

GAMBARAN INFLAMASI HEPAR PADA TIKUS YANG DIBERI DIET ATEROGENIK

Enikarmila Asni, Ilhami Romus, Ligat Pribadi, Ismawati

ABSTRACT

Purpose: Atherogenics diet had increase inflammation, especially in vascular system. This research had an aim to is to evaluate whether inflammation also happened in hepar histopathology of Wistar rat which fed by atherogenic diet for 5, 8 and 12 weeks. **Methods:** By using rat as animal experiment, fed by cholesterol from egg yolk (2%), goat fat(5%), cholate acid (0,2%) mixed in standard food, and given 20 g/day/each rat . Vitamin D3 for initial dosage (700.000 IU/kg) was given in the first day, and repeated every four weeks 300.000 IU/kg by using sondage. There are 3 groups of rats; 8 weeks group (P1), 12 weeks group (P2), and control group (P0). For control group, the animal only fed by standard food without giving vitamin D3. Histopathology evaluation based on Histological activity by Metavir system, which grade into none, mild, moderate and severe. **Results:** For control group, there are 60% samples with mild activity score and 40% with moderate activity score. For 8 weeks group, there are 67% samples with moderate activity score and 33% with mild activity score. For 12 weeks group, all of samples with mild activity score

Conclusion: Wistar rat which fed by atherogenic diet for 8 and 12 weeks by using cholesterol from egg yolk (2%), goat fat(5%), cholate (0,2%) and vitamin D3 showed moderate activity score in 8 weeks and mild score activity in 12 weeks . **Key words:** hepar, inflammation, Wistar rat, atherogenic diet

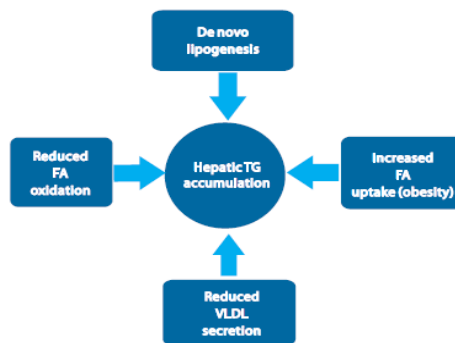
PENDAHULUAN

Perlemakan hepar atau Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases (NAFLD) merupakan keompok kelainan pada hepar dari hanya perlemakan hepar yang bersifat benigna (tidak membahayakan. Kondisi dimana terjadi penumpukan trigliserida disertai proses inflamasi. Proses ini dapat berakhir menjadi Non-Alcoholic Steatosis Hepatis (NASH) yang secara progresif dapat berlanjut menjadi fibrosis hepar atau carcinoma hepar. Kondisi ini berhubungan dengan sindroma metabolik, seperti obesitas, hiperinsulinemia,diabetes mellitus, dislipidemia dan lainnya. ¹

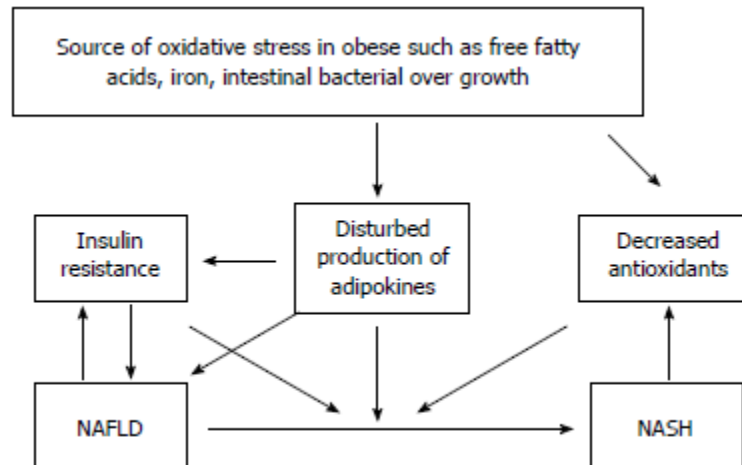
Angka prevalensi penderita NAFLD meningkat pada akhir-akhir ini sesuai dengan peningkatan penyakit sindroma metabolik. Di Amerika, hampir 20% penduduk dicurigai menderita NAFLD dan 2-3% diantaranya berlanjut ke NASH sehingga dapat berdampak morbiditas yang cukup mengkhawatirkan,¹ Secara pasti mekanisme perjalanan penyakit dari steatosis yang benigna menjadi NASH masih belum diketahui, namun saat ini masih dianut hipotesis “two hit”. Menurut model ini terjadi terlebih dahulu penumpukan trigliserida yang berlebihan di hepar dan stimulasi patogenik tambahan seperti proinflammatory sitokin, stres oksidatif, endotoxin dan lipotoksik.²⁻⁷

Pemberian diet aterogenik yang mengandung tinggi diduga meningkatkan resiko terjadinya NASH ini pada mekanisme “second hit”. Wouters et al., menemukan bahwa pemberian diet tinggi kolesterol meningkatkan terjadinya proses inflamasi melalui peningkatan VLDL-C, dan inflamasinya berkurang ketika kolesterol dikeluarkan dari diet.¹ Diduga juga, kolesterol mengakibatkan peningkatan stres oksidatif. Arnal et al menemukan bahwa pemberian kolesterol bersamaan dengan tembaga akan mengakibatkan peningkatan MDA, protein karbonil, nitrat, dan pengaktifan kalpain pada sel otak.⁸ Beberapa penelitian juga menemukan keterkaitan antara kasus NASH dengan timbulnya aterosklerosis.⁹⁻¹⁰

Patofisiologi timbulnya NASH melalui hipotesis “two hits” dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2 dibawah ini.



Gambar 1. Patofisiologis NASH dan NAFL¹¹



Gambar 2. Mekanisme “second hit” patofisiologi NASH¹²

Kolesterol berperan dalam timbulnya “second hit” dibandingkan first hit. Beberapa peneliti menemukan bahwa kolesterol memicu reaksi inflamasi, sedangkan trigliserida pada proses deposit lemak di hepar. Kolesterol diduga memicu reaksi inflamasi melalui berbagai cara, seperti pengaktifan $\text{TNF-}\alpha$, menurunnya jumlah NADPH, dan beberapa hipotesis lain. Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk meneliti bagaimana reaksi inflamasi yang terjadi di jaringan hepar pada tikus yang diberi diet aterogenik yang mengandung tinggi kolesterol dibandingkan tikus normal.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan desain penelitian *pre* dan *post test* dengan fokus penelitian gambaran inflamasi hepar tikus Wistar yang diberi diet aterogenik selama 8 minggu, 12 minggu dan kontrol (6 ekor tikus/kelompok). Diet aterogenik terdiri dari kolesterol 2% (dari kuning telur), lemak kambing 5% dan asam kolat 0,2%. Pakan standar (Vivan). Pemberian vitamin D3 (Sigma) diberikan dengan sonde, dosis inisial 700.000 IU/kgBB dan dosis rumatan 300.000IU/kgBB/4 minggu. Diet aterogenik diberikan sebanyak 20 g/hari/ekor tikus. Kelompok kontrol mendapat pakan standar dengan jumlah yang sama. Setelah 8 dan 12 minggu, tkus dikorbankan dan diambil jaringan heparnya. Fiksasi dilakukan dengan

formalin alkohol, jaringan diwarnai hematoxilin eosin dan diperiksa dibawah mikroskop. Skor radang diperiksa berdasarkan *Metavir System* yaitu kriteria aktivitas histologi piecemeal necrosis dimana dibagi atas 3. Skor 1 berarti perubahan ringan dibeberapa peripostarl., skor 2 perubahan diffusa di periporta atau telah terjadi perubahan bersifat focal di sekeliling periporta, sedangkan skor 3 telah terjadi perubahan periporta di semua sistem porta.¹³

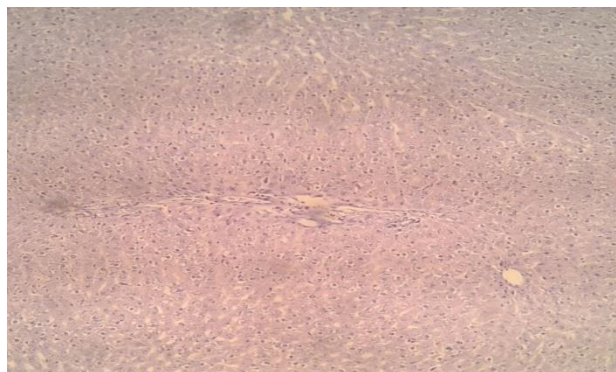
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini didapatkan hasil seperti dibawah ini, salah satu slide kontrol gagal dibaca.

Tabel 1. Skor Radang Hepar Diet Aterogenik

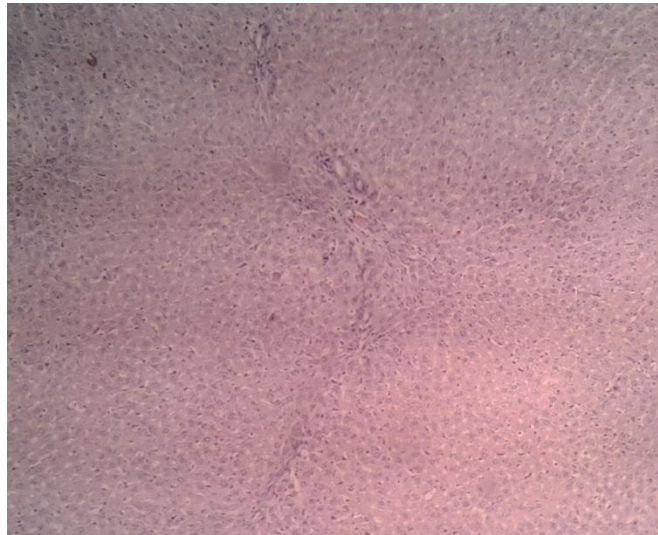
No	Kelompok	Perlakuan					
		I	II	III	IV	V	VI
1	Kelompok 8 minggu	1	2	2	2	2	1
2	Kelompok 12 minggu	1	1	1	1	1	1
3	Kelompok kontrol	1	2	2	1	1	-

Gambaran radang secara histopatologi didapatkan bahwa skor 1 terlihat seperti Gambar.3 berikut ini , peradangan terlihat terbatas pada satu portal tanpa merambat ke portal lainnya.



Gambar 3. Gambaran inflamasi jaringan Skor 1

Peradangan yang lebih luas melibatkan portal lainnya, atau terdapat pintas/hubungan inflamasi antara portal satu dengan yang lainnya seperti pada Gambar.4.



Gambar 4. Gambaran inflamasi jaringan Skor 2

Beberapa penelitian menemukan bahwa diet aterogenik (kolesterol 1,25%, lemak 15% dan kolat 0,5%) seperti yang dinyatakan oleh Paigen dkk telah menimbulkan perubahan proinflamasi mikrovaskular, peningkatan *reactive oxygen species* (ROS), peningkatan adhesi molekul terhadap sel endotel, adhesi dan imigrasi granulosis, peningkatan sitokin, dan platelet. Pada taraf molekuler, juga dinyatakan bahwa pemberian diet ini selama 5-15 minggu akan meningkatkan faktor-faktor proinflamasi di hepar.¹⁴⁻²⁰ Pada penelitian ini didapatkan bahwa secara histopatology, kondisi 8 minggu pemberian diet aterogenik dan kontrol malah memberikan kondisi peradangan dengan derajat yang lebih tinggi (skor 2) lebih banyak dibandingkan pemberian diet 12 minggu. Hal ini mungkin dapat dijelaskan oleh pernyataan bahwa walaupun secara mikromolekuler telah terjadi beberapa proses ke arah inflamasi, namun secara makro, kondisi ini belum cukup adekuat untuk memberikan gambaran berupa hepatitis atau inflamasi.

Desai dkk menemukan bahwa pemberian diet tinggi kolesterol selama 3 minggu akan mengakibatkan peradangan pada tikus yang mengalami delesi beberapa protein transmembran. Namun jika delesi ini tidak terjadi atau terjadi hanya pada beberapa jenis saja, maka kondisi ini juga tidak akan mengakibatkan inflamasi yang mengakibatkan gambaran hepatitis di hepar.²¹ Beberapa penelitian menyatakan bahwa peradangan hepar secara makro (histopatologi) jarang terjadi jika hanya dilakukan pemberian diet tinggi kolesterol, namun lebih sering dan cepat terjadi pada kondisi diet tinggi karbohidrat dan lemak (asam lemak). Kim et al., menyatakan bahwa diet tinggi kolesterol hanya akan menimbulkan peradangan hepar jika terjadi proses peradangan sistemik.²²

Beberapa penelitian juga mengungkapkan bahwa beberapa proses inflamasi dapat ditemui pada fase akut. Namun dengan beberapa proses kontrol yang terjadi di hepar, seperti enzim, antioksidan, mekanisme umpan balik metabolisme, metabolisme kolesterol dll, maka hepar jika kondisi dapat diatasi (kompensasi) maka reaksi radang (inflamasi) pada hepar akan hilang dan jejas tidak ditemukan lagi.²³

KESIMPULAN

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa tikus Wistar jantan yang diberi makan diet aterogenik (kolesterol 2% (dari kuning telur), lemak kambing 5%, kolat 0,2%) dan diinduksi vitamin D3, menunjukkan gambaran histopatologi hepar dengan skor radang inflamasi sedang pada pemberian selama 8 minggu dan ringan pada pemberian selama 12 minggu.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian tambahan yang bersifat mikromolekular, oleh karena walaupun skor radang yang terlihat secara histopatologis lebih ringan pada pemberian yang lebih lama (12 minggu), namun ini tidak sepenuhnya menggambarkan kondisi yang berlangsung sebenarnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ali AA, Kitsios GD, Balk EM, Lau J dan Stanley. The vulnerable atherosclerotic plaque: Scope of the literature. *Annals of Internal Medicine*. 2010; 153: 387-395
2. Barass F. Mencegah serangan jantung dengan menekan kolesterol. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama, 1994. 19-167.
3. Fonarow GC. Aggressive treatment of atherosclerosis:the time is now. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*.2003; 70: 431-440
4. Jamal S. Deskripsi penyakit system sirkulasi: penyebab utama kematian di Indonesia. *Cermin dunia kedokteran*. 2004; 143: 5-9.
5. Guyton, A. C., John E.H. 1997. *Fisiologi Kedokteran*, Edisi 9. EGC. Jakarta. Hal: 1200.
6. Kones, R. Primary prevention of coronary heart disease: integration of new data, evolving views, revised goals, and role of rosuvastatin in management. A comprehensive survey.*Drug design, development and therapy*. 2011; 5: 325-380
7. Mizuno Y, Jacob RF dan Mason RP. Inflammation and the development of atherosclerosis.Effects of lipid-lowering therapy.*Journal of atherosclerosis and thrombosis*.2011; 5: 351-358.
8. Russel J.C, ProctorS.D. 2006. Small animal models of cardiovascular disease; tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. 15: 318-330.
9. Li et al. Effects of total glucosides from paeony (*Paeonialactiflora* Pall) roots on experimental atherosclerosis in rats. *Journal of ethnopharmacology*.2011; 135: 469-475.

10. Vinitha R et al..Effect of tamoxifen on lipids and lipid metabolizing marker enzymes in experimental atherosclerosis in Wistar rats.Molecular and cellular biochemistry. 1997; 168: 13-19
11. Pang et al. Hexarelin suppresses high lipid diet and vitamin D3-induced atherosclerosis in the rat. Peptides. 2010; 31: 630-638
12. Junior WS, dos Santos JS, Sankarankutty AK, e Silva OC. Nonalcoholic fatty liver disease and obesity. Acta Cirurgica Brasileira, 2006;21(S1):72-78
13. Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. Journal of Hepatology . 2007, 47: 598–607
14. Nishina PM, Verstuyft J, Paigen b. Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse. J. Lipid Res.1990, 31, 859–869
15. Stokes KY, Microvascular responses to hypercholesterolemia: the interactions between innate and adaptive immune responses. Antioxid.Redox Signal.2006 8, 1141–1151
16. Stokes KY, Cooper D, Tailor A, Granger BN. Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. Free Radic. Biol. Med. 2002, 33, 1026–1036.
17. Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, Guo JP, Lefer AM. (Nitric-oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1995, 15, 1652–1659
18. Stokes KY, Clanton EC, Bowles KS, Fuseler JW, Chervenak D, Chervenak R, Jennings SR, Granger DN, The role of Tlymphocytes in hypercholesterolemia-induced leukocyte-endothelial interactions.Microcirculation. 2002, 9, 407–417

19. Stokes KY, Clanton EC, Clements KP, Granger DN, Role of interferon in hypercholesterolemia-induced leukocyte-endothelialcell adhesion. *Circulation*.2003, 107, 2140–2145.
20. Stokes KY, Calahan L, Russell JM, Gurwara S, Granger, DN. Role of platelets in hypercholesterolemia-induced leukocyte recruitmentand arteriolar dysfunction. *Microcirculation*. 2006, 13, 377–388.
21. Desai MS, Mariscalco MM, Tawil A,Vallejo JG and Smith CW. Atherogenic diet-induced hepatitis is partially dependent on murine TLR4. *J. Leukoc. Biol.* 2008,83: 1336–1344
22. Kim EJ, Kim B-h, Seo HS, Lee YJ, Kim HH, et al. Cholesterol-induced non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis aggravated by systemic inflammation. *PLoS ONE* , 2014, 9(6): e97841.
23. Ott DB, Lachance PA. Biochemical control of liver cholesterol biosynthesis. *Am. J. Clin. Nutr.* 1981,34: 295-2306

BIODATA PENELITI

1. Ketua Peneliti

- a. Nama : dr.Enikarmila Asni,M.Med.Ed, M.Biomed
- b. Tempat/tanggal lahir : Pekanbaru, 29 Mei 1974
- c. Alamat : Bagian Biokimia FK Unri
: Jl. Diponegoro no 1 Pekanbaru
: No Telp/Fax : 0761-839264/839265
- d. Jabatan : Kepala Bagian Biokimia FK Unri
- e. Pendidikan
- S1 : Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang (2001)
 - S2 : Medical Faculty of Sidney University Sidney (2008)
 - S2 : Program Biomedik FK UI Jakarta (2008)

f. Pengalaman meneliti

1. Pengaruh hipoksia berkelanjutan terhadap kadar malondialdehid , glutation tereduksi dan aktivitas katalase ginjal tikus (2008)
2. Manfaat dan hambatan metode belajar *Problem-Based Learning* (PBL) menurut perspektif mahasiswa tahun pertama Fakultas Kedokteran Universitas Riau (2009)
3. Faktor-faktor yang mempengaruhi partisipasi mahasiswa dalam proses tutorial pada metode belajar *Problem-Based Learning* (PBL) di Fakultas Kedokteran Universitas Riau (2009)
4. Analisis efek air perasan umbi bawang merah (*Allium ascalonicum* L) pada malondialdehid (MDA) plasma mencit yang diinduksi hiperkolesterolemia (2009).
5. Efek anti bakteri infusa daun jambu biji (*Psidium Guajava* Linn) terhadap Salmonella Typhi secara in vitro (2009)

g. Daftar publikasi

1. Pengaruh hipoksia berkelanjutan terhadap kadar malondialdehid (MDA) ginjal tikus, Jurnal Ilmu Kedokteran (ISSN 1978-662X) Jilid I no 2, 2008
2. Teacher development as a facilitator in Problem-Based Learning (PBL): A literature review, Jurnal Ilmu Kedokteran (ISSN 1978-662X) Jilid I no 2, 2008
3. Manfaat dan hambatan metode belajar *Problem-Based Learning* (PBL) menurut perspektif mahasiswa tahun pertama Fakultas Kedokteran Universitas Riau, Laporan penelitian, 30-10-2009
4. Faktor-faktor yang mempengaruhi partisipasi mahasiswa dalam proses tutorial pada metode belajar *Problem-Based Learning* (PBL) di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Laporan penelitian, 30-10-2009.
5. Analisis efek air perasan umbi bawang merah (*Allium ascalonicum* L) pada malondialdehid (MDA) plasma mencit yang diinduksi hiperkoleterolemia, Laporan penelitian, 30-10-2009
6. Efek anti bakteri infusa daun jambu biji (*Psidium Guajava* Linn) terhadap Salmonella Typhi secara in vitro. Jurnal Ilmu Kedokteran (ISSN 1978-662X) Jilid 3 no 2 September 2009
7. Pengaruh hipoksia berkelanjutan terhadap kadar malondialdehid, glutathion tereduksi dan aktivitas katalase ginjal tikus. Majalah Kedokteran Indonesia (ISSN 0377-1121), Vol 59, no:12, Desember 2009

2. Anggota Peneliti

- a. Nama : dr.Ligat Pribadi Sembiring, Sp.PD
- b. Tempat/tanggal lahir : Medan , 2 Januari 1971
- c. Alamat : Bagian Ilmu Penyakit Dalam FK Unri
: Jl. Diponegoro no 1 Pekanbaru
: No Telp/Fax : 0761-839264/839265
- d. Jabatan : -
- e. Pendidikan S1 : Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara (1996)
Sp.1 : Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara (2006)

f. Pengalaman meneliti

1. Gambaran ILI (Influenza- like-illness) pada jamaah haji provinsi Sumatra Utara (2006)
2. Kadar NT –pro BMP pada sindroma koroner akut (2010)
3. Gambaran kadar glukosa darah dan sindroma metabolik di daerah Panam Pekanbaru.
Asia Pacific of Cancer Prevention Journal(2013)

2. Anggota Peneliti

- a. Nama : dr.Ilhami Romus, Sp.PA
- b. Tempat/tanggal lahir : Pekanbaru , 13 Oktober 1981
- c. Alamat : Bagian Ilmu Patologi Anatomi FK Unri
: Jl. Diponegoro no 1 Pekanbaru
: No Telp/Fax : 0761-839264/839265
- d. Jabatan : -
- e. Pendidikan S1 : Fakultas Kedokteran Universitas Andalas
(2005)
Sp.1 : Fakultas Kedokteran Universitas Gajah
Mada (2014)

f. Pengalaman meneliti

1. Expression of P53 and P63 in cervical squamous cell carcinoma and that association with proliferation cell index morphology and FIGO staging (2013)

g. Daftar publikasi

1. Clinicopathological significancy of P53 and P63 expression in Indonesia cervical squamous cell carcinoma (2014)