e-ISSN: 2654-3257
p-ISSN: 2654-3168

Efek *High Fructose Fat Diet* (HFFD) pada Histologi Aorta Kelinci *New Zealand White* Model Hewan Coba Aterosklerosis

The Effect HFFD On New Zealand White Aorta A Histopatological Study Toward Aterosklerosis

R. Ngt. Samiasih 1, Hertanto S.W 2, Edi Dharmana 3, Hardhono Susanto 4.
Universitas Muhammadiyah Semarang 1, Universitas Diponegoro Semarang 2,3,4
(aminsamiasih@unimus.ac.id), (drhertantows@yahoo.com),
(edidharmana@yahoo.com), (haserra2000@yahoo.com)

Abstrak

Aterosklerosis merupakan penyebab utama kematian pasien DM. Peningkatan kadar *profile lipid* adalah faktor yang berperan dalam meningkatkan risiko Aterosklerosis pada DM. Petanda proses Aterosklerosis pada pasien DM hiperlipidemia yaitu melalui proses inflamasi dan stress oksidatif. DM Hiperlipidemia merangsang peningkatan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid akan mendegradasi lemak dan memperparah stres oksidatif. Stres oksitif merangsang pembentukan LDL teroksidasi dan mengakibatkan endotel mengekspresikan perlekatan monosit dan berubah menjadi makrofag kemudian menempel pada endotel. Selanjutnya makrofag akan memfagositosis LDL teroksidasi, dan terakumulasi pada dinding pembuluh darah membentuk sel busa. Makanan tinggi fruktosa dan lemak akan memicu DM hiperlipidemia. Penelitian ini membuktikan HFFD menstimulus pembentukan plak aterosklerosis pada kelinci *New Zealand White(NZW)* DM Hiperlipidemia. Jenis penelitian eksperimen laboratorik dengan disain *only post test design* terhadap 27 kelinci *New Zealand White* jantan, berat badan 1.500-2.500 gram. Hewan coba dibagi tiga kelompok. Semua kelompok diberi pakan *Champion Rabbit Feed* dan diet HFFD. Kelompok perlakuan 1 dan 2 diberi antiarterosklerosis selama 90 hari, sedangkan kelompok kontrol hanya diberi HFFD tanpa pemberian antiarterosklerosis. Data diolah menggunakan *Ancova test*. Hasil uji *Ancova* menunjukkan ada pengaruh HFFD terhadap penebalan tunika intima p=0,048, terbentuknya sel busa p=0,040, skor keliling aorta p=0,010. Simpulan HFFD menyebabkan gambaran plak aterosklerosis pada histologik aorta kelinci NZW $p<0,05$.

Kata kunci: HFFD, plak aterosklerosis.

Abstract

Atherosclerosis is the main cause of death of DM patients. Increased levels of lipid profiles are factors that play a role in increasing the risk of atherosclerosis in DM. The marker of atherosclerosis process in hyperlipidemic DM patients is through the process of inflammation and oxidative stress. DM Hyperlipidemia stimulates increased lipid peroxidation. Lipid peroxidation will degrade fat and worsen oxidative stress. Positive stress stimulates the formation of oxidized LDL and results in the endothelium expressing monocyte attachment and turning into macrophages then attaching to the endothelium. Furthermore, macrophages will phagocytize oxidized LDL, and accumulate on the walls of blood vessels to form foam cells. Foods high in fructose and fat will trigger DM hyperlipidemia. This study proves that HFFD stimulates atherosclerotic plaque formation in New Zealand White (NZW) rabbits DM Hyperlipidemia. This type of laboratory experiment research was designed only post test design on 27 male New Zealand White rabbits, weighing 1,500-2,500 grams. Try animals divided into three groups. All groups were given Champion Rabbit Feed and HFFD diets. Treatment groups 1 and 2 were given antiarterosclerosis for 90 days, while the control group was only given HFFD without antiarterosclerosis. Data is processed using Ancova test. Ancova test results showed that there was an effect of HFFD on tunica intima thickening $p = 0.048$, foam cell formation $p = 0.040$, aortic circumference score $p = 0.010$. Conclusion of HFFD caused atherosclerotic plaque in histological aorta of rabbit NZW $p < 0.05$.

e-ISSN: 2654-3257
p-ISSN: 2654-3168

***Keywords**: HFFD, atherosclerosis plague*

PENDAHULUAN

Aterosklerosis merupakan Penyakit Jantung Koroner (PJK) yang merupakan penyebab utama kematian pasien DM. Peningkatan kadar *Trigliseride* (TG) dan menurunnya *High-density lipoprotein* (HDL) adalah faktor yang berperan dalam meningkatkan risiko Aterosklerosis pada DM. Parameter pemahaman proses Aterosklerosis pada pasien DM hiperlipidemia yaitu melalui proses inflamasi dan stress oksidatif(Lintong, 2009)

Kondisi DM Hiperlipidemia merangsang peningkatan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid akan mendegradasi lemak sehingga terbentuk *Melondialdehid* (MDA). MDA akan meningkatkan pembentukan ekspresi *Tumour necrosis factor- α* (TNF-α) dan memperparah stres oksidatif. Stres oksidasi merangsang pembentukan LDL teroksidasi(Carvalho, Colaço, & Fortes, 2006; Simanjuntak, 2011) LDL teroksidasi mengakibatkan endotel mengekspresikan perlekatan monosit dan akhirnya berubah menjadi makrofag kemudian menempel pada endotel. Selanjutnya makrofag akan memfagositosis LDL teroksidasi, dan terakumulasi pada dinding pembuluh darah membentuk sel busa(Asni & Hamidy, 2012). CRP yang terdapat dalam dinding arteria akan menginduksi ekspresi molekul adhesi E selectin, VCAM-1 dan ICAM-1 oleh sel endotel pembuluh darah dan akan menginduksi MCP-1 untuk mediasi monosit. CRP akan merangsang LDL untuk masuk kedalam makrofag. Mediator inflamasi diekspresikan oleh sel-sel otot polos ke dalam plak arterosklerosis, yaitu TNFα, CD40 yang selanjutnya akan menyebabkan produksinya IL-6. CRP merangsang sel T CD40 untuk merusak endotel sehingga terbentuklah plak arterosklerosis(Phipps, 2000; Spagnoli, Bonanno, Sangiorgi, & Mauriello, 2007). Proses arterosklerosis karena DM hyperlipidemia dipicu oleh gaya hidup mengkonsumsi makanan yang manis dan berlemak sehingga diperlukan upaya pencegahan yaitu diet rendah fructose dan lemak (Lembong J, Nair R, D C, 2016, Sargowo D. 2002). Artikel ini memaparkan pengaruh HFFD terhadap histologi aorta dengan parameter ketebalan tunika intima, jumlah sel busa.

METODE

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari komisi etik pemeliharaan kesehatan FK UNDIP/RS DR. Kariadi Semarang dengan no 76/EC/HIFK-RSDK/X/2017. Penelitian dilkukan di laboratorium LPPT UGM yang telah terstandarisasi akreditasi nasional KAN dan standar akreditasi internasional KAB dan ISO 9001-9002. Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorik dengan disain *only post test design*. Jumlah sampel penelitian 27 kelinci New Zealand White jantan, berat badan 1.500-2.500 gram. Hewan coba dilakukan adaptasi selama dua minggu. Setelah melalui fase adaptasi selama dua minggu, kemudian dilakukan pemilihan kelompok menggunakan teknik sampling *simple random sampling*. Kelompok perlakuan 1 dan 2 diberikan antiarterosklerosis selama 90 hari, sedangkan kelompok kontrol hanya diberi HFFD tanpa pemberian antiarterosklerosis.

Pakan pelet *Champion Rabbit Feed* dengan komposisi kadar air 12%, protein 18%, kadar lemak 5%, kadar serat kasar 14%, kadar abu 12%, kalsium 0,8-1 % dan posfor 0,6-0,8 %. *High Fructose Fat Diet* (HFFD) pakan standart ditambah *fructose* 50% (*fructose food grade*) dan *ovobell egg yolk powder* dan lemak babi. Pakan ternak ini modifikasi rujukan penelitian. Pakan HFFD 150 g dalam sehari (75 g setiap pemberian) dan minum dilakukan secara *ad libitum* untuk semua kelinci dan diberikan setiap hari selama penelitian(Cani et al., 2008; Sutejo, Rasyada, & Yuniar, 2017; Widyawati, 2013) Diet HFFD pencampuran bahan pakan *champion rabbit feed* gr/kelinci, *ovobell egg yolk*, *fructose food grade*, minyak babi dan air dicampur rata diberikan selama 2 x per hari pagi dan sore. Pemberian diet HFFD

e-ISSN: 2654-3257
p-ISSN: 2654-3168

dimulai setelah masa adaptasi yaitu sampai dengan hari ke-104. Hari ke-104, dilakukan pemeriksaan histologi menggunakan pengecatan *Hematosilin Eosin* untuk mengukur jumlah sel busa, ketebalan tunika intima.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ketebalan tunika intima diukur hanya setelah terminasi hewan coba (post tes). Ketebalan tunika intima pos tes pada kelompok kontrol memiliki rerata paling tinggi dari pada kelompok P1 dan kelompok P2, nilai terendah 0,00 µm dan tertinggi 258,60µm dengan sebaran data berdistribusi normal (p=0,121). Hasil uji *Ancova* menunjukkan rerata ketebalan tunika intima hari ke-104 *p*=0,048. Ada pengaruh perlakuan terhadap ketebalan tunika intima hari ke-104 setelah variabel perancu dikendalikan. Antiarterosklerosis mencegah terbentuknya plak arterosklerosis hal ini terlihat pada kelompok perlakuan P1 dan P2 tidak terjadi penebalan tunika intima dengan rerata 0,000. Antiarterosklerosis dosis 200mg/kg bb dan dosis 400mg/kg bb mempunyai kekuatan yang sama dalam mencegah plak arterosklerosis kelinci NZW diabetes hiperlipidemia.

Tabel 5.9. Rata-rata Ketebalan Tunika intima (µm)

No	Perlakuan	P1	P2	K	*p*
1	Post test	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	84,17 ± 92,48	0,048[1]

P1 uji Acova

p <0,05 signifikan

Jumlah sel busa diukur hanya setelah terminasi hewan coba (post tes). Jumlah sel busa pos tes pada kelompok kontrol memiliki rerata nilai lebih tinggi dari pada kelompok P1, nilai terendah 0,00µm dan tertinggi 231,50µm dengan sebaran data berdistribusi normal (p=0,095). Hasil uji *Ancova* menunjukkan jumlah sel busa hari ke-104 *p*=0,040. Ada pengaruh perlakuan terhadap jumlah sel busa haari ke-104 setelah variabel perancu dikendalikan. Antiarterosklerosis mencegah terbentuknya plak arterosklerosis pada kelompok perlakuan P1 dan P2 tidak terdapat sel busa dengan rerata 0,000. Antiarterosklerosis dosis 200mg/kg bb dan dosis 400mg/kg bb mempunyai kekuatan yang sama dalam mencegah plak arterosklerosis kelinci NZW diabetes hiperlipidemia.

Tabel 1. Rata-rata Jumlah sel busa di aorta

No	Perlakuan	K	P1	P2	*P*
1	Post test	81 ± 89,56	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,040[1]

P1 uji Ancova

p <0,05 signifikan

Skor keliling aorta diukur hanya setelah terminasi hewan coba (post tes). skor keliling aorta pos tes pada kelompok kontrol memiliki rerata nilai lebih tinggi dari pada kelompok P1, nilai terendah 0,00mg/dl dan tertinggi 2,00mg/dl dengan sebaran

e-ISSN: 2654-3257
p-ISSN: 2654-3168

data berdistribusi tidak normal (p=0,037). Hasil uji *Ancova* menunjukkan skor keliling aorta hari ke-104 *p*=0,010. Ada pengaruh perlakuan terhadap skor keliling aorta pada hari ke-104, setelah variabel perancu dikendalikan. Antiarterosklerosis mencegah terbentuknya plak arterosklerosis hal ini terlihat pada kelompok perlakuan P1 dan P2 tidak terdapat skor keliling aorta dengan rerata 0,000. Antiarterosklerosis dosis 200mg/kg bb dan dosis 400mg/kg bb mempunyai kekuatan yang sama dalam mencegah plak arterosklerosis kelinci NZW diabetes hiperlipidemia.

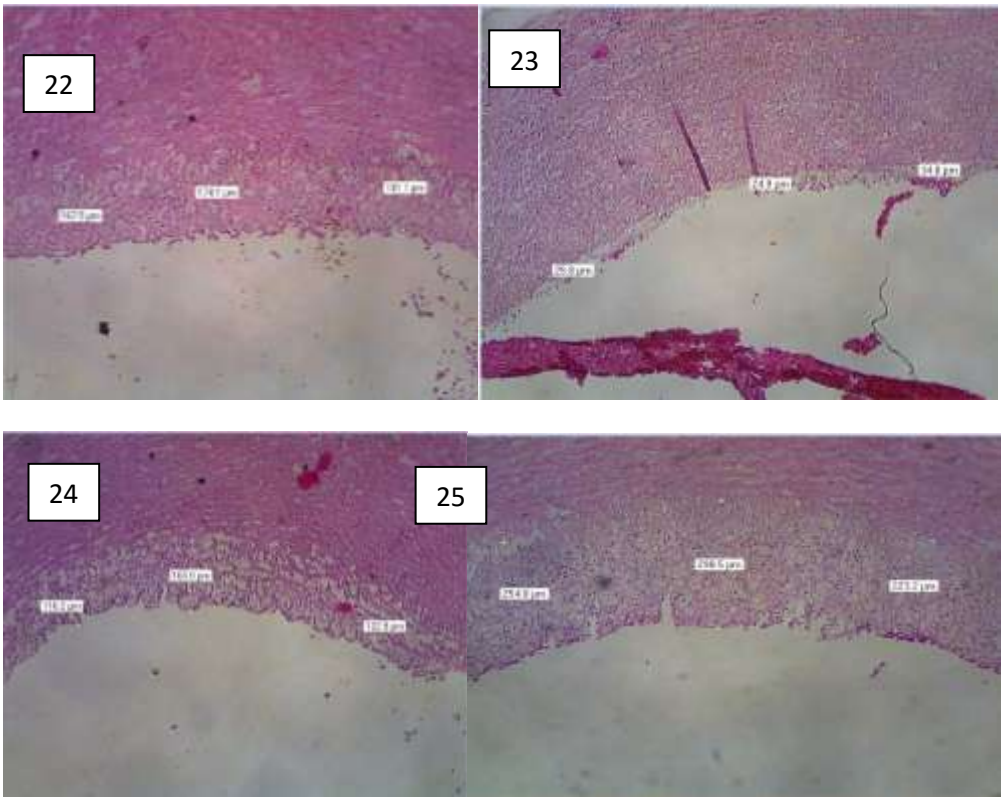
Tabel 2. Rata-rata skor keliling di aorta

No		K	P1	P2	*p*
1	Post test	1,00 ± 0,86	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,010[1]

P[1] uji Ancova

p <0,05 signifikan

Gambar 1. Ketebalan tunika intima pada kelompok kontrol.



e-ISSN: 2654-3257
p-ISSN: 2654-3168

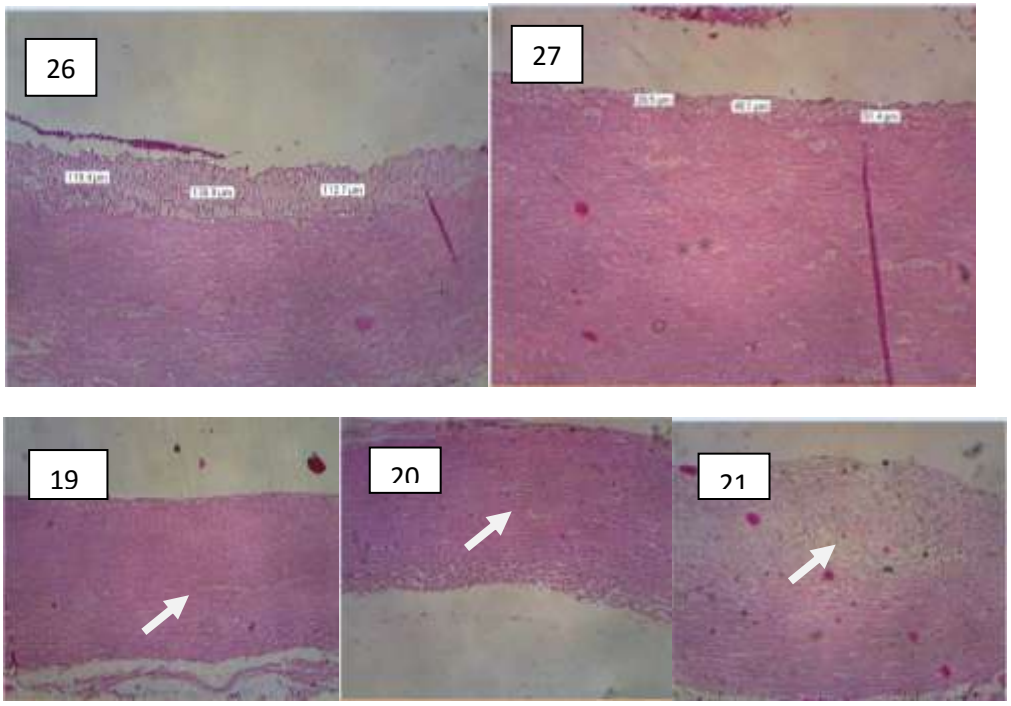


Foto dokumen pribadi

Gambar 1. Gambar histologi ketebalan tunika intima, sel busa dan skor keliling aorta kelompok kontrol jelas sekali terlihat pada sampel preparat kelinci no 22-27. Sedangkan pada no 19-21 terjadi vakuolasis pada tunika media. Pada kelompok perlakuan 1(P1) dan perlakuan 2 (P2) tidak tampak adanya perkembangan sel busa, ketebalan tunika intima dan skor keliling aorta.

Aterosklerosis merupakan penyakit inflamasi, dan proses aterosklerosis dimulai saat LDL terakumulasi di intima sehingga mengaktifkan endotel, meningkatkan pengambilan monosit dan sel T. Monosit berdeferensiasi membentuk makrofag, mengubah lipoprotein akhirnya manjdi sel busa. Sedangkan sel T pada lesi akan mengenali antigen lokal yang berkontribusi pada pebentukan plak. Penebalan pembuluh darah ini ditandai dengan adanya sel busa, yaitu sel makrofag yang berisi kolesterol dan kolesterol ester. Adapun penyebab terbentuknya sel busa antara lain disebabkan oleh makrofag yang secara berlebihan mengambil LDL yang teroksidasi(Yu, Fu, Zhang, Yin, & Tang, 2013; Zhang et al., 2017; Zhao et al., 2012). Diet HFFD pada penelitian ini menyebabkan terjadinya hyperkolesterolemia. Rerata kadar kolesterol, LDL, TG meningkat pada kelompok kontrol.

Hiperkolesterolemia merupakan salah satu agen penyebab teraktivasinya sel endotel pembuluh darah. Terjadinya infiltrasi dan retensi LDL di dalam intima akan menginisiasi respon radang terhadap dinding pembuluh darah. Modifikasi LDL oleh oksidasi maupun reaksi enzimatis pada intima pembuluh darah, akan melepaskan fosfolipid yang dapat mengaktifkan selsel endotel dalam mengekspresikan molekul adhesi. Partikel LDL termodifikasi kemudian ditangkap reseptor makrofag *scavenger* tanpa pengaturan, dan pada akhirnya terbentuklah sel-sel busa. Setiap kali terjadi inisiasi aterosklerosis, mediator-mediator radang diekpresikan oleh sel-sel otot polos ke dalam plak aterosklerosis, yang meliputi *interleukin*-1B (IL-B), *tumor necrosis factor* (TNFa-ß), IL-6, M-CSF, MCP-1, IL18, dan CD-40L. Hasil penelitian

e-ISSN: 2654-3257
p-ISSN: 2654-3168

ini menunjukkan peningkatan rerata IL-6 terjadi pada kelompok kontrol. Kondisi ini menyebabkan efek yang ditimbulkan oleh mediator dapat bermacam-macam, seperti mitogenesis, proliferasi matrik intraseluler, angiogenesis dan perkembangan sel busa. Molekul M-CSF merangsang reseptor *scavenger* pada permukaan sel makrofag, sehingga pengambilan LDL teroksidasi meningkat, yang pada akhirnya membentuk sel-sel busa busa. Jumlah sel busa pos tes pada kelompok kontrol memiliki rerata nilai lebih tinggi dari pada kelompok O1, nilai terendah 0,00µm dan tertinggi 231,50µm dengan sebaran data berdistribusi normal (p=0,095).

Inflamasi memperlihatkan peran yang signifikan terhadap proses arterosklerosis. CRP merupakan salah satu pertanda inflamasi. Beberapa penelitian membuktikan adanya peningkatan kadar CRP pada pasien arterosklerosis. Peningkatan CRP berhubungan dengan ikatan partikel CRP dan LDL pada plak. Arterosklerosis yang mengaktivasi komplemen petanda proinflamasi yang berperan pada arteroma. Proinflamasi berperan meningkatkan iskemia yang akan merusak jaringan melalui mekanisme komplemen(Spagnoli et al., 2007)

Arterosklerosis adalah penyakit inflamasi sistemik yang dikarakteristikkan oleh akumulasi makrofag dan lymphosit di tunika intima. Erosi atau rupturnya lesi menginisiasi aktivasi platelet dan agregasi di permukaan plak sehingga terjadi disfungsi endothel. LDL teroksidasi merupakan kunci disfungsi dan injuri endothel. LDL di ruang subendothel menyebabkan oksidasi yang progresif dan mengaktivasi makrophague chemotactic protein I (MCP-I) dan *makrophague colony stimulating factor* (M-SP) di dalam endothel. MCP-I dan M-SP mendukung maturasi monosit menjadi makrofag melalui OX LDL. OX LDL merupakan reseptor makrofag dalam pembentukan sel busa(Gujral et al., 2016; Lievens et al., 2010; Spagnoli et al., 2007; Yu et al., 2013; Yuan, Li, & Ye, 2012; Zhao et al., 2012)

KESIMPULAN

Berdasarkan analisis data dan gambaran hsitologik aorta kelinci NZW yang diberikan diet HFFD selama 90 hari, Ada pengaruh pemberian HFFD terhadap plak aterosklerosis.

DAFTAR PUSTAKA

Asni, E., & Hamidy, M. Y. (2012). Pengaruh Air Perasan Umbi Bawang Merah (Allium ascalonicum L.) terhadap Malondialdehid (MDA) Plasma Mencit yang diinduksi Hiperkolesterolemia. *Jurnal Natur Indonesia, 14*(02).

Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., & Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet–induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes, 57*(6), 1470-1481.

Carvalho, M. H. C. d., Colaço, A. L., & Fortes, Z. B. (2006). Cytokines, endothelial dysfunction, and insulin resistance. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 50*(2), 304-312.

Gujral, D. M., Shah, B. N., Chahal, N. S., Bhattacharyya, S., Hooper, J., Senior, R., . . . Nutting, C. M. (2016). Carotid intima-medial thickness as a marker of radiation-induced carotid atherosclerosis. *Radiother Oncol, 118*(2), 323-329. doi: 10.1016/j.radonc.2015.11.025

Lievens, D., Zernecke, A., Seijkens, T., Soehnlein, O., Beckers, L., Munnix, I. C., . . . Lutgens, E. (2010). Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood, 116*(20), 4317-4327. doi: 10.1182/blood-2010-01-261206

Lintong, P. (2009). Perkembangan konsep patogenesis aterosklerosis. *Jurnal Biomedik, 1*(1).

e-ISSN: 2654-3257
p-ISSN: 2654-3168

Phipps, R. P. (2000). Atherosclerosis: the emerging role of inflammation and the CD40–CD40 ligand system. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 97*(13), 6930-6932.

Simanjuntak, K. (2011). Pengaruh diet tinggi lipid terhadap timbulnya penyakit. *Bina Widya, 4*(22), 191-199.

Spagnoli, L. G., Bonanno, E., Sangiorgi, G., & Mauriello, A. (2007). Role of inflammation in atherosclerosis. *J Nucl Med, 48*(11), 1800-1815. doi: 10.2967/jnumed.107.038661

Sutejo, I. R., Rasyada, I., & Yuniar, A. (2017). Antihiperlipidemi and Atheroprotective activity of Kepuh (Sterculia foetida) Leaves Ethanolic Extract on High-Fat-Diet Rat Models. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences, 3*(1), 44-49.

Widyawati, M. S. (2013). *Pengaruh pemberian diet tinggi lemak terhadap jumlah makrofag dan kadar tnf-a pada tikus putih galur wistar [CD-ROM].* Widya Mandala Catolic University Surabaya.

Yu, X.-H., Fu, Y.-C., Zhang, D.-W., Yin, K., & Tang, C.-K. (2013). Foam cells in atherosclerosis. *Clinica chimica acta, 424*, 245-252.

Yuan, Y., Li, P., & Ye, J. (2012). Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis. *Protein & cell, 3*(3), 173-181.

Zhang, H., Liu, Q., Lin, J., Wang, Y., Zhang, R., Hou, J., & Yu, B. (2017). Recombinant Human Thioredoxin-1 Protects Macrophages from Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Foam Cell Formation and Cell Apoptosis. *Biomolecules & therapeutics*.

Zhao, J. F., Ching, L. C., Huang, Y. C., Chen, C. Y., Chiang, A. N., Kou, Y. R., . . . Lee, T. S. (2012). Molecular mechanism of curcumin on the suppression of cholesterol accumulation in macrophage foam cells and atherosclerosis. *Molecular nutrition & food research, 56*(5), 691-701.