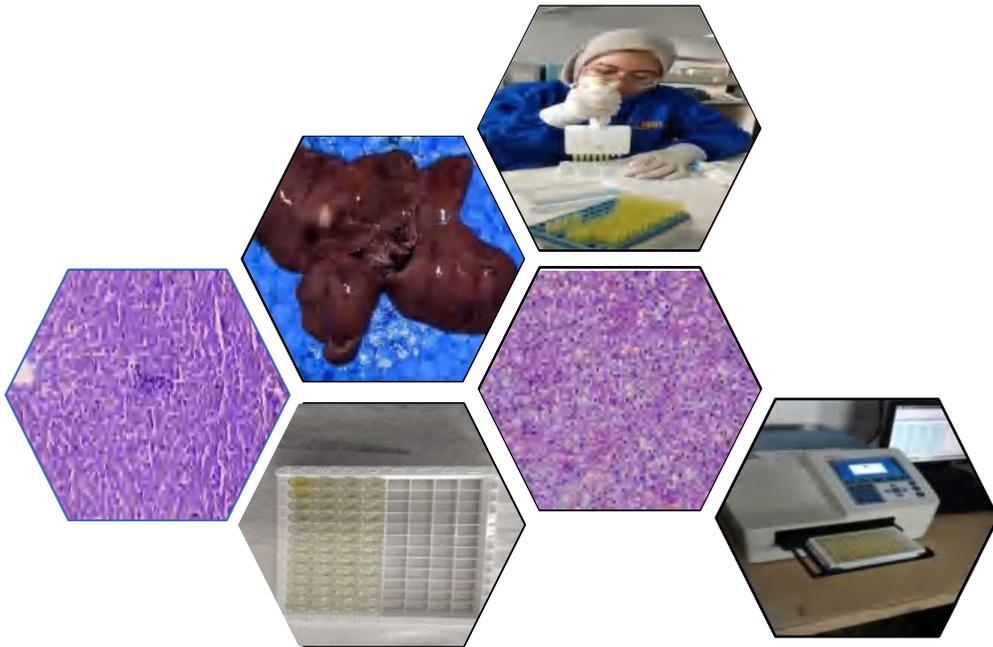


## TESIS

**EFEK SUPLEMENTASI PROBIOTIK *L. PLANTARUM* DAD-13 TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR DAN KADAR LPS-BINDING PROTEIN SERUM PADA TIKUS SPRAGUE-DAWLEY MODEL NAFLD**

***. BENEFICIAL EFFECTS OF PROBIOTIC SUPPLEMENTATION (LACTOBACILLUS PLANTARUM DAD-13) ON SERUM LPS-BINDING PROTEIN LEVELS AND LIVER HISTOPATHOLOGICAL FEATURES IN NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE (NAFLD) MODEL SPRAGUE-DAWLEY RATS***



**HANAN AFIFAH**

**P062212021**

**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR**

**2024**



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

**EFEK SUPLEMENTASI PROBIOTIK *L. PLANTARUM DAD-13*  
TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR DAN KADAR LPS-  
BINDING PROTEIN SERUM PADA TIKUS *SPRAGUE-DAWLEY* MODEL  
NAFLD**

**HANAN AFIFAH**

**P062212021**



**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR**

**2024**



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

**EFEK SUPLEMENTASI PROBIOTIK *L. PLANTARUM DAD-13*  
TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR DAN KADAR LPS-  
BINDING PROTEIN SERUM PADA TIKUS *SPRAGUE-DAWLEY* MODEL  
NAFLD**

TESIS

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi  
Ilmu Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

**HANAN AFIFAH**

**P062212021**

Kepada

**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

# HALAMAN PENGESAHAN

TESIS

EFEK SUPLEMENTASI PROBIOTIK L. PLANTARUM DAD-13  
TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR DAN KADAR LPS-  
BINDING PROTEIN SERUM PADA TIKUS SPRAGUE-DAWLEY MODEL  
NAFLD

HANAN AFIFAH  
P062212021

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Magister pada tanggal  
15 Agustus 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada  
Program Studi Magister Ilmu Biomedik  
Sekolah Pasca Sarjana  
Universitas Hasanuddin  
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing Utama,

Prof. dr. Rahmawati, Ph.D., Sp. PD-KHOM, FINASIM  
NIP. 19680218 199903 2 002

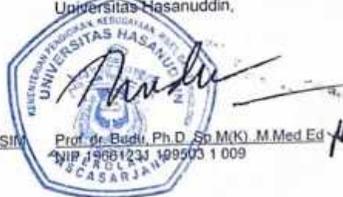
Pembimbing Pendamping,

Prof. dr. Agusman Bahari, M. Clin. Med., Ph.D., Sp. GK(K)  
NIP. 19700821 199903 1 001

Ketua Program Studi  
Ilmu Biomedik,

Prof. dr. Rahmawati, Ph.D., Sp. PD-KHOM, FINASIM  
NIP. 19680218 199903 2 002

Dekan Fakultas/Sekolah Pascasarjana  
Universitas Hasanuddin,



Prof. dr. Budin, Ph.D., Sp. M(K), M. Med. Ed.  
NIP. 19661231 199503 1 009



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "Efek Suplementasi Probiotik *L. Plantarum* Dad-13 terhadap Gambaran Histopatologi Hepar dan Kadar LPS-Binding Protein Serum pada Tikus Sprague-Dawley Model NAFLD" adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing Prof. dr. Rahmawati Minhajat., Ph.D., Sp.PD-KHOM., FINASIM. sebagai Pembimbing Utama dan Prof. dr. Agussalim Bukhari., M.Clin.Med., Ph.D., Sp.GK(K). sebagai Pembimbing Pendamping. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah disubmit dengan status *under reviewed* pada Bioscience of Microbiota, Food and Health (BMFH) sebagai artikel dengan judul "Beneficial Effects of Probiotic Supplementation (*Lactobacillus Plantarum* Dad-13) on Serum LPS-Binding Protein Levels and Liver Histopathological Features in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Model Sprague-Dawley Rats". Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 15 Agustus 2024  
Yang menyatakan,



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## UCAPAN TERIMAKASIH

Alhamdulillahirabbil'alamin. Rasa syukur saya panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat, hidayah, dan karunia-Nya, sehingga saya dapat menyusun dan menyelesaikan tesis yang berjudul **“EFEK SUPLEMENTASI PROBIOTIK L. PLANTARUM DAD-13 TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI HEPAR DAN KADAR LPS-BINDING PROTEIN SERUM PADA TIKUS SPRAGUE-DAWLEY MODEL NAFLD”** penulis akhirnya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada **Prof. dr. Rahmawati Minhajat., Ph.D., Sp.PD-KHOM., FINASIM.** sebagai pembimbing utama dan **Prof. dr. Agussalim Bukhari., M.Clin.Med., Ph.D., Sp.GK(K).** sebagai pembimbing pendamping, serta kepada tim penguji tesis saya **dr. Sitti Wahyuni., Ph.D., Sp.Par.K;** **dr. M. Husni Cangara., Ph.D., Sp.PA., DFM;** dan **Dr. dr. Mirna Muis, Sp.Rad** yang telah memberi kesediaan waktu, saran serta bimbingan sejak masa perkuliahan hingga penyusunan tesis ini. Ucapan terima kasih juga saya ucapkan kepada pimpinan Universitas Hasanuddin dan Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin yang telah memfasilitasi saya menempuh program magister serta para dosen program magister ilmu Biomedik dan staf akademik.

Kepala Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin beserta staf, Kepala HUM-RC, Laboratorium Patologi Anatomi, dan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin beserta staf, yang telah mengizinkan dan membantu penulis untuk menyelesaikan proses penelitian ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Kepala Unit Penelitian Fakultas Kedokteran UNHAS beserta staf yang telah memberi izin dan membantu dalam proses pemeriksaan sampel untuk penelitian ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada kedua orang tua, suami, dan anak kami atas kesabaran dan dukungan yang tak terhingga kepada penulis. Terima kasih atas kepercayaan dan pengorbanan yang telah diberikan kepada penulis selama masa perkuliahan. Dan terakhir kepada teman – teman S2 Ilmu Biomedik angkatan 2021, yang saya banggakan atas semua ilmu dan bantuannya selama proses perkuliahan. Demikianlah dari penulis, mohon maaf dan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu penulis baik secara langsung maupun tidak langsung yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu. Semoga Allah Subhanahu wata'ala senantiasa membalas kebaikan kalian semua dan semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi kita semua. Aamiin.

Penulis,



Hanan Afifah

## ABSTRAK

Hanan Afifah. **Efek Suplementasi Probiotik L. Plantarum Dad-13 terhadap Gambaran Histopatologi Hepar dan Kadar LPS-Binding Protein Serum pada Tikus Sprague-Dawley Model NAFLD** (dibimbing oleh Rahmawati Minhajat dan Agussalim Bukhari).

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) merupakan suatu kelainan hepar berupa perlemakan hati (steatos) yang terjadi bukan karena penyebab sekunder seperti alkohol dan obat-obatan. Lipopolysaccharide binding protein (LBP) merupakan protein fase akut yang disintesis dalam hepatosit hepar sebagai respons terhadap peningkatan lipopolisakarida (LPS). Penelitian ini bertujuan untuk menguji efektifitas suplementasi probiotik L. Plantarum Dad-13 terhadap kadar LBP serum dan gambaran histopatologi hepar tikus Sprague-Dawley model NAFLD yang diinduksi diet tinggi lemak-tinggi fruktosa selama 6 minggu. Penelitian ini menggunakan post test only control group design. Sampel 20 ekor tikus dibagi dalam tiga kelompok: diet standar (diet standar+air), HFFr (diet tinggi lemak-tinggi fruktosa), HFFr+Probiotik (diet tinggi lemak-tinggi fruktosa+probiotik L. Plantarum Dad-13). Pemeriksaan kadar LBP serum menggunakan Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), data dianalisa menggunakan uji ANOVA. Hasil kadar LBP serum menunjukkan serum kelompok HFFr+Probiotik mendekati kadar kelompok diet standar ( $p>0.05$ ) dan secara signifikan lebih rendah dibandingkan kelompok HFFr ( $p<0.01$ ). Pemeriksaan histopatologi hepar menunjukkan kelompok standar dan HFFr+Probiotik hanya terdapat inflamasi lobular, sedangkan HFFr mengembangkan NASH (statisis, inflamasi lobular, dan degenerasi balon). NAFL Activity Score (NAS) berbeda signifikan antar kelompok HFFr dan HFFr+Probiotik ( $p<0.01$ ). Disimpulkan bahwa probiotik L. Plantarum Dad-13 mampu menurunkan kadar LBP serum dan memperbaiki histopatologi hepar pada NAFLD.

**Kata Kunci :** NAFLD, NASH, L. Plantarum Dad-13, LBP, diet tinggi lemak dan tinggi fruktosa.

 <b>GUGUS PENJAMINAN MUTU (GPM) SEKOLAH PASCASARJANA UNHAS</b>	
Abstrak ini telah diperiksa.	Paraf Ketua / Sekretaris.
Tanggal : _____	



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## ABSTRACT

Hanan Afifah. **Beneficial Effects of Probiotic Supplementation (Lactobacillus Plantarum Dad-13) on Serum LPS-Binding Protein Levels and Liver Histopathological Features in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Model Sprague-Dawley Rats** (supervised by Rahmawati Minhajat and Agussalim Bukhari).

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a hepatic disorder characterized by fatty liver (steatosis) that is not due to secondary causes such as alcohol or drugs. Lipopolysaccharide binding protein (LBP) is an acute-phase protein synthesized in hepatocytes in response to increased lipopolysaccharide (LPS). This study aims to evaluate the effectiveness of probiotic supplementation with *L. plantarum* Dad-13 on serum LBP levels and hepatic histopathology in a Sprague-Dawley rats model of NAFLD induced by a high-fat, high-fructose diet for 6 weeks. This study used a post-test-only control group design. Twenty rats were divided into three groups: a standard diet group (standard diet + water), an HFFr group (high-fat, high-fructose diet), and an HFFr + Probiotic group (high-fat, high-fructose diet + *L. plantarum* Dad-13 probiotic). Serum LBP levels were examined using an Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA), and the data were analyzed using an ANOVA test. The results showed that serum LBP levels in the HFFr + Probiotic group were close to the levels in the standard diet group ( $p > 0.05$ ) and significantly lower than those in the HFFr group ( $p < 0.01$ ). Hepatic histopathology examination revealed that the standard diet and HFFr + Probiotic groups only exhibited lobular inflammation. In contrast, the HFFr group developed non-alcoholic steatohepatitis (NASH), characterized by steatosis, lobular inflammation, and ballooning degeneration. The NAFLD Activity Score (NAS) was significantly different between the HFFr and HFFr + Probiotic groups ( $p < 0.01$ ). In conclusion, *L. plantarum* Dad-13 probiotic supplementation reduced serum LBP levels and improved hepatic histopathology in NAFLD.

**Keywords:** NAFLD, NASH, *L. plantarum* Dad-13, LBP, High-Fat High-Fructose Diet.

	
<b>GUGUS PENJAMINAN MUTU (GPM) SEKOLAH PASCASARJANA UNHAS</b>	
Abstrak ini telah diperiksa.	Paraf Ketua / Sekretaris.
Tanggal : _____	



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
PERNYATAAN PENGAJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA.....	Error! Bookmark not defined.
UCAPAN TERIMAKASIH.....	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR SINGKATAN.....	xii
BAB I.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Tujuan Penelitian.....	7
1.3.1 Tujuan Umum.....	7
1.3.2 Tujuan Khusus.....	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	7
1.4.2 Manfaat Praktis.....	7
1.5 Novelty dan Penelitian Pendukung.....	7
1.6 Kerangka Teori.....	10
1.7 Kerangka Konsep.....	11
1.8 Hipotesis.....	11
1.9 Definisi Operational.....	11
1.10 Alur Penelitian.....	13
BAB II.....	14
2.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	14
2.1.1 Waktu Penelitian.....	14
2.1.2 Lokasi Penelitian.....	14
2.2 Desain Penelitian.....	14
2.2.1 Populasi dan Sampel Penelitian.....	14
2.2.2 Populasi Penelitian.....	14
2.2.3 Sampel Penelitian.....	14
2.3 Alat dan Bahan.....	15
.....	15
.....	15
.....	16
.....	16
.....	16
.....	18



2.5 Analisis Data.....	22
2.6 Izin Penelitian dan Kelayakan Etik.....	22
BAB III.....	23
3.1 Efek Probiotik <i>L. plantarum</i> Dad-13 Terhadap Asupan Harian.....	23
3.2 Efek Probiotik <i>L. plantarum</i> Dad-13 Terhadap Berat Badan (BB) Tikus.....	24
3.3 Efek Probiotik <i>L. plantarum</i> Dad-13 terhadap LPS-Binding Protein Serum.....	27
3.4 Efek Probiotik <i>L. plantarum</i> Dad-13 terhadap Kadar ALT dan AST Serum.....	27
3.5 Efek Probiotik <i>L. plantarum</i> Dad-13 terhadap Berat Hepar.....	28
3.6 Efek Probiotik <i>L. plantarum</i> Dad-13 terhadap Histopatologi Hepar.....	28
BAB IV.....	31
4.1 Efek Probiotik <i>L. plantarum</i> Dad-13 Terhadap Jumlah Asupan.....	31
4.2 Efek Probiotik <i>L. plantarum</i> Dad-13 Terhadap Berat Badan.....	31
4.3 Efek Probiotik <i>L. plantarum</i> Dad-13 Terhadap Kadar LBP Serum.....	32
4.4 Efek Probiotik <i>L. plantarum</i> Dad-13 Terhadap Kadar AST dan ALT Serum.....	33
4.5 Efek Probiotik <i>L. plantarum</i> Dad-13 Terhadap Berat Hepar.....	34
4.6 Efek Probiotik <i>L. plantarum</i> Dad-13 Terhadap Histopatologi Hepar.....	35
BAB V.....	38
5.1 Kesimpulan.....	38
5.2 Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA.....	39



## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Definisi Operasional.....	11
Tabel 2. NAFLD Activity Score (NAS).....	22
Tabel 3. Pengaruh terhadap rerata asupan pada minggu ke-1 hingga ke-12. ....	23
Tabel 4. Pengaruh terhadap rerata asupan pada minggu ke-13 hingga ke-19.....	23
Tabel 5. Pengaruh terhadap rerata berat badan (BB) pada 12 minggu awal.....	25
Tabel 6. Pengaruh terhadap berat badan (BB) pada minggu ke-13 hingga ke-19.....	26
Tabel 7. Pengaruh terhadap kadar LBP serum pada minggu ke-19. ....	27
Tabel 8. Pengaruh terhadap kadar AST dan ALT serum pada minggu ke-19. ....	27
Tabel 9. Pengaruh terhadap rerata berat hepar.....	28
Tabel 10. Perbandingan Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Activity Score (NAS).....	29



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Hipotesis Multiple Hit.....	2
Gambar 2. Peran probiotik dalam perbaikan NAFLD.....	6
Gambar 3. Kerangka Teori .....	10
Gambar 4. Kerangka Konsep Penelitian.....	11
Gambar 5. Alur Kerja Penelitian.....	13
Gambar 6. Grafik perbandingan jumlah kalori total yang dikonsumsi tikus sebelum dan sesudah pemberian probiotik.....	24
Gambar 7. Dinamika perubahan berat badan tikus sebelum dan sesudah pemberian probiotik. ....	26
Gambar 8. Tampilan grafik perbandingan kadar LBP, AST, dan ALT serum antar kelompok standar, HFFr, dan HFFr+probiotik pada minggu ke-19 .....	28
Gambar 9. Pengaruh suplementasi probiotik <i>L. plantarum</i> Dad-13 terhadap gambaran histologis hepar.....	29
Gambar 10. Grafik perbandingan persentase steatosis (%) antar kelompok.....	30



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## DAFTAR SINGKATAN

Lambang/Singkatan	Keterangan/Arti
NAFLD	Non Alcoholic Fatty Liver
NASH	Non Alcoholic Steatohepatitis
BMI	<i>Body Massa Index</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
FFA	<i>Free Fatty Acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RE	<i>Retikulum Endoplasma</i>
LPS	<i>Lipopolisakarida</i>
TLR	<i>Tol Like Receptor</i>
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
DM	Diabetes Melitus
DAMPs	<i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
LBP	<i>Lipopolysaccharide Binding Protein</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
TG	<i>Trigliserida</i>
HCS	<i>Hepar Stellata Cell</i>
FAS	Fatty Acid Synthase
SCD1	Stearoyl-CoA Desaturase 1
GIP	<i>Gastric Inhibitory Polypeptide</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like Peptide-1</i>
ACC	<i>Acetyl-CoA Carboxylase</i>
APK	Activated Protein Kinase
MTTP	<i>Microsomal Triglyceride Transfer Protein</i>
IRS	<i>Substrat Receptor Insulin</i>
MMPs	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
ChREBP	<i>Carbohydrate Response Element Binding Protein</i>
NADPH	
SREBP-1	<i>Nikotinamida Adenin Dinukleotida Fosfat Sterol Regulatory Element Binding Protein-1</i>
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor</i>
HSC	<i>Hepatic Stellate Cell</i>
TLR4	Toll Like Receptor-4
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
TIMP	Tissue Inhibitor Matrix Metalloproteinase
IF	<i>Intermittent Fasting</i>
MDB	Mallory Denk Bodies
SGLT-2	<i>Sodium Glucose co-Transporter</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer
TTGO	<i>Of Activated B Cells Toleransi glukosa oral United Kingdom Prospective Study High Fat Diet</i>
	<i>Enzyme Like Immunosorbent Assay</i>



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Berdasarkan American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) yang juga dikenal sebagai metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD) merupakan suatu kelainan hepar berupa perlemakan hati atau steatos yang dipastikan melalui biopsi hepar dan terjadi bukan karena penyebab sekunder seperti alkohol dan obat-obatan (Chalasan et al., 2012). NAFLD merupakan satu dari sekian banyak konsekuensi metabolik yang disebabkan oleh pergeseran pola diet. Saat ini terjadi transisi nutrisi berupa westernisasi pola diet yang ditandai dengan asupan tinggi gula, lemak, dan garam, serta rendah serat, yang merupakan ciri khas dari makanan olahan serta makanan dalam kemasan. Hal ini berakibat pada obesitas dengan segala komplikasinya (Colozza & Avendano, 2019).

Fenomena transisi nutrisi ini berjalan beriringan dengan pernyataan konsensus yang diterbitkan pada tahun 2021, yang menyoroti fakta bahwa sebagian besar negara-negara di dunia tidak memiliki strategi nasional untuk penanganan NAFLD, dimana hal ini mencerminkan rendahnya prioritas penyakit ini dalam agenda kesehatan nasional (Huang et al., 2023). Secara global, kasus NAFLD diperkirakan terjadi sebanyak 46.9 kasus per 1000 populasi (Riazi et al., 2022). Sebuah studi meta-analisis yang dilakukan oleh Li et al (2019) menunjukkan prevalensi NAFLD di Indonesia adalah 30.6%, lebih tinggi dari Sri Lanka (24.74%) dan China (29.88%) (Riazi et al., 2022; Y. Wu et al., 2020). Sebagian besar kasus NAFLD umumnya terjadi pada populasi dengan berat badan berlebih dan obesitas, namun bukan berarti populasi dengan tubuh lean atau non-obesitas tidak akan mengalami NAFLD. Estimasi terbaru menunjukkan bahwa sebesar 19.2% kasus NAFLD merupakan pasien dengan tubuh lean, dan 40.8% adalah non-obesitas (Chan, 2023).

NAFLD sering kali bersifat asimtomatik hingga tahap dimana telah terjadi kerusakan hepar yang berat, dan pada akhirnya akan memperburuk prognosis (Kuchay et al., 2021). NAFLD diklasifikasikan menjadi *Non-Alcoholic Fatty Liver* (NAFL) atau *Non-Alcoholic Steatohepatitis* (NASH), yang merupakan penyakit yang heterogen, dimana NAFLD dapat meningkatkan morbiditas dan mortalitas hepatis maupun non-hepatis (Khan et al., 2022). Steatosis yang tidak ditangani secara cepat dan memadai, akan berkembang menjadi NASH pada 15-20% kasus, yang kemudian akan memicu inflamasi lobular, degenerasi balon, dan fibrogenesis (Khan et al., 2022). Sebesar 5% dari total

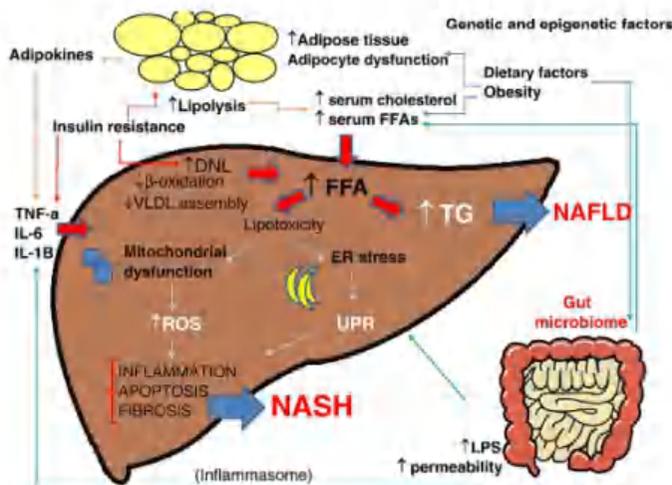


FLD akan berkembang menjadi sirosis hepar dengan mortalitas layani et al., 2019).

Patofisiologi NAFLD baik pada kondisi obesitas maupun non-obesitas dipelajari, namun dari beberapa penelitian dapat diketahui bahwa Indeks Massa Tubuh (BMI) tidak mencapai obesitas, pasien NAFLD non-obesitas memiliki lemak viseral yang berlebih, dimana jaringan adiposa viseral yang terbesar asam lemak bebas sirkulasi (60%) (Chan, 2023; Pada dasarnya, patofisiologi NAFLD non obesitas dengan NAFLD non-obesitas hampir sama, keduanya didasari oleh akumulasi free fatty acids (FFA) di dalam hepar dan dapat dipengaruhi oleh adanya resistensi insulin, disfungsi adipositas,

serta gaya hidup tinggi kalori dan aktivitas fisik rendah (Kuchay et al., 2021).

Saat ini, teori *two hit hypothesis* yang biasanya digunakan untuk menjelaskan patofisiologi terjadinya NAFLD dianggap sudah tidak relevan (Jasirwan et al., 2019). *Multiple-hit* dalam pengembangan NAFLD melibatkan banyak faktor lingkungan seperti pola diet yang tinggi kalori, serta kecenderungan genetik terhadap NAFLD. Seluruh faktor tersebut dapat berkontribusi pada pengembangan resistensi insulin, obesitas, disfungsi jaringan adiposa, serta disbiosis mikrobiota usus, dimana seluruhnya merupakan faktor yang terlibat secara langsung dalam pengembangan dan progresifitas penyakit. Selain dari faktor tersebut, faktor-faktor yang melibatkan proses intraseluler seperti *intracelluelar crosstalk* antara hepatosit, sel Kupffer, dan *Hepar Stellata Cell* (HCS) atau sel Ito terlibat dalam patogenesis NASH (Gerges et al., 2021).



Gambar 1. Hipotesis Multiple Hit (Buzzetti et al., 2016).

Mekanisme yang memungkinkan terjadinya NAFLD secara multifaktorial adalah sebagai berikut:

a. Penyerapan asam lemak

Perlu diketahui bahwa melalui aliran vena porta, hepar menerima darah dari gastrointestinal sebesar 75%. Hal ini menyebabkan hepar sangat rentan terhadap steatosis yang diinduksi oleh diet (Cohen et al., 2011; Fielding, 2011). Trigliserida dari makanan dihidrolisis oleh lipase dan diemulsi oleh asam empedu di usus, menghasilkan sn2-monoasilgliserol dan asam lemak (Cohen et al., 2011; Fielding, 2011). Lipid ini kemudian diserap oleh enterosit dan disintesis ulang menjadi trigliserida, yang dikemas dalam kilomikron dan disekresikan ke sistem limfatik hingga mencapai plasma (Lian et al., 2020; Xenoulis & Steiner, 2010). Lipoprotein lipase (LPL) membantu penyerapan n oleh jaringan adiposa dan otot. Diet tinggi lemak dapat bkan resistensi insulin, meningkatkan asam lemak bebas serum, osorpsi oleh hati dan disimpan sebagai trigliserida dalam tetesan 1 et al., 2020; Xenoulis & Steiner, 2010).



Optimized using trial version www.balesio.com

sis *de novo*

sis *de novo* adalah proses sintesis lipid endogen dari diet, meliputi p: sintesis asam lemak, desaturasi asam lemak, dan produksi a. Proses ini meningkat dengan ambilan glukosa dan peningkatan insulin, yang mengaktifkan faktor transkripsi seperti SREBP-1c dan ChREBP, yang kemudian memicu ekspresi gen terkait sintesis asam lemak,

seperti ACC, FAS, dan SCD1 (Lian et al., 2020). ChREBP juga meningkatkan piruvat kinase hepar, meningkatkan fluks glikolitik dan menyediakan lebih banyak substrat untuk sintesis asam lemak dan trigliserida. Akumulasi lipid abnormal pada NAFLD sering dikaitkan dengan peningkatan DNL (Lian et al., 2020).

c. Oksidasi asam lemak

Oksidasi asam lemak terjadi di mitokondria, peroksisom, dan mikrosom, dengan mitokondria sebagai lokasi utama untuk produksi ATP, terutama saat glukosa rendah. Pada kondisi kelebihan lipid,  $\omega$ -oksidasi di sitokrom turut berperan, seperti pada NAFLD, tetapi juga menghasilkan ROS berlebih, stres oksidatif, dan asam dikarboksilat toksik yang memicu peradangan. AMPK, yang diaktifkan saat energi rendah, memfosforilasi dan menekan ACC, mengurangi malonyl-CoA, dan meningkatkan oksidasi asam lemak di mitokondria, membantu memulihkan keseimbangan energi (Lian et al., 2020).

d. Sintesis dan sekresi VLDL

Ekspor trigliserida melalui VLDL membantu menurunkan kadar lipid di hati. Asam lemak dikemas dalam VLDL bersama kolesterol, fosfolipid, dan apolipoprotein sebelum diekskresikan. VLDL dihasilkan di RE, di mana apoB100 dilipidisasi oleh MTTP, lalu dikirim ke aparatus Golgi untuk pematangan. Meskipun asam lemak meningkatkan produksi apoB100, paparan jangka panjang dapat menyebabkan stres RE dan kerusakan apoB100, mengurangi produksinya dan menghubungkan stres RE dengan NAFLD. Pada pasien steatosis, VLDL-TG yang lebih besar dihasilkan, tetapi ukuran besar ini dapat menghambat sekresi, menyebabkan akumulasi lipid dan memperburuk NAFLD.

e. Resistensi Insulin

Insulin, yang disekresikan oleh sel beta pankreas, mengatur glukosa darah dengan memfasilitasi penyerapan glukosa di hepar, otot, dan jaringan adiposa. Insulin meningkatkan glikogenesis dan lipogenesis di hepar serta lipogenesis di adiposit. Mekanisme ini melibatkan aktivasi reseptor insulin dan fosforilasi target hilir seperti IRS, PI3K, dan Akt.

Resistensi insulin terjadi ketika tubuh tidak merespons insulin dengan baik, meskipun kadar insulin mungkin normal atau meningkat. Ini bisa disebabkan oleh faktor genetik atau lingkungan dan menyebabkan pankreas memproduksi lebih banyak insulin untuk mengatasi gangguan metabolisme glukosa dan glukoneogenesis.

Pada resistensi insulin, FFA yang tinggi meningkatkan efluks ke hepar, yang memperburuk kondisi dengan meningkatkan lipotoksitas dan stres

Resistensi insulin mengganggu fosforilasi tirosin insulin, menyebabkan gangguan dalam metabolisme glukosa dan lipid, serta meningkatkan DNL (de novo lipogenesis) tanpa mengurangi akumulasi asam lemak bebas, yang berdampak pada steatosis dan NASH.

Asam lemak bebas di hepar, yang sering tidak bersifat hepatotoksik, melindungi dari akumulasi asam lemak bebas. Namun, gangguan sekresi trigliserida dan penurunan ekspresi DGAT2 dapat memperburuk steatohepatitis dan memicu lipotoksitas serta kerusakan heparik.

DNL di hepar meningkat melalui aktivasi faktor transkripsi seperti SREBP-1,



ChREBP, dan PPAR- $\gamma$ . Pada resistensi insulin, IRS-2 yang terlibat dalam regulasi SREBP-1c mengalami penurunan, sehingga meningkatkan DNL. Selain itu, akumulasi FFA dapat menyebabkan kerusakan pada jalur pensinyalan insulin dan menambah beban oksidatif mitokondria, yang memicu fibrogenesis dan perkembangan NASH.

f. Stres retikulum endoplasma

RE bertanggung jawab atas sintesis lipid, pelipatan protein, dan homeostasis kalsium. Akumulasi FFA dan trigliserida di hepar dapat merusak membran RE, mempengaruhi fluiditas membran, dan menghambat aktivitas  $Ca^{2+}$  ATPases. Ini mengakibatkan stres RE, yang dapat memicu lipogenesis dan NASH melalui aktivasi kaspase-2 dan faktor transkripsi SREBP1/2.

g. Disfungsi mitokondria

Hal dapat terjadi ketika fluks lipid meningkat melebihi kapasitas oksidasi mitokondria, menghasilkan ROS dan metabolit toksik. ROS dapat memicu inflamasi dan kerusakan mitokondria, yang memperburuk stres oksidatif dan fibrogenesis.

h. Disfungsi jaringan adiposa

Jaringan adiposa viseral menyumbang FFA ke vena porta dan memproduksi adipokin yang berperan dalam inflamasi sistemik. Obesitas dan hipertrofi adiposit meningkatkan produksi sitokin inflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IL-6, mengganggu sensitivitas insulin dan meningkatkan DNL hepar. Leptin dan adiponektin mempengaruhi metabolisme lipid dan inflamasi, dengan adiponektin memiliki efek anti-inflamasi dan antifibrotik.

i. Lipotoksitas

Lipotoksitas terjadi ketika asam lemak bebas atau metabolit lipid yang terakumulasi di hepar menyebabkan kerusakan seluler dan inflamasi. Trigliserida, meskipun berfungsi sebagai mekanisme pertahanan, dapat berkontribusi pada kerusakan hepatic ketika dikombinasikan dengan kolesterol dan metabolit toksik lain.

j. Inflamasi hepar

Kadar asam lemak bebas tinggi memicu resistensi insulin dan inflamasi hepar melalui aktivasi jalur inflamasi seperti c-JNK dan I $\kappa$ B. Inflamasi ini meningkatkan produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$  dan IL-6, memperburuk kerusakan hepar dan dapat berkembang menjadi fibrosis atau kanker hati. Sel-sel imun seperti sel Kupffer dan sel T juga berperan dalam inflamasi dan fibrosis hepar.

k. Pembentukan fibrosis

Fibrosis hepar terjadi akibat ketidakseimbangan antara sintesis dan degradasi matriks ekstraseluler, diinduksi oleh kerusakan hepatosit dan sel Kupffer serta HSC (sel Ito). Aktivasi HSC meningkatkan produksi dan matriks ekstraseluler, menyebabkan fibrosis. Jika kerusakan akumulasi kolagen dapat menyebabkan sirosis hepar.



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

yang disebabkan oleh diet tinggi lemak, beberapa dari kelompok saluran intestinal juga mengalami peningkatan atau penurunan yang disebut sebagai disbiosis (Khan et al., 2021). Kondisi disbiosis ini dapat ditandai dengan pertumbuhan bakteri gram-negatif usus yang berlebihan, yang menyebabkan peningkatan produksi lipopolisakarida (LPS). LPS sendiri merupakan

suatu endotoksin yang dapat meningkatkan resistensi insulin, mengaktifkan sistem inflamasi, dan merusak integritas barier usus (Compare et al. 2012).

Melalui sirkulasi portal, LPS memasuki hepar yang kemudian menginduksi pelepasan sitokin inflamasi. LPS akan menginduksi sel Kupffer dengan mengaktifkan toll-like-receptor (TLR), kemudian TLR-4 akan mengenali pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) dan damage-associated molecular patterns (DAMPs) yang meningkat akibat endotoksemia yang bersirkulasi melalui gut-liver axis. Pelepasan sitokin inflamasi (TNF- $\alpha$ , IL-8, IL1 $\beta$ ) yang dilepaskan oleh kaskade inflamasi, kemudian akumulasi lipid dan kematian sel pada hepatosit dapat distimulasi yang kemudian menyebabkan NAFLD, NASH, dan jika berkembang lebih jauh akan menjadi sirosis hepatitis (Miura & Ohnishi, 2014; Vijay-Kumar et al., 2010).

Namun, oleh karena keterbatasan dalam pemeriksaan LPS yang salah satunya adalah waktu paruh LPS dalam sirkulasi relatif lebih pendek, suatu protein pengikat LPS yaitu Lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) dapat digunakan sebagai variabel untuk menilai status endotoksemia dan respon imunitas (Liu et al., 2014). Hal ini dinilai bermakna, karena LBP merupakan lipoprotein utama yang mengenali keberadaan LPS, selain itu, waktu paruh LBP juga relatif lebih lama pada sirkulasi (Kitabatake et al., 2017).

Selain efek langsung dari LPS, metabolit mikrobiota intestinal juga diketahui berperan terhadap perkembangan NAFLD (Khan et al., 2021). Asam empedu, yang diproduksi di hati dari kolesterol, bersifat amphiphilic dan disekresikan ke duodenum melalui traktus biliaris. Metabolit ini berperan penting dalam metabolisme lipid dan setelah mencapai ileum, 95% diserap kembali ke hati. Sisanya diubah oleh mikrobiota usus menjadi asam empedu sekunder seperti asam deoksikolat, litoksikolat, dan ursodeoksikolat. Asam empedu sekunder kurang efektif dalam emulsifikasi lipid, yang dapat memengaruhi absorpsi lipid. Mikroba usus mempengaruhi metabolisme asam empedu, berpotensi menyebabkan NAFLD melalui perubahan asam empedu dan jalur pensinyalan FXR/TGR5. Asam empedu juga mempengaruhi mikrobiota melalui reseptor FXR, yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba dan fungsi barier mukosa intestinal. Disbiosis dapat menyebabkan ketidakseimbangan asam empedu dan inflamasi, berpotensi memicu gangguan hati (Khan et al., 2021).

Selain empedu, kolin dan asam lemak rantai pendek juga berperan dalam perkembangan NAFLD. Kolin, fosfolipid esensial dalam membran sel, berperan dalam metabolisme lipid di hati dan pembentukan VLDL. Defisiensi kolin dapat menyebabkan akumulasi lipid abnormal di hati dan steatosis hepatic. Mikroba usus dapat memetabolisme kolin menjadi trimetilamina, yang merusak fosfatidilkolin dan menyebabkan akumulasi trigliserida di hati. Kebutuhan kolin meningkat pada kondisi SIBO, memperburuk defisiensi kolin dan berpotensi menyebabkan NAFLD. Adapun asam lemak rantai pendek, seperti asam asetat, propionat, dan butirat, diproduksi oleh fermentasi mikroba usus dan berfungsi dalam inflamasi, motilitas usus, dan homeostasis



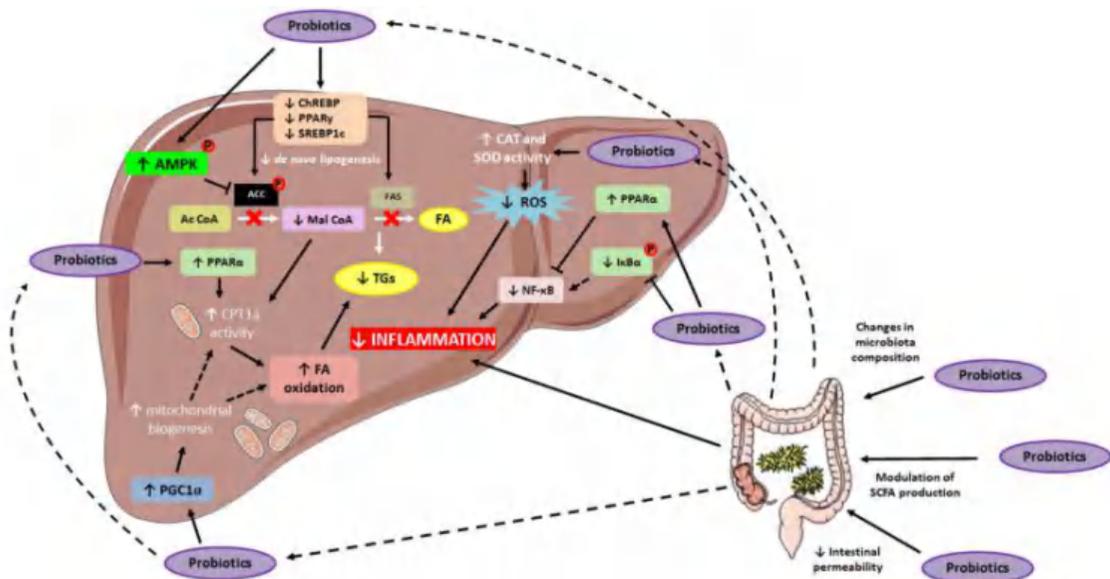
Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

produksi SCFA yang berlebihan dapat meningkatkan lipogenesis hati. Hal ini menyebabkan kondisi disbiosis ini harus ditangani dengan manajemen yang dapat mencegah progresivitas dari NAFLD.

Salah satu cara untuk mengurangi angka kejadian NAFLD masih dengan perubahan gaya hidup, seperti penurunan berat badan dan modifikasi diet. Namun, mekanisme patofisiologi yang dapat dilihat sebagai potensial terapi, salah satunya adalah melalui peran probiotik (Makwana et al., n.d.). Banyak penelitian pada hewan menunjukkan bahwa probiotik dapat meringankan NAFLD dengan cara memperbaiki kondisi disbiosis. Probiotik yang digunakan dapat berasal dari berbagai genus, namun yang paling sering adalah dari genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*,

dimana keduanya telah menunjukkan efektivitas dalam menurunkan akumulasi lipid hepatic yang disebabkan oleh pemberian diet tinggi lemak (35% – 65%) dan diet tinggi gula (10 – 30%) yang berasal dari fruktosa (Eng & Estall, 2021). Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan hasil positif pada penurunan akumulasi lipid hepar, hal ini terjadi pada pemberian probiotik dengan rentang dosis  $1 \times 10^7$  hingga  $1 \times 10^{10}$  CFU/hari selama 4 hingga 42 minggu (Arellano-García et al., 2022).

Salah satu penelitian menunjukkan bahwa penggunaan probiotik dengan kandungan *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria* dapat menghambat proliferasi bakteri patogen serta dapat memperbaiki dan memperkuat barrier usus (Plaza-Diaz et al. 2014). Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Xue dkk (2017) juga menunjukkan bahwa suplementasi probiotik dapat memperbaiki respon inflamasi hepar, yang secara linear dapat meningkatkan kesehatan pasien dengan NAFLD (Xue et al. 2017). Penelitian yang melibatkan *L. plantarum* pun telah banyak dilakukan untuk melihat potensinya terhadap perbaikan NAFLD. Penelitian yang dilakukan oleh Park dkk (2021) menunjukkan pemberian probiotik *L. Plantarum* strain ATG-K2 dan *L. Plantarum* strain ATG-K6 dosis  $5 \times 10^8$  CFU/hari selama 8 minggu, menunjukkan penurunan trigliserida dan kolesterol total, penurunan AST dan ALT serum, serta penurunan peroksidasi lipid hepar pada kedua strain.



Gambar 2. Peran probiotik dalam perbaikan NAFLD

*Lactobacillus plantarum* Dad 13 merupakan kelompok bakteri asam laktat, yang diisolasi dari "Dadiah" yang merupakan susu kerbau fermentasi tradisional khas Indonesia. *L. plantarum* Dad 13 yang merupakan probiotik indigenus ini didapatkan dari Mada (UGM) dalam bentuk sediaan bubuk dengan jumlah sel U/g dalam kemasan aluminium. Penelitian yang dilakukan oleh pada subjek dewasa dengan overweight menunjukkan bahwa *L.*



Optimized using trial version  
www.balesio.com

apat menurunkan berat badan dan body mass index (BMI) pada it badan berlebih. Selain itu, analisa mikrobiota menunjukkan des, khususnya *Prevotella*, serta penurunan populasi *Firmicutes*. k *L. plantarum* Dad 13 sejauh ini belum ada penelitian yang menilai langsung terhadap gambaran histopatologi hepar, karena rata-rata penelitian sebelumnya dilakukan pada manusia, dan keseluruhannya bersifat non-

invasif. Hal ini yang menyebabkan peneliti tertarik untuk melakukan penelitian guna menguji potensi probiotik *L. plantarum* Dad-13 terhadap gambaran histopatologi hepar dan kadar LBP sebagai penanda disbiosis pada tikus galur Sprague-Dawley model NAFLD.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah penelitian ini adalah bagaimana efek pemberian probiotik *Lactobacillus plantarum* Dad-13 terhadap gambaran histopatologi hepar dan kadar *Lipopolysaccharide-Binding Protein* (LBP) serum tikus *Sprague-Dawley* model NAFLD?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian probiotik *Lactobacillus plantarum* Dad-13 terhadap gambaran histopatologi hepar dan kadar *Lipopolysaccharide-Binding Protein* (LBP) serum pada tikus *Sprague-Dawley* model NAFLD.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

- Mengetahui efek pemberian probiotik *Lactobacillus plantarum* Dad-13 terhadap jumlah asupan tikus *Sprague-Dawley* model NAFLD.
- Mengetahui efek pemberian probiotik *Lactobacillus plantarum* Dad-13 terhadap berat badan tikus *Sprague-Dawley* model NAFLD.
- Mengetahui efek pemberian probiotik *Lactobacillus plantarum* Dad-13 terhadap kadar *Lipopolysaccharide-Binding Protein* (LBP) serum tikus *Sprague-Dawley* model NAFLD.
- Mengetahui efek pemberian probiotik *Lactobacillus plantarum* Dad-13 terhadap fungsi hepar melalui pemeriksaan kadar ALT dan AST serum tikus *Sprague-Dawley* model NAFLD.
- Mengetahui efek pemberian probiotik *Lactobacillus plantarum* Dad-13 terhadap berat hepar tikus *Sprague-Dawley* model NAFLD.
- Mengetahui efek pemberian probiotik *Lactobacillus plantarum* Dad-13 terhadap gambaran histopatologis hepar tikus *Sprague-Dawley* model NAFLD.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi ilmiah mengenai efek pemberian probiotik *Lactobacillus plantarum* Dad-13 terhadap jumlah asupan, berat badan, kadar *Lipopolysaccharide-Binding Protein* (LBP), AST, dan ALT serum, berat hepar, serta gambaran histopatologis hepar tikus *Sprague-Dawley* model NAFLD. Sehingga dapat digunakan sebagai referensi untuk penelitian-penelitian selanjutnya, khususnya pada bidang pengembangan terapi untuk NAFLD yang diinduksi dengan diet tinggi lemak dan tinggi fruktosa.



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

### iktis

elitian ini diharapkan dapat memberi informasi mengenai efektifitas *acillus plantarum* Dad-13 khususnya sebagai terapi pendamping gan NAFLD. Selain itu juga dapat dijadikan sebagai bahan rujukan selanjutnya yang terkait dengan efektifitas probiotik terhadap kadar histopatologi hepar pada tikus model NAFLD yang diinduksi diet gi fruktosa.

### elitian Pendukung

Sebagai bentuk adanya kebaruaran (novelty) diantara penelitian ini dengan

penelitian sebelumnya, adapun penelitian tersebut adalah sebagai berikut:

1. Penelitian Park et al (2021) dengan judul "*Beneficial Effects of Lactobacillus plantarum Strains on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in High Fat/High Fructose Diet-Fed Rats*" menunjukkan bahwa dibandingkan dengan tikus HFFr, tikus K2 dan K6 mengalami kenaikan berat badan yang jauh lebih rendah, menunjukkan penurunan akumulasi lipid hati, memiliki kadar serum aspartat aminotransferase dan alanin aminotransferase yang lebih rendah, dan menunjukkan peningkatan aktivitas enzim antioksidan. Selain itu, gen yang berhubungan dengan lipogenesis de novo mengalami penurunan regulasi setelah pemberian K2 dan K6. Mikrobiota feces tikus K2 dan K6 mengandung proporsi Bacteroidetes yang lebih tinggi dan proporsi Fimicutes yang lebih rendah dibandingkan dengan tikus HFFr. **Persamaan** dengan penelitian ini adalah kedua penelitian ini menggunakan model NAFLD yang diinduksi oleh diet tinggi lemak dan tinggi fruktosa, menguji efektivitas probiotik *Lactobacillus plantarum*, dan melihat efektivitasnya pada serum aminotransferase dan histopatologi hepar. **Sedangkan perbedaannya** yaitu penelitian ini menggunakan tikus galur Wistar sebanyak 42 ekor sedangkan penelitian kami menggunakan 20 ekor tikus galur Sprague-Dawley, formulasi diet tinggi lemak (45%) lebih tinggi dari diet yang kami berikan namun diet tinggi fruktosa lebih rendah (10%), probiotik yang digunakan pada penelitian Park et al (2021) ini menggunakan *Lactobacillus plantarum* ATG-K2 dan ATG-K3 yang diisolasi dari kubis fermentasi khas Korea Selatan dengan dosis masing-masing  $5 \times 10^8$  sedangkan penelitian kami menggunakan *Lactobacillus plantarum* Dad-13 dengan dosis  $3 \times 10^9$  yang diisolasi dari dadih. Penelitian kami hanya memiliki 3 kelompok perlakuan, sedangkan penelitian Park et al (2021) membandingkan 5 kelompok perlakuan, dimana proses induksi steatosis dan pemberian probiotik masing-masing 8 minggu, lebih singkat dibanding masa induksi kami yaitu 12 minggu, namun pemberian probiotik kami durasinya lebih singkat yaitu 6 minggu. Selain itu penelitian kami tidak membandingkan efektifitas probiotik dengan senyawa hepatoprotektor lainnya, adapun penelitian ini juga membandingkan antara kedua probiotik dengan senyawa hepatoprotektor dari *silymarin*. Selain parameter histopatologi, penelitian ini juga menguji efektifitas probiotik menggunakan Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR) untuk melihat aktifitas gen (SREBP-1c, FAS, C/EBPa, ACC, CPT-1, dan beta-actin) dan juga Fecal Microbiota Profiling.
2. Penelitian Zhao et al., (2020) dengan judul "*Lactobacillus plantarum NA136 ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by modulating gut microbiota, improving intestinal barrier integrity, and attenuating inflammation*" menjelaskan bahwa pemberian *Lactobacillus plantarum* NA-136 dapat memperbaiki kondisi disbiosis yang disebabkan oleh pemberian diet tinggi lemak dan tinggi fruktosa, mampu memperkuat barrier intestinal dan mengurangi inflamasi hepar, dan juga memperbaiki kondisi NAFLD dengan cara memperbaiki *gut-liver axis*. **Persamaan** dengan penelitian ini adalah pada penelitian ini tikus diberikan diet tinggi fruktosa untuk menginduksi kerusakan hepar. Selain itu pada penelitian ini hanya dibagi menjadi tiga kelompok (kontrol negatif, kontrol positif, dan probiotik), adapun penelitian ini juga membandingkan efektifitas probiotik dengan senyawa lainnya. **Perbedaannya** adalah penelitian Zhao et al., (2020) memiliki fokus utama pada model resistensi insulin, bukan NAFLD sehingga, pada temuan penelitian ini dianalisis hanya gambaran steatosis, sedangkan pada penelitian kami dengan model NAFLD merupakan yang menjadi fokus utama sehingga kami menilai NAFLD Activity Score pada temuan histopatologi hepar. Kemudian, pada

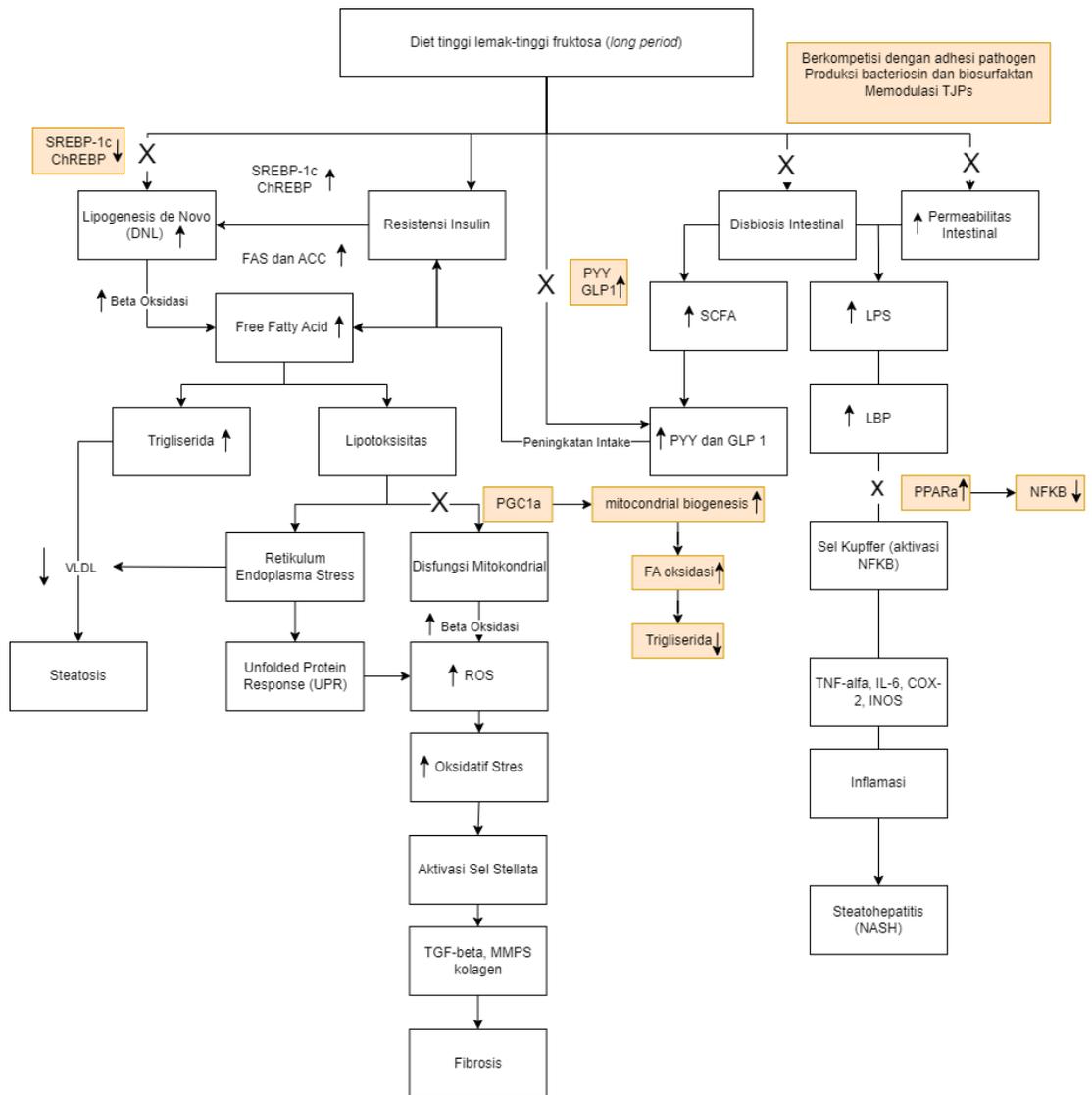


penelitian ini juga menggunakan diet tinggi lemak sebesar 65% dan fruktosa 30%, serta probiotik *Lactobacillus plantarum* NA-136 yang segera setelah aklimatisasi selama 16 minggu tanpa masa induksi terlebih dahulu, yang berbeda dengan komposisi penelitian kami yang menggunakan hanya 26.5% lemak dan 30% larutan fruktosa, yang kemudian t3. erdapat 12 minggu masa induksi steatosis sebelum masa pemberian probiotik yang selama 6 minggu. Penelitian ini juga menilai LPS dengan menguji LPS secara langsung, tidak melalui LPS-binding protein seperti yang kami lakukan.

3. Penelitian yang dilakukan oleh Li et al., (2018) yang berjudul "*Lactobacillus plantarum* NCU116 improves liver function, oxidative stress and lipid metabolism in rats with high fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease". Hasil penelitian tersebut menjelaskan bahwa pemberian *L. plantarum* NCU-116 selama 5 minggu dapat memulihkan fungsi hati dan stres oksidatif pada tikus dengan NAFLD, dan menurunkan tingkat akumulasi lemak di hati. Selain itu, probiotik ini secara signifikan mengurangi endotoksin dan sitokin proinflamasi, serta memperbaiki kondisi mikrobiota usus besar dan ekspresi metabolisme lipid di hati. **Persamaan** dengan penelitian ini adalah sama sama menggunakan tikus sebagai model hewan untuk NAFLD. **Sedangkan perbedaannya** yaitu pada penelitian Li et al., (2018) pembuatan hewan model NAFLD hanya menggunakan diet tinggi lemak saja, tanpa menggunakan tambahan tinggi fruktosa seperti formulasi diet kami. Kemudian, pemberian probiotik diberikan selama 5 minggu pada dua kelompok dengan dosis bertingkat, ( $1 \times 10^8$  CFU/ml<sup>-1</sup> dan  $1 \times 10^9$  CFU/ml<sup>-1</sup>) sedangkan penelitian kami hanya menggunakan 1 dosis saja, yaitu  $3 \times 10^9$  CFU/gr. Pada penelitian oleh Li et al., ini juga menggunakan kloralhidrat via injeksi peritoneal untuk metode anestesi, sedangkan kami menggunakan inhalasi kloroform untuk proses terminasi hewan coba. Penelitian ini menilai hanya steatosis hepar, tidak menilai proses jejas yang lain, hal ini berbeda juga dengan penelitian kami yang menilai steatosis, inflamasi lobular, dan juga degenerasi balon pada temuan histopatologi hepar. Kemudian, untuk menilai disbiosis, penelitian kami hanya menilai LPS-Binding Protein (LBP) dengan asumsi kadar LBP serum berkorelasi dengan kondisi disbiosis, namun pada penelitian ini, kondisi disbiosis dijelaskan menggunakan analisis RT-qPCR feses yang diambil dari kolon, LPS juga diuji secara langsung.



## 1.6 Kerangka Teori



Gambar 3. Kerangka Teori (Buzzetti et al., 2016; Kawano & Cohen, 2013; Lian et al., 2020; Miura & Ohnishi, 2014; Omagari et al., 2020; Vijay-Kumar et al., 2010).



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## 1.7 Kerangka Konsep



Keterangan :

- : Variabel bebas
- : Variabel terikat
- : Variabel kontrol
- : Hubungan antar variabel

Gambar 4. Kerangka Konsep Penelitian

## 1.8 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah : terdapat efek pada pemberian probiotik *Lactobacillus plantarum* Dad-13 terhadap jumlah asupan harian, perubahan berat badan, kadar Lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) serum, kadar AST dan ALT serum, berat hepar, serta gambaran histopatologi hepar tikus Sprague-Dawley model NAFLD.

## 1.9 Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Variabel Independent		
	Definisi Operasional	Kriteria Objektif	Skala
Tikus model NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease suatu kelainan hepar berupa perlemakan hati atau steatos yang dipastikan melalui biopsi hepar dan terjadi bukan karena penyebab sekunder seperti alkohol dan obat-obatan.	Steatosis: >5 %	Nominal
-13	Probiotik merupakan bakteri hidup yang ditambahkan sebagai suplemen makanan yang apabila dikonsumsi dalam konsentrasi yang memadai dapat memiliki efek yang baik pada kesehatan (Butel, MJ, 2013; de Melo Pereira et al., 2018).	Dosis: 3x10 <sup>9</sup> CFU/gr dalam 1 cc aquades	Nominal



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

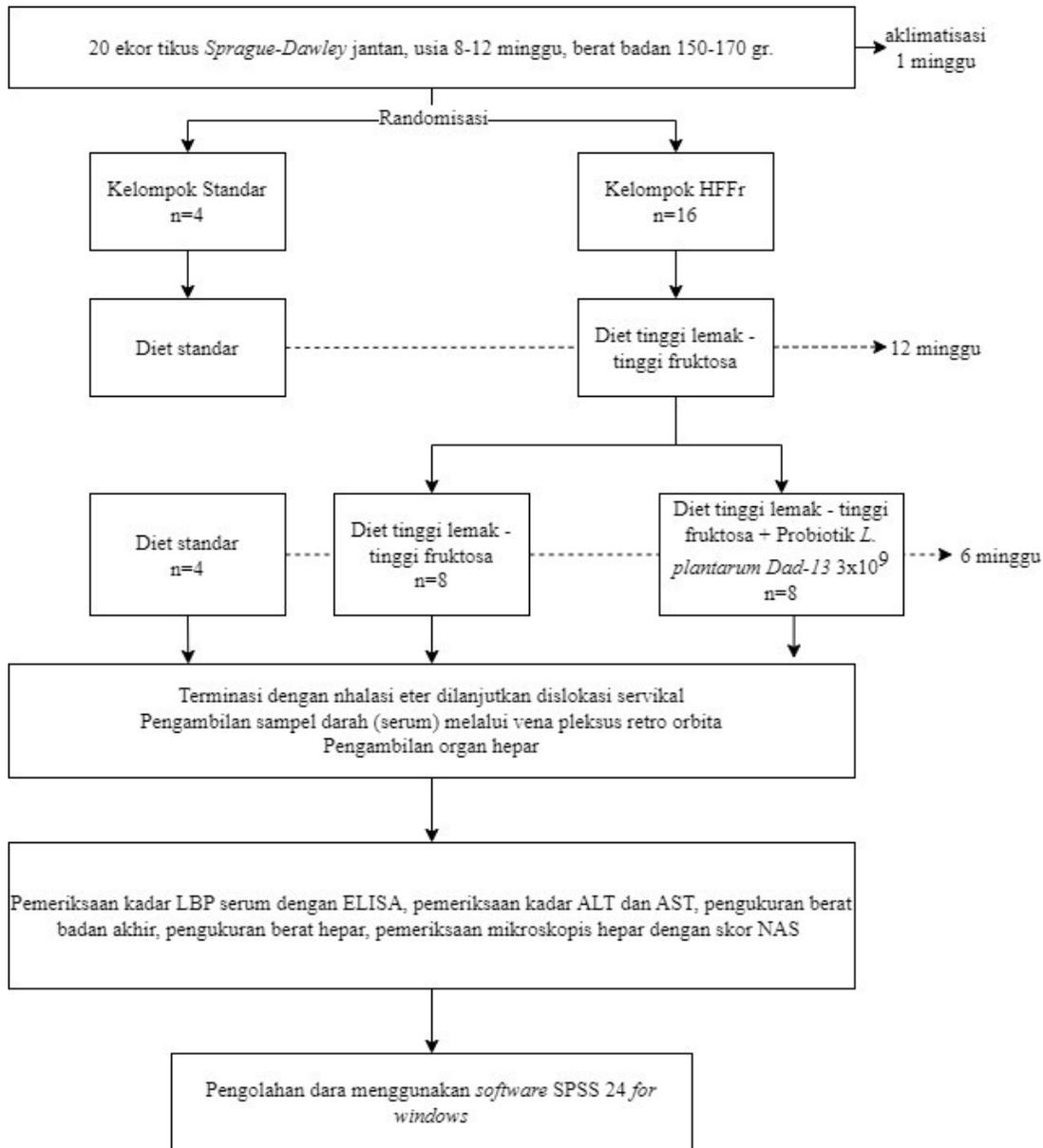
Lactobacillus plantarum Dad-13 merupakan bakteri asam laktat indigenous yang diisolasi dari dadih, yang merupakan susu kerbau fermentasi khas Sumatera Barat, Indonesia (Rahayu, 2021).

#### Variabel Dependent

Variabel Penelitian	Definisi Operasional	Kriteria Objektif	Skala
Histopatologi Hepar	NAFLD pada penelitian ini dinilai menggunakan sistem skor NAFL Activity Score, dengan 3 kriteria, yaitu: steatosis (0-3), inflamasi lobular (0-3), dan degenerasi balon (0-2) (Ramadan et al., 2022; Wu et al., 2017).	Bukan NAS: 0-2 Borderline: 3-4 NASH: >5	Ordinal
Lipopolysaccharid e-binding protein (LBP)	Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) adalah glikoprotein 65-kDa, utamanya diproduksi di hepar dan terlibat dalam respon imunologi fase akut terhadap infeksi bakteri gram negatif (Flies et al., 2016).  Pengukuran LBP serum dilakukan dengan menggunakan metode ELISA dari BT Lab (China). Pengujian LBP digunakan sebagai variabel pada status endotoksemia dan respon imunitas (Moreno-Navarrete et al., 2012).	Kadar dihitung dalam satuan EL/1U	Rasio
Kerusakan Sel Hepar	Pemeriksaan kerusakan hepatosit dilakukan dengan menguji <i>Alanine Aminotransferase</i> (ALT) dan <i>Aspartate Aminotransferase</i> (AST) serum tikus dengan metode kinetik enzimatik sesuai dengan IFCC menggunakan automatic chemical analyzer.	Acuan nilai normal AST: 50-150 IU/L dan ALT: 10-40 IU/L (K. Md. M. Hasan et al., 2018).	Rasio
Berat Hepar	Hepar yang akan diukur merupakan hepar utuh yang telah dicuci dengan menggunakan normal saline, diukur dengan menggunakan timbangan digital.	Berat hepar dicatat dalam gram (gr)	Rasio
Berat Badan	Pengukuran berat badan tikus dilakukan pada minggu ke-0 setelah dilakukan randomisasi (sebelum mulai diberikan perlakuan), dan dilanjutkan setiap minggu hingga sebelum terminasi.  Prosedur pengukurannya adalah tikus ditempatkan dalam chamber pada timbangan digital khusus tikus kemudian berat badan dicatat dalam gram (gr).	Berat badan dicatat dalam gram (gr)	Rasio
Asupan Harian	Perhitungan pakan harian dengan: - Pakan sebelum – pakan sisa = pakan harian (gr) - Larutan fruktosa sebelum – Larutan fruktosa sisa = cairan harian (ml)	Pakan harian dicatat dalam gram (gr) dan mili (ml)	Rasio



### 1.10 Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Kerja Penelitian



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

## BAB II

### METODE PENELITIAN

#### 2.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

##### 2.1.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2023 hingga bulan April 2024.

##### 2.1.2 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di:

1. Laboratorium Hewan, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin untuk persiapan, perlakuan, pengambilan organ hepar, pengambilan serum darah tikus, pengukuran berat badan, dan berat hepar tikus.
2. Laboratorium *Hasanuddin University Medical Research Center* (HUM-RC) Rumah Sakit Perguruan Tinggi Negeri (RSPTN), Universitas Hasanuddin, Makassar untuk melakukan pemeriksaan kadar LPS-binding protein (LBP) serum.
3. Laboratorium Patologi Anatomi, Rumah Sakit Perguruan Tinggi Negeri (RSPTN), Universitas Hasanuddin untuk melakukan pemeriksaan histopatologi hepar tikus.
4. Laboratorium Patologi Klinik, Rumah Sakit Perguruan Tinggi Negeri (RSPTN), Universitas Hasanuddin untuk pemeriksaan AST dan ALT serum tikus.

#### 2.2 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian berupa post test only control group design. Sebelum dilakukan pengujian efektivitas probiotik *Lactobacillus plantarum* Dad-13 dengan dosis  $3 \times 10^9$  CFU/gr selama 6 minggu pada hewan model NAFLD yang diinduksi diet tinggi lemak dan tinggi fruktosa, telah dilakukan uji pendahuluan untuk membuat hewan model NAFLD yang dilakukan selama 12 minggu.

#### 2.3 Populasi dan Sampel Penelitian

##### 2.3.1 Populasi Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley.

- a. Kriteria Inklusi
  1. Sehat
  2. Bergerak aktif
  3. Berumur 2-3 bulan
  4. Berjenis kelamin jantan
  5. Berat >150 gram



Eksklusi

ina

at badan <150 gram

nbut rontok

ainan anatomis

ak mengalami kenaikan berat badan selama *pre-liminary test*

elitian

Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

alam penelitian ini adalah tikus jantan sprague-dawley (*Rattus norvegicus*) yang dipelihara di Laboratorium Hewan, Fakultas Kedokteran, Universitas

Hasanuddin Makassar dengan umur 2-3 bulan serta memiliki bobot yaitu 150-180 gram sebanyak 20 ekor yang terbagi dalam 3 kelompok, yaitu: kelompok standar, kelompok *high-fat high-fructose* (HFFr), kelompok *high-fat high-fructose + probiotik* (HFFr+Probiotik).

Alokasi sampel dengan menggunakan metode simple random sampling. Penentuan besar sampel sesuai dengan group comparison - one way ANOVA, dimana sample minimal menggunakan DF = 10, sedangkan sampel maksimal menggunakan DF = 20 (Zahiruddin, et al., 2017).

Sample minimal:

$$n = DF/k + 1$$

$$n = 10/2 + 1$$

Sample maksimal:

$$n = DF/k + 1$$

$$n = 20/2 + 1$$

Keterangan:

- n : jumlah sampel per kelompok
- DF : degrees of freedom (derajat kebebasan)
- K : jumlah kelompok

## 2.4 Alat dan Bahan

### 2.4.1 Alat

- Pemeliharaan tikus: kandang tikus ukuran 40x20x20 cm dilengkapi botol minum, sonde lambung tikus ukuran 18 ga, spuit 5cc, gelas ukur, timbangan makanan digital (gr), timbangan tikus dengan chamber (gr).
- Pembuatan preparat histologi: sarung tangan, satu set perlengkapan bedah minor, duk lubang, jarum pentul, pot fiksasi ukuran 20 ml, water bath, mikrotom rotary, mikroskop cahaya, kaca objek, penutup kaca, bak lilin, tisu.
- Pengambilan darah dan pengumpulan serum: tabung pipa kapiler, tabung vakutainer *plain non-additive* (tutup merah), tabung mikro-sentrifugal, mesin sentrifugasi.
- Pemeriksaan *Lipolysaccharide Binding Protein* (LBP) serum: inkubator standar 37°C, absorbent paper, tip pipet, mikropipet 10µ - 1000µ, tabung reaksi, microtiter plate reader 450 nm, plate skarer 300 rpm, microplate washer, gelas ukur.
- Pemeriksaan fungsi hepar (AST dan ALT): mesin Horiba Pentra 400 Chemistry Analyzer.



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

araan dan perlakuan tikus: tikus *Sprague-Dawley* usia 8-12 minggu berat badan 150-170 gr sebanyak 20 ekor, probiotik bubuk ama dengan kandungan *Lactobacillus plantarum* Dad-13  $3 \times 10^9$  pakan standar (Van Der Voer), pakan tinggi lemak (Pa'commo), ktosa (Rose Brand), sekam, air matang.  
tan preparat histologi hepar: netral buffer formalin 10%, parafin 58, absolut (I, II, dan III), alkohol (95%, 90%, 80%, 70%, alkohol asam),

xylol (I, II, dan III), larutan *mayer hematoxylin*, larutan eosin, kertas label, entelan.

- Pemeriksaan LBP serum: serum darah 3cc, Rat LBP ELISA Kit dengan nomor katalog E0756Ra (Bioassay Technology Laboratory, Shanghai).
- Pemeriksaan AST dan ALT: serum darah 2-3 cc.
- Anastesi: kloromorm dan kapas.

## 2.5 Prosedur Penelitian

### 2.5.1 Tahap Pre Intervensi

#### a. Pemeliharaan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) galur Sprague-Dawley jantan, berusia 8 hingga 12 minggu dengan berat badan 150-170 gr sebanyak 20 ekor. Hewan coba diperoleh dari penangkaran hewan coba di Makassar, Sulawesi Selatan. Tikus dipelihara pada suhu ruangan yang berkisar 18-26°C, dengan cukup ventilasi, dan kelembaban udara 5-6%, disertai siklus gelap dan terang masing-masing 12 jam. Masing-masing tikus dipelihara dalam kandang terpisah, setiap kandang akan dibersihkan tiga hari sekali dengan cara mengganti sekam, serta makanan dan minuman diberikan setiap hari.

#### b. Masa Adaptasi

Sebelum dilakukan perlakuan, tikus terlebih dahulu di aklimatisasi selama satu minggu (minggu ke-0), selama masa ini seluruh tikus mendapatkan diet standar dan air matang yang sama secara *ad libitum*.

### 2.5.2 Tahap Intervensi

#### a. Studi Pendahuluan dan Pengelompokan Hewan Coba

Pada hari ke-8 (minggu ke-1), tikus kemudian dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok yang diberikan diet standar dan air (kelompok standar,  $n=4$ ) dan kelompok yang diberikan diet tinggi lemak dan tinggi fruktosa (kelompok HFFr,  $n=16$ ) selama 12 minggu. Pada fase ini, studi pendahuluan dilakukan pada beberapa tikus untuk memastikan bahwa NAFLD yang diinduksi oleh diet tinggi lemak-fruktosa telah terbentuk. Satu ekor tikus dikorbankan pada minggu ke 4, 8, dan 12, dan jaringan hepar diperiksa secara mikroskopis. Steatosis (<5%) dan degenerasi balon sudah terlihat pada minggu ke-8. Pada minggu ke-12, persentase steatosis melampaui 5%, yang mengonfirmasi keberhasilan pembentukan model hewan NAFLD. Pada minggu ke-13, kelompok HFFr dibagi kembali menjadi dua kelompok dimana satu kelompok tetap mendapatkan diet HFFr saja (kelompok HFFr,  $n=8$ ) dan satu kelompok lagi diberi diet HFFr dengan tambahan probiotik *L. plantarum* Dad-13 (kelompok HFFr+Probiotik  $n=8$ ) selama 6 minggu.



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

#### Suplementasi Probiotik

elitan ini menggunakan dua jenis diet yang diberikan pada masing-masing kelompok tikus:

mpok standar: kelompok ini mendapatkan diet standar yang pakan pakan tikus buatan pabrik (Van Der Voer, Indonesia) an komposisi yang tertera pada label, yaitu: bungkil kedelai, dedak, kil kelapa sawit, jagung, minyak kelapa sawit, biji-bijian kering, dan at pollard dengan kandungan nutrisi: 7% lemak, 20% protein, 37% karbohidrat, 15.9% serat, 0.8% fosfor, dan 1% kalsium (total kalori: 2.91 kkal/gr). Pakan diberikan sesuai dengan formulasi 10% dari berat badan

tikus perhari (gr), dan air minum diberikan sebanyak 40 ml/hari.

6. Kelompok HFFr: kelompok ini mendapatkan diet tinggi lemak dan tinggi fruktosa (HFFr). Diet tinggi lemak dibuat dari tepung jagung, tepung kedelai, kuning telur bebek, dan lemak sapi (Pacommo', Indonesia), dengan kandungan nutrisi: 26,5% lemak, 42% karbohidrat, dan 14% protein (total kalori: 4.63 kkal/gr). Pakan diberikan sesuai dengan formulasi 10% dari berat badan tikus perhari (gr). Adapun diet tinggi fruktosa didapatkan dari minuman berupa 40 ml larutan fruktosa, yang mengandung sirup tinggi fruktosa (Rose Brand, Indonesia) dan air matang dengan perbandingan 3:7, dengan konsentrasi akhir adalah 0.2 gr/mL, dari fruktosa tambahan kalori sebanyak 4.37 kkal/gr (Yustisia et al., 2022).
7. Kelompok HFFr+Probiotik: kelompok ini mendapatkan diet yang sama dengan kelompok HFFr, namun ditambahkan pemberian suplementasi probiotik *L. plantarum* Dad-13. Probiotik didapatkan dari Pusat Studi Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada (Yogyakarta, Indonesia), yang diberikan setiap hari ( $3 \times 10^9$  CFU/gr) dengan cara diencerkan dengan 1,5 ml aquadest dan disondekan menggunakan sonde lambung tikus (ukuran 18G) selama 6 minggu; kelompok lain diberi plasebo (aquades) dengan volume dan metode yang sama.

Prosedur pemberian probiotik adalah sebagai berikut (IACUC, 2023):

- Gunakan sonde dengan ukuran 18 ga
- Periksa panjang sonde dengan mengukur dari ujung kepala ke bagian bawah sternum. Tandai sonde di bagian hidung dan jangan masukkan tabung melewati titik tersebut agar tidak terjadi perforasi lambung.
- Cara memegang hewan coba : pegang bagian tengkuk tikus, kemudian pegang kulit dibagian pundak dengan ibu jari dan jari tengah. Lalu, pegang kulit di atas pundak sehingga kaki depan direntangkan ke samping, jaga agar kaki depan tidak mendorong sonde menjauh. Cara agar menahan tikus : tahan tikus di dekat area dada dan topang tubuh bagian bawah.
- Pegang kepala tikus dengan memanjangkan kepala ke belakang secara perlahan, sehingga membentuk garis lurus melalui leher dan kerongkongan.
- Tempatkan sonde di dalam diastema mulut, tabung dimajukan dengan lembut disepanjang langit-langit atas hingga mencapai esofagus.
- Masukkan sonde dengan lembut dalam satu gerakan, jika ada hambatan, jangan paksakan sonde untuk masuk, tarik perlahan dan



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

na kembali.

lah penempatan yang tepat, probiotik diberikan melalui spuit yang di ujung sonde. Jangan memutar sonde, karena ujungnya bisa isak esofagus.

lah pemberian, lepaskan sonde dengan lembut mengikuti sudut sama seperti pada saat pemasangan.

balikan tikus ke kandang, selama 5-10 menit pantau tanda-tanda afasan.

### 2.5.3 Tahap Post-Intervensi

#### a. Pengukuran Berat Badan

Pengukuran berat badan tikus dilakukan pada minggu ke-0 sebelum dilakukan aklimatisasi, dan dilanjutkan setiap minggu hingga sebelum terminasi. Prosedur pengukurannya adalah tikus ditempatkan dalam chamber pada timbangan digital khusus tikus kemudian berat badan dicatat dalam gram (gr).

#### b. Pengambilan Darah Sinus Orbita

Pengambilan darah dilakukan sebelum terminasi dan melalui bagian sinus orbitalis mata, prosedurnya adalah sebagai berikut :

- Menggoreskan mikrohematokrit ke bagian sinus orbita melalui kantung medial dibawah bola mata ke arah foramen opticus. Sisi lainnya mengarah pada tabung vakutainer plain tanpa penambahan bahan aktif untuk menampung darah.
- Mikrohematokrit diputar sebanyak 3-4 kali hingga melukai pleksus, kemudian kembalikan putaran sebanyak putaran sebelumnya.
- Pengambilan darah sebanyak 4 cc.
- Darah yang telah didapatkan kemudian dipusingkan selama 10 menit pada kecepatan 2000 rpm. Kemudian, serum dipisahkan dengan menggunakan pipet dan disimpan dalam suhu -20 derajat celcius menggunakan tabung mikrosentrifus hingga akan digunakan.

#### c. Terminasi Hewan Coba

Terminasi dilakukan dengan menggunakan kloroform inhalasi, dengan memasukkan tikus ke dalam chamber yang sebelumnya telah di masukkan kloroform menggunakan kapas. Setelah tikus tampak tidak sadarkan diri, berdasar pada IACUC, dilakukan metode cervical dislocation dengan cara ibu jari dan jari telunjuk peneliti ditempatkan pada kedua sisi leher dibagian dasar tengkorak atau tepat dibelakang telinga untuk memastikan tikus telah mati. Sambil menjaga bagian kepala tetap diam dan stabil, tangan lainnya kemudian menarik pangkal ekor atau kaki belakang dengan cepat dan dengan gerakan yang mantap dan stabil, sehingga terjadi pemisahan antara tengkorak dengan cervicalis atau tulang leher (AVMA, 2013).

#### d. Pembedahan

Teknik pembedahan dilakukan dengan prosedur pembedahan hewan uji dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- Tikus yang telah dieuthanasia ditempatkan pada papan bedah dan difiksasi dengan menggunakan jarum pentul.
- Tikus kemudian dibedah dimulai dari bagian abdomen menggunakan gunting bengkok.

in hepar diambil dengan menggunakan gunting lurus.

in hepar kemudian dibersihkan dengan cara mencuci dengan des kemudian dicuci kembali dengan NaCl 0.9% hingga bersih dari h.

lah kandungan air telah berkurang, organ hepar kemudian bang dan dimasukkan ke dalam pot berisi larutan normal buffer alin 10%.



**e. Pengukuran Berat Hepar**

Hepar ditimbang dalam kondisi segar dan setelah bersih dari darah. Hepar ditimbang dengan menggunakan timbangan digital dengan akurasi 0.001 dan dicatat dalam gram (gr).

**f. Pemeriksaan Lipolysaccharide Binding Protein (LBP) serum**

Prosedur pemeriksaan Lipolysaccharide Binding Protein serum tikus Spargue-Dawley pada penelitian ini menggunakan Rat LBP ELISA Kit dengan catalog number E0757Ra, yang didapatkan dari Bioassay Technology Laboratory, Shanghai. ELISA kit ini merupakan tipe sandwich yang memiliki sensitifitas sebesar 0.93 EU/L dengan 48T, sehingga dapat dilakukan duplo pada saat pengujian.

Prosedur kerja:

a. Pengambilan spesimen

- Setelah dikumpulkan dalam tabung vakutainer plain, serum dibiarkan menggumpal selama 10-20 menit pada suhu kamar. Sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit, kemudian supernatan dikumpulkan tanpa endapan.
- Serum disimpan pada suhu -20°C untuk diperiksa keesokan harinya.
- Sampel dibiarkan pada ruangan hingga mencapai suhu ruang ketika akan diperiksa.

b. Persiapan larutan standar

- Seluruh reagen telah dalam suhu ruang saat akan digunakan
- Mencampurkan 120µl standar (640 EU/L) dengan 120µl pengencer standar untuk menghasilkan larutan stok standar 320µl
- Mengistirahatkan larutan standar selama 15 menit dengan digoyangkan secara pelan sebelum membuat pengenceran. Siapkan duplikat larutan standar dengan mengencerkan larutan stok standar (320 EU/L) 1:2 secara serial dengan pengencer standar untuk menghasilkan larutan 160EU/L, 80EU/L, 40EU/L, dan 20EU/L

c. Persiapan wash buffer

- Mengencerkan 20 ml Wash Buffer Concentrate 25x ke dalam air deionisasi atau air suling untuk menghasilkan 500 ml Wash Buffer 1x.

d. Prosedur assay

- Menyiapkan semua reagen, larutan standar, dan sampel sesuai petunjuk. Pengujian dilakukan pada suhu kamar.
- Menambahkan larutan standar sebanyak 50µl ke sumur standar tanpa menambahkan antibodi ke sumur standar karena larutan standar telah mengandung antibodi biotinilasi.
- Menambahkan 40µl sampel ke sumur sampel lalu menambahkan pula 40µl antibodi LBP tikus ke sumur sampel, setelah itu 50µl streptavidin juga ditambahkan ke sumur sampel dan sumur standar (bukan sumur kontrol kosong). Setelah dicampurkan hingga merata, menutupi dengan sealer, dan dilakukan inkubasi 60 menit pada suhu 37 °C. Lepaskan sealer dan mencuci plate 5 kali dengan buffer pencuci. Lalu, tambahkan sumur dengan wash buffer 300ul selama 30 detik hingga 1 menit untuk setiap pencucian. Untuk pencucian otomatis, aspirasi atau hisap setiap sumur dan cuci 5 kali dengan wash buffer. Tepuk-tepuk plate di atas tisu atau bahan penyerap lainnya.
- Menambahkan 50µl larutan substrat A ke setiap sumur dan kemudian



tambahkan juga 50µl larutan substrat B ke setiap sumur. Lalu dilakukan inkubasi plate yang ditutup dengan sealer baru selama 10 menit pada suhu 37°C dalam gelap.

- Terakhir, menambahkan 50µl stop solution ke setiap sumur, tampak warna biru berubah menjadi kekuningan.
- Lalu, menentukan optical density (OD value) setiap sumur menggunakan microplate reader yang diatur ke 450 nm dalam waktu 10 menit.

#### **g. Pemeriksaan Aminotransferase (AST dan ALT)**

Pemeriksaan fungsi hepar akan dilakukan dengan cara mengukur ALT dan AST serum. Setelah serum terpisah dari plasma, serum kemudian dipisahkan dan dimasukkan kedalam tabung mikrosentrifus dan kemudian diberi label kode hewan coba. Masing-masing cup kemudian dimasukkan kedalam mesin Pentra C400 Clinical Chemistry Analyzer. Nilai normal AST pada tikus adalah 50-150 IU/L dan ALT adalah 10-40 IU/L (K. Md. M. Hasan et al., 2018).

#### **h. Persiapan Preparat Histologi Hepar**

Prosedur persiapan preparat dilakukan dengan metode sebagai berikut (Parkinson & Mortimer, 2019):

- Organ hepar difiksasi dalam larutan normal buffer formalin selama  $\pm$  24 jam, hingga seluruh jaringan terendam dalam larutan fiksatif.
- Kemudian dilakukan proses dehidrasi dengan menggunakan alkohol bertingkat, dimulai dari : alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, dan alkohol absolut sebanyak 2 kali, masing-masing selama 1 jam.
- Clearing dilakukan dengan merendam jaringan dengan menggunakan xylol. Jaringan dimasukkan kedalam xylol I selama 1 jam, kemudian xylol II juga selama 1 jam.
- Impregnasi kemudian dilakukan dengan direndam di dalam paraffin yang telah di cairkan pada suhu 56-60°C.
- Embedding dilakukan dengan membenamkan jaringan pada paraffin I, II, dan III masing-masing selama 30 menit, kemudian didinginkan hingga paraffin membeku.
- Trimming merupakan proses selanjutnya, yaitu cetakan paraffin dirapikan sehingga dapat diiris dengan menggunakan mikrotom.
- Pemotongan blok paraffin blok dengan menggunakan mikrotom setebal  $\pm$  5 µm.
- Pita paraffin yang mengandung jaringan dipindahkan dengan menggunakan kuas kedalam water bath yang temperaturnya di atur dengan suhu 37-40°C, dan dibiarkan beberapa saat hingga pita paraffin mengembang.

Setelah pita mengembang dengan baik ditempelkan pada kaca objek yang telah dicoated dengan menggunakan albumin, kemudian masukkan kaca objek pada waterbath dan menggerakannya ke arah paraffin, kemudian dengan bantuan kuas ditempelkan pada kaca objek, lalu dikeluarkan pelan-pelan agar tidak melipat.

Setelah itu masukkan kaca objek yang telah berisi jaringan dengan menggunakan hot plate, gunanya agar sisa paraffin yang masih melekat pada kaca objek mencair.

Selanjutnya dilakukan prosedur pewarnaan hematoksilin-eosin (HE).



### i. Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

Prosedur pewarnaan hematoksilin-eosin (HE) dilakukan berdasarkan metode Bancroft et al. (2019). Prinsip utama dalam prosedur ini adalah inti sel atau nukleus yang bersifat asam akan menarik zat atau larutan yang bersifat basa, sehingga akan menunjukkan warna biru. Adapun sitoplasma yang bersifat basa akan menarik zat atau larutan yang bersifat asam sehingga akan memunculkan warna merah. Berikut adalah tahapan pada pewarnaan dengan menggunakan Hematoksilin-Eosin :

- Deparafinisasi guna melarutkan paraffin yang ada pada jaringan, proses ini dilakukan dengan memasukkan preparat ke dalam xylol I, II, dan III masing-masing selama 15 menit.
- Kemudian dilakukan proses rehidrasi untuk memasukkan kembali air ke dalam jaringan, proses ini dilakukan dengan memasukkan preparat ke dalam alkohol bertingkat, pertama adalah alkohol absolut, kemudian alkohol 90%, dan 80% masing-masing selama 5 menit. Setelah itu, cuci dengan menggunakan air yang mengalir hingga alkohol diyakini bersih.
- Pewarnaan I, pewarnaan ini untuk memberikan warna pada nukleus dan sitoplasma sel. Hal ini dilakukan dengan merendam preparat ke dalam hematoksilin selama 15 menit, kemudian dicuci dengan menggunakan air mengalir hingga hematoksilin tidak luntur.
- Diferensiasi dilakukan untuk mengurangi warna biru pada nukleus, serta menghilangkan warna biru pada sitoplasma yang normalnya berwarna merah. Hal ini dilakukan dengan memasukkan preparat ke dalam alkohol asam sebanyak 2 kali, dan hanya dicelupkan saja. Kemudian dicuci dengan air mengalir, dan dicuci kembali dengan cara merendam preparat ke dalam aquades sekitar 15 menit, hingga aquades tampak berwarna biru.
- Pewarnaan II, pewarnaan ini untuk memberikan warna merah pada sel sitoplasma. Hal ini dilakukan dengan merendam preparat ke dalam eosin selama 5 menit.
- Dehidrasi dilakukan untuk menghilangkan air dari jaringan, dilakukan dengan merendam preparat kembali pada larutan alkohol 70%, 80%, 90%, dan absolut masing-masing selama 3 menit. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir.
- Kemudian rendam kembali dalam xylol I dan II selama masing-masing 3 menit.
- Kemudian lakukan mounting untuk mengawetkan jaringan, dengan cara meneteskan entellan 1 hingga 2 tetes pada preparat. Setelah itu, melekatkan kaca penutup dengan hati-hati. Perhatikan apakah ada bintung atau tidak. Lalu, biarkan mengering.

berikan label : nomor dan kelompok tikus putih, nama organ, tanggal pembuatan preparat.

### n Histopatologi Hepar

Penilaian histopatologi jaringan hepar dilakukan oleh ahli dibidang patologi yaitu dokter spesialis patologi anatomi yang dilakukan secara Penilaian ini menggunakan sistem skor yang disebut dengan NAFL score (NAS), yang mana jika merujuk pada Kleiner et al (2021) NAS terdiri atas 3 kriteria yaitu steatosis (0-3), inflamasi lobular (0-3), dan degenerasi balon (0-2) (Ramadan et al., 2022; Z. Wu et al., 2017). Seluruh



kriteria dari sistem skor ini akan dibandingkan masing-masing antar kelompok. Setelah itu, dilakukan evaluasi pada total skor NAS, dimana menurut Komite Patologi dari NASH Clinical Research Network, hewan dikelompokkan dalam 4 subkelompok sebagai berikut : bukan NAS (0-2), borderline (3-4), dan NASH (>5) (Setiawan et al., 2021).

Tabel 2. NAFLD Activity Score (NAS) (Kleiner & Makhlouf, 2016)

NAFLD Activity Score			
Lesi Hepar	Skor	Keterangan	Definisi
Steatosis	0	<5%	$\% = \frac{\text{Jumlah steatosis}}{\text{Jumlah total sel}} \times 100$ (Putu Candra Paramita et al., 2019)
	1	5-33%	
	2	>33-66%	
	3	>66%	
Inflamasi lobular	0	Tidak terdapat fokus	Badan asidofilik tidak termasuk pada penilaian ini, begitu pula dengan inflamasi portal.
	1	<2 fokus/200x	
	2	2-4 fokus/200x	
	3	>4 fokus/200x	
<i>Ballooning hepatocyte</i>	0	Tidak terdapat <i>ballooning hepatocyte</i>	Hanya sedikit berarti sangat jarang ditemukan, namun masih terdapat <i>ballooning hepatocyte</i> .
	1	Hanya sedikit	
	2	Banyak sel/ prominen	

## 2.6 Analisis Data

Data hasil pemeriksaan dianalisis dengan menggunakan software SPSS versi 24 for windows. Seluruh data yang didapatkan dari ketiga kelompok diuji normalitas dengan uji Saphiro-Wilk karena jumlah sampel yang kurang dari 50 sampel. Setelah dilakukan uji normalitas, kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas dengan menggunakan Levene's Test. Data dikatakan terdistribusi normal dan homogen jika nilai  $p \geq 0,05$ .

Data kemudian dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji One Way Anova jika data terdistribusi normal, dengan signifikansi ditentukan berdasarkan nilai  $\alpha = 0,05$ . Jika tidak terdistribusi normal, maka akan dilakukan uji Kruskal-Wallis. Setelah itu, dilanjutkan dengan uji post hoc Tukey Test untuk mengetahui beda antar perlakuan.

## 2.7 Izin Penelitian dan Kelayakan Etik

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, dengan nomor referensi sebagai berikut: 785/UN4.6.4.5.3L/PP36/2AZ3.



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)