                                |            |            |            |            |
| 4                                |            |            | 2          | 1          |
| 5                                |            |            | 1          | 2          |
| 6                                |            | 2          |            |            |
| 7                                |            | 1          |            |            |
| 8                                |            |            |            |            |

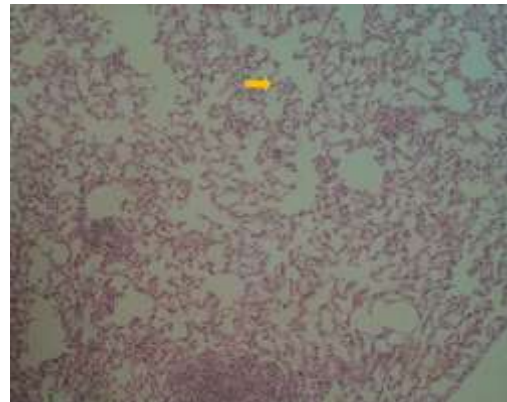
Keterangan: Kelompok 1: kelompok kontrol negatif tanpa pemberian bleomisin dan ekstrak teh hijau, Kelompok 2: kelompok kontrol positif yang diberikan bleomisin 4 mg/kg BB hari ke-0 dan hari ke-21, Kelompok 3: kelompok yang diberikan bleomisin 4 mg/kg BB hari ke-8 dan hari ke-28 + ekstrak teh hijau polyphenon60 hari ke-0 sampai hari ke-49, Kelompok 4: kelompok yang diberikan bleomisin 4 mg/kg BB hari ke-0 dan hari ke-21 + ekstrak teh hijau polyphenon60 mulai hari ke-15 sampai ke-49.

Tabel 3. Hubungan jenis perlakuan tiap kelompok dengan skor fibrosis modifikasi Ascroft.

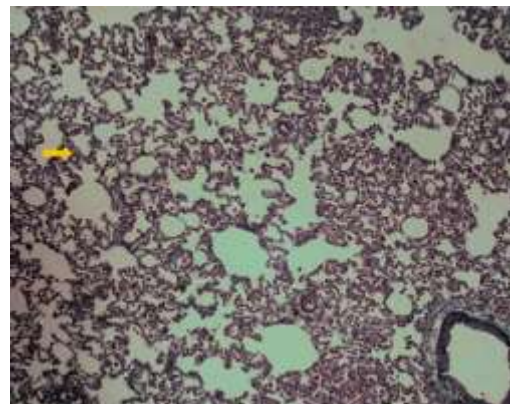
| Variabel jenis perlakuan | Skor Fibrosis (Skala Ascroft) |          |           |           |          |          | Total     | Nilai p |
|--------------------------|-------------------------------|----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|---------|
|                          | 0                             | 1        | 4         | 5         | 6        | 7        |           |         |
| Kelompok 1               | 1 (100%)                      | 2 (100%) | -         | -         | -        | -        | 3 (25%)   | 0.046*  |
| Kelompok 2               | -                             | -        | -         | -         | 2 (100%) | 1 (100%) | 3 (25%)   |         |
| Kelompok 3               | -                             | -        | 2 (66.7%) | 1 (33.3%) | -        | -        | 3 (25%)   |         |
| Kelompok 4               | -                             | -        | 1 (33.3%) | 2 (66.7%) | -        | -        | 3 (25%)   |         |
| Total                    | 1 (100%)                      | 2 (100%) | 3 (100%)  | 3 (100%)  | 2 (100%) | 1 (100%) | 12 (100%) |         |

Untuk data kategorik nilai p dihitung berdasarkan uji statistik *chi-square*. Nilai kemaknaan berdasarkan nilai  $p < 0,05$ , tanda \* menunjukkan nilai  $p < 0,05$ . Dari hasil analisis dengan menggunakan uji *chi-square*, diketahui bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara pemberian jenis perlakuan pemberian ekstrak teh hijau dengan derajat fibrosis (nilai  $p < 0,05$ ).

Hasil analisis sediaan histopatologi organ paru pada kelompok tikus yang pertama atau kelompok kontrol negatif dengan pewarnaan hematoksilin eosin (HE) dan Masson Trichome (MT), menunjukkan skala modifikasi Ascroft derajat 0 atau 1 yaitu beberapa alveoli dengan dinding alveoli tipis, dipisahkan oleh septum interalveolar, tampak sel-sel limfosit, lapisan epitel cabang bronkus masih kompak, berbentuk spitel silindris bertingkat bersilia, tidak ditemukan fibrosis pada dinding alveoli dan struktur paru masih normal.

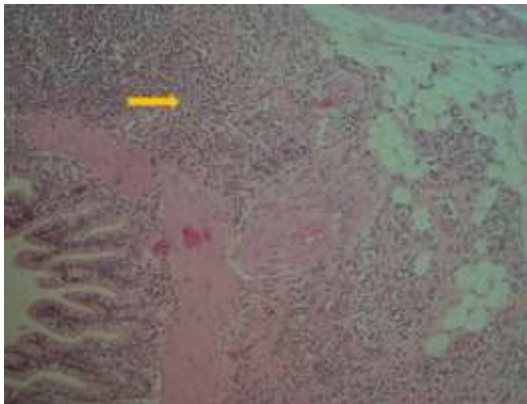


Gambar 2. Kelompok kontrol negatif (HE, x100).

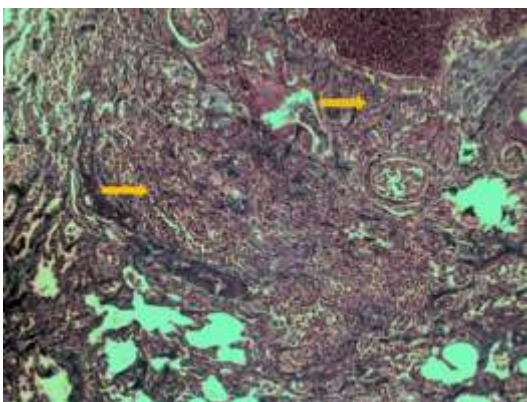


Gambar 3. Kelompok kontrol negatif (MT, x 100)

Gambaran histopatologi dengan pewarnaan HE pada kelompok tikus yang kedua atau kelompok kontrol positif menunjukkan skala modifikasi Aschroft derajat 6 atau 7 yaitu hilangnya struktur sebagian besar alveoli, infiltrasi masif sel-sel inflamasi yang menyebabkan penebalan septum interalveolar, ruang alveoli menyempit, masuknya sel-sel darah ke alveoli, perubahan bentuk alveoli yang bergabung membentuk gambaran emfisematous. Dinding alveoli menebal, beberapa bronkiolus menunjukkan kerusakan epitel, infiltrasi masif sel inflamasi perivaskuler dan peribronkial. Pewarnaan MT memperlihatkan peningkatan serat kolagen di septum interalveolar, peribronkial dan perivaskular dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.



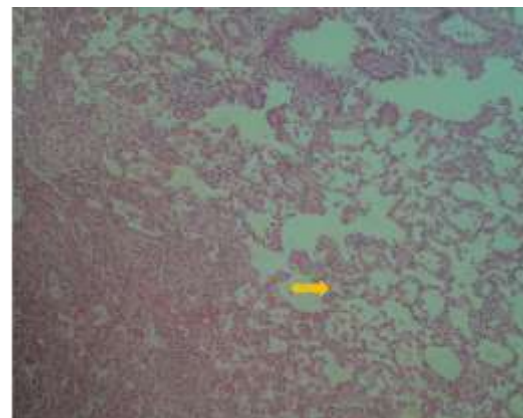
Gambar 4. Kelompok kontrol positif (HE, x100)



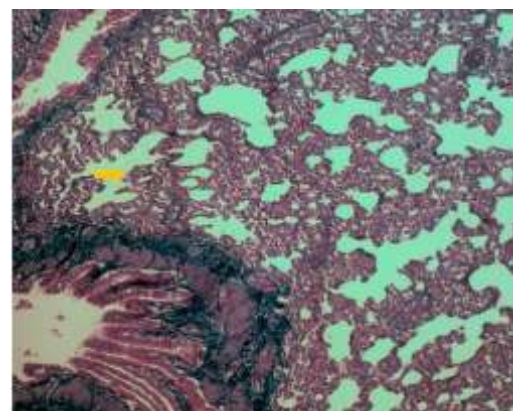
Gambar 5. Kelompok kontrol positif (MT, x 100)

Gambaran histopatologi kelompok tikus yang ketiga dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dengan pewarnaan HE menunjuk-

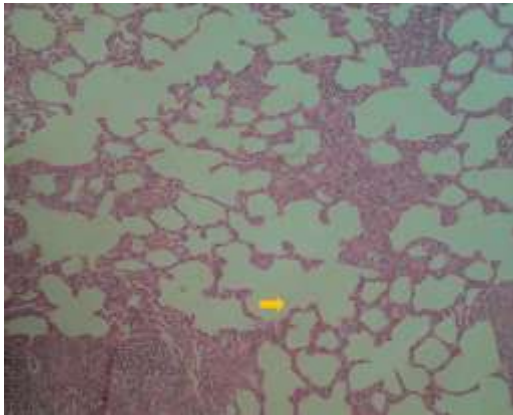
kan skala modifikasi Aschroft derajat 4 atau 5 yaitu penurunan infiltrasi sel inflamasi, berkurangnya ketebalan septum interalveolar dan perdarahan interstitial. Pewarnaan MT memperlihatkan berkurangnya serat kolagen pada septum interalveolar, area peribronkiolar dan perivaskular. Gambaran histopatologi kelompok tikus yang keempat dengan pewarnaan HE menunjukkan skala modifikasi Aschroft derajat 5 yaitu penurunan infiltrasi sel inflamasi, berkurangnya ketebalan septum interalveolar, namun dibebberapa area memperlihatkan peningkatan infiltrasi sel inflamasi dan ketebalan septum interalveolar. Infiltrasi sel inflamasi perivaskular menurun, tampak sedikit kongesti arterioli dan perdarahan interstitial. Pewarnaan MT memperlihatkan penurunan serat kolagen pada septum interalveolar, peribronkial dan perivaskular.



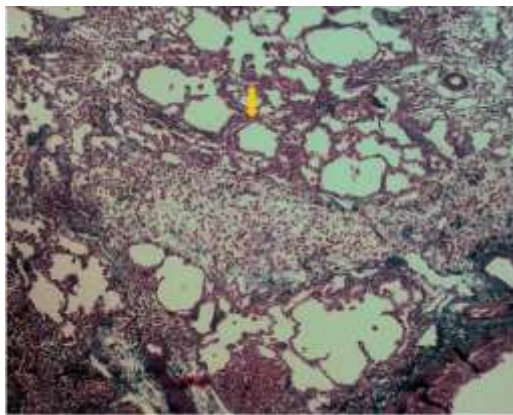
Gambar 6. Kelompok ketiga (HE, x100)



Gambar 7. Kelompok ketiga (MT, x100).



Gambar 8. Kelompok keempat (HE,x100).



Gambar 9. Kelompok keempat (MT, x100)

## DISKUSI

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.<sup>21</sup> 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.<sup>19</sup> Fibrosis paru 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.<sup>20,21</sup>

Perbaikan jaringan rusak merupakan mekanisme biologik dasar yang melibatkan

penggantian sel dan jaringan rusak setelah jejas, dan merupakan proses penting untuk kelangsungan hidup.<sup>22</sup> 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. Penyembuhan luka terdiri atas 4 tahap yaitu fase koagulasi, fase inflamasi, fase proliferasi dan migrasi fibroblas serta fase remodeling.<sup>23</sup>

Model fibrosis paru dengan pemberian bleomisin, sudah sering dilakukan. Bleomisin digunakan untuk menginduksi terjadinya fibrosis paru pada model hewan tikus jantan yang diberikan secara intratracheal 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.<sup>18</sup> Model fibrosis paru yang diinduksi oleh bleomisin, digunakan untuk mengetahui mekanisme yang berkaitan dengan fibrosis paru. 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 $\beta$  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.<sup>24</sup>

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 4 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 *Bronchoalveolar lavage* (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 7 hari setelah pemberian, dan menetap mulai hari ke-14 dan selanjutnya. Pewarnaan kolagen dan kadar hidroksiprolin akan maksimal 7 hari pasca pemberian bleomisin. Pemberian bleomisin berulang juga menyebabkan fibrosis paru derajat sedang, sesuai penelitian Peng. 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.<sup>24</sup>

Selama minggu pertama setelah pemberian bleomisin, respons terutama ditandai dengan peradangan paru-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 menjadi semakin terlihat jelas. Setelah 5 minggu pasca bleomisin, perubahannya lebih heterogen dengan fibrosis yang diselingi alveoli dan alveoli yang sebagian rusak dan dilapisi oleh sel epitel bronchoalveolar. 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 bronchoalveolar. Pada proses kronik fibrosis menjadi semakin interstitial, alveoli menebal sering dilapisi oleh sel epitel bronchoalveolar kuboidal. Ruang alveolar sering diisi dengan granular halus bahan amfofilik homogen yang sering disertai dengan

infiltrasi makrofag dan *giant cell* multinukleat serta neutrofil. Kesimpulannya perubahan histopatologi yang diamati pada pemberian bleomisin tunggal dan berulang sangat serupa.<sup>24</sup>

Penelitian ini menggunakan ekstrak teh hijau sebagai anti fibrotik dengan dosis 125 mg/kg berat badan, bleomisin dengan dosis 4 mg/kg berat badan. Kelompok pertama atau kelompok kontrol negatif dengan pewarnaan HE dan MT menunjukkan skala beberapa alveoli dengan dinding alveoli tipis, dipisahkan oleh septum interalveolar, tampak sel-sel limfosit, lapisan epitel cabang bronkus masih kompak, berbentuk spitel silindris bertingkat bersilia, tidak ditemukan fibrosis pada dinding alveoli dan struktur paru masih normal, seperti penelitian yang dilakukan oleh Peng.<sup>24</sup>

Gambaran histopatologi dengan pewarnaan HE pada kelompok tikus yang kedua atau kelompok kontrol positif menunjukkan hilangnya struktur sebagian besar alveoli, infiltrasi masif sel-sel inflamasi yang menyebabkan penebalan septum interalveolar, ruang alveoli menyempit, masuknya sel-sel darah ke alveoli, perubahan bentuk alveoli yang bergabung membentuk gambaran emfisematous. Dinding alveoli menebal, beberapa bronkiolus menunjukkan kerusakan epitel, infiltrasi masif sel inflamasi perivaskuler dan peribronkial. Pewarnaan MT memperlihatkan peningkatan serat kolagen di septum interalveolar, peribronkial dan perivaskuler dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, seperti penelitian yang dilakukan oleh Hubner.<sup>18</sup>

Gambaran histopatologi kelompok tikus yang ketiga dengan pewarnaan HE menunjukkan penurunan infiltrasi sel inflamasi, berkurangnya ketebalan septum interalveolar dan perdarahan interstitial. Pewarnaan MT memperlihatkan berkurangnya serat kolagen pada septum interalveolar, area peribronkiolar dan perivascular. Gambaran histopatologi kelompok tikus yang keempat dengan pewarnaan HE menunjukkan penurunan infiltrasi sel inflamasi, berkurangnya ketebalan septum interalveolar, namun dibeberapa area memperlihatkan peningkatan infiltrasi sel inflamasi dan ketebalan septum interalveolar. Infiltrasi sel inflamasi perivascular menurun, tampak sedikit kongesti arteriol dan perdarahan interstitial. Pewarnaan MT memperlihatkan penurunan serat kolagen pada septum interalveolar, peribronkial dan

perivaskular, sesuai dengan hasil studi yang dilakukan oleh El-Safli.

### KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak teh hijau dapat mengurangi area fibrosis paru tikus model yang diinduksi oleh bleomisin secara fibro-preventif dan fibrolisis. Pemberian ekstrak teh hijau setiap hari sampai hari ke-49 diikuti dengan pemberian bleomisin hari ke-8 dan 28 pada kelompok tikus ketiga dibandingkan dengan pemberian ekstrak teh hijau setiap hari mulai hari ke-15 sampai hari ke-49 diikuti dengan pemberian bleomisin hari ke-0 dan 21 pada kelompok tikus keempat memperlihatkan efek yang hampir sama terhadap pengurangan luas area fibrosis yang diamati dengan perubahan gambaran histopatologi secara skala modifikasi Ascroft. Oleh karena itu diharapkan ada penelitian lebih lanjut tentang obat anti fibrotik yang akan dapat mengurangi luas area fibrosis paru secara signifikan.

### 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; 543: 1-11.
2. Decologne N, Kolb M, Margetts PJ, Menetrier F, Artur Y. TGF- $\beta$ 1 induces pleural scarring and subpleural fibrosis. *J Immunol*. 2007; 179; 6043-51.
3. Tatler AL, Jenkins G. TGF- $\beta$  activation and lung fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2012; 9; 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: 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;16:2. doi: 10.1186/s12890-015-0165-1.
6. Gribbin J, Hubbard RB, Tata LJ. Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK. *Thorax BMJ*. 2006; 61: 980-5.
7. Maharaj S, Shimbori C, Kolb M. Fibrocytes in pulmonary fibrosis: a brief synopsis. *Eur Respir Rev*. 2013; 22: 552-7.
8. Yaraee R, Ghazanfari T. Substance P potentiates TGF- $\beta$ 1 production in lung epithelial cell lines. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2009; 8: 19-24.
9. Dong C, Gongora R, Sosulski ML, Luo F, Sanchez CG. Regulation of transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1)-induced pro fibrotic activities by circadian clock gene BMAL1. *Respir Res*. 2016; 17:4. doi: 10.1186/s12931-016-0320-0.
10. Andreetta F, Bernasconi P, Baggi F, Ferro P, Olivia L. Immunomodulation of TGF-beta1 in mdx inhibits connective tissue proliferation in diaphragm but increases inflammatory response: Implications for antifibrotic therapy. *J Neuroimmunol*. 2016; 175: 77-86.
11. Varga J, Pasche B. Anti TGF therapy in fibrosis: recent progress and implications for systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2008; 20: 720-28.
12. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases : Structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003; 92: 827-39.
13. Bharrhan S, Koul A, Chopra K, Rishi P. Catechin suppresses an array of signalling molecules and modulates alcohol-induced endotoxin mediated liver injury in rat model. *Plos One*. 2011; 6(6)e20635: 1-9.
14. Sri Ningsih. 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 FKUI. 2015.
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 (Lausanne)*. 2017; 4(118): 1-11.
16. Taniguchi S, Kuroda K, Doi K, Inada K, Yoshikado N, Yoneda Y, *et al*. Evaluation of gambir quality based on quantitative analysis of polyphenolic constituents. *Yakugaku Zasshi*. 2007; 127: 1291-1300.
17. Zheng C, Yin Q, Wu H. Structural studies of NF $\kappa$ B signaling. *Cell Res*. 2011; 21: 183-95.
18. Hubner RH, Gitter Wolfram, El Mokhtari NE, Mathiak M, Both M, Bolte H. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *BioTechniques*. 2008; 44: 507-17.

19. Wilson MS, Wynn TA. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol.* 2009; 2: 103-21.
20. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implication for therapy. *Ann Intern Med.* 2001; 134: 136-51.
21. Kumar A, Kapnadak SG, Girgis RE, Raghu G. Lung transplantation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Rev Respir Med.* 2018; 12: 375-85.
22. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest.* 2007; 117: 524-9.
23. Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med.* 2011; 208: 1339-50.
24. Peng R, Sridhar S, Tyagi G, Phillips EJ, 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. doi: 10.1371/journal.pone.0059348.
25. ElSafli FA, Zolfakar AS, El-Sherif NM, Alafifiy AS. Effect of green tea extract on experimentally induced lung fibrosis in adult male albino rat. *J Am Sci.* 2014;10(8).