

Efek Pemberian Asam Alfa Lipoat pada Histopatologi Aorta Torakalis Tikus Diabetes Melitus Tipe 2

Rijalun Arridho¹, Ismawati^{2*}, Enikarmila Asni², Ilhami Romus³

ABSTRACT

Atherosclerosis is arterial wall's disease initiated by lipid retention, oxidation, and modification, provoking chronic inflammation ultimately causing stenosis and thrombosis. This study investigated the effect of alpha lipoic acid (ALA) on thoracic aorta type 2 diabetic rat. Fifteen adult male rat of *Rattus novvergicus* Wistar strain were separated into three groups (n=5), there were labelled as control, type 2 diabetes (DM), and DM + ALA. Type 2 diabetic rats were induced by streptozotocin (50 mg/kg bodyweight) and nicotinamide (110 mg/kg bodyweight) and categorized as diabetic rat if blood glucose level >250 mg/dl. Alpha lipoic acid was administered via intraperitoneal (60 mg/kg/day) and conducted for 3 weeks. The measured parameter was atherosclerosis lesion score. Results showed that there was no significant difference in atherosclerosis lesion scores between all groups designed (p=0,071). It can be concluded that ALA did not have a significant effect on atherosclerosis lesion of thoracic aorta type 2 diabetic rat.

Keywords: alpha lipoic acid, atherosclerosis, atherosclerosis lesion score, diabetes mellitus, nicotinamide, streptozotocin

Diabetes melitus (DM) adalah penyakit metabolik yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah (hiperglikemia) akibat rendahnya kadar hormon insulin dan/atau adanya resistensi hormon insulin di jaringan. Prevalensi penyakit DM sangat tinggi di seluruh dunia, pada tahun 2010 prevalensi DM di dunia mencapai 285 juta jiwa. Prevalensi DM dan prediabetes di Indonesia tahun 2014 masing-masing mencapai 15 dan 117 juta jiwa.¹

Penyakit DM dapat menyebabkan komplikasi berbahaya seperti penyakit kardiovaskular (PKV) yang merupakan penyebab utama kematian di dunia saat ini.¹ Berdasarkan survei riset kesehatan dasar (RISKESDAS) tahun 2007, penyebab kematian nomor satu di Indonesia adalah PKV dengan prevalensi 7,2%.²

Sebagian besar PKV disebabkan oleh aterosklerosis. Aterosklerosis merupakan suatu

inflamasi kronis pada arteri besar dan sedang akibat penimbunan lipid dan fibrosis. Hasil penelitian *The Cholesterol Lowering Atherogenesis Study* (CLAS) menunjukkan bahwa pemberian antioksidan berpengaruh signifikan terhadap penurunan penyakit aterosklerosis.³

Asam á-lipoat (ALA) menunjukkan aktivitas antioksidan dan memiliki banyak fungsi di dalam tubuh seperti dapat mereduksi vitamin C, vitamin E, dan *glutathione* (GSH), memperbaiki kondisi hiperglikemia, dan menurunkan produksi protein proinflamasi, sehingga diharapkan dapat menghambat proses pembentukan plak aterosklerosis.⁴ Penelitian yang dilakukan oleh Lee dkk melaporkan adanya efek yang signifikan dari ALA dalam menghambat proses aterosklerosis pada tikus hiperkolesterolemia.⁵ Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Ismawati dkk adanya efek ALA dalam mencegah aterosklerosis pada aorta mencit yang diberi diet tinggi kolesterol.⁶

Penyakit diabetes merupakan faktor resiko dari aterosklerosis selain hiperkolesterolemia. Proses induksi DM tipe 2 pada hewan coba seringkali menggunakan streptozotocin (STZ) dan nikotinamid (NA). Streptozotocin bekerja dengan merusak sel á

* Correspondent author: ismawati75@yahoo.com

¹ Prodi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Riau, Pekanbaru, Riau, Indonesia

² KJFD Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Riau, Pekanbaru, Riau, Indonesia

³ KJFD Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Riau, Pekanbaru, Riau, Indonesia

pankreas yang merupakan penghasil hormon insulin. Melalui proses alkilasi DNA, STZ dapat menguraikan DNA menjadi bentuk fragmen sehingga timbul respon intrasel dengan melepaskan molekul *poly(ADP-ribose) polymerase-1* (PARP-1). Molekul PARP-1 berfungsi memperbaiki DNA dengan cara meningkatkan prekursor ADP-ribosa dari molekul NAD⁺. Akibatnya NAD⁺ akan berkurang sehingga terjadi penurunan ATP. STZ juga dapat merusak mitokondria sehingga secara keseluruhan sel akan kekurangan energi kemudian terjadi nekrosis. Nikotinamid memiliki efek proteksi pada sel β pankreas dengan mekanisme utama menghambat efek PARP-1 dan meningkatkan produksi NAD⁺ sehingga metabolisme energi masih tetap berjalan dan sel dapat menghasilkan ATP sebagai sumber energi.⁷

Hasil akhir induksi STZ dan NA ini menyebabkan terjadinya hiperglikemia sedang karena 60% sel β pankreas kehilangan fungsinya untuk menghasilkan hormon insulin, sehingga tikus yang diinduksi digolongkan menjadi tikus diabetes melitus tipe 2. Resiko komplikasi aterosklerosis pada penyakit diabetes melitus tergolong tinggi.^{5,7}

Penelitian ini bertujuan untuk menguji bagaimana efek ALA dalam menghambat proses aterosklerosis pada tahap awal pada tikus diabetes melitus tipe 2.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *post test-only control group*. Penelitian dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Riau setelah mendapatkan surat keterangan lulus kaji etik. Variabel bebas adalah pemberian diet ALA, variabel terikatnya gambaran histopatologi aorta torakalis. Tikus yang digunakan adalah tikus *Rattus norvegicus* galur wistar jantan dengan umur 2-3 bulan, berat badan 200 – 250 gram sebanyak 15. Seluruh hewan coba dibagi secara acak menjadi 3 kelompok, masing masing kelompok terdiri dari 5 ekor, yaitu kelompok I tikus kontrol dengan pemberian pakan standar, kelompok II tikus DM tipe 2 dengan pemberian pakan standar, dan kelompok III tikus DM tipe 2 dengan pemberian ALA disamping pakan standar.

Induksi DM dilakukan dengan menyuntikkan STZ intraperitoneal (50 mg/kgbb) dan nikotinamid (110 mg/kgbb) setelah 15 menit penyuntikan STZ. Sebelum induksi, tikus dipuasakan 12 jam dan paska penyuntikan diberikan glukosa 10% selama 6 jam. Tikus dikategorikan DM tipe 2 jika 72 jam paska induksi kadar gula darah tikus > 250 mg/dl.⁸ Pemberian ALA dengan dosis 60 mg/kgbb setiap hari selama 3 minggu dilakukan dengan sonde lambung.⁶

Tikus dibedah untuk diambil jaringan aorta torakalis, sebelum itu dilakukan anestesi pada tikus dengan eter. Jaringan dibersihkan dengan NaCl 0,9% dan dimasukkan dalam formalin 10%, kemudian dibawa ke Laboratorium Patologi Anatomi untuk dibuat sediaan jaringan dengan pewarnaan hematoxylin dan eosin (HE). Sampel jaringan dinilai menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x pada 9 lapangan pandang dengan skoring sebagai berikut. Skor 0: normal/utuh; skor 1: makrofag dan sel busa; skor 2: proliferasi otot polos, infiltrasi lipid medial, dan kalsifikasi/fibrosis; skor 3: defek permukaan (fisura, ulserasi, hematoma, trombus). Skor tiap sampel jaringan dijumlahkan dan dihitung rata-ratanya. Skoring dilakukan oleh peneliti dan dikonfirmasi oleh ahli Patologi Anatomi. Data yang didapatkan dianalisis melalui uji statistik untuk membandingkan perbedaan rata-rata skor lesi ketiga kelompok perlakuan.^{9,10}

HASIL

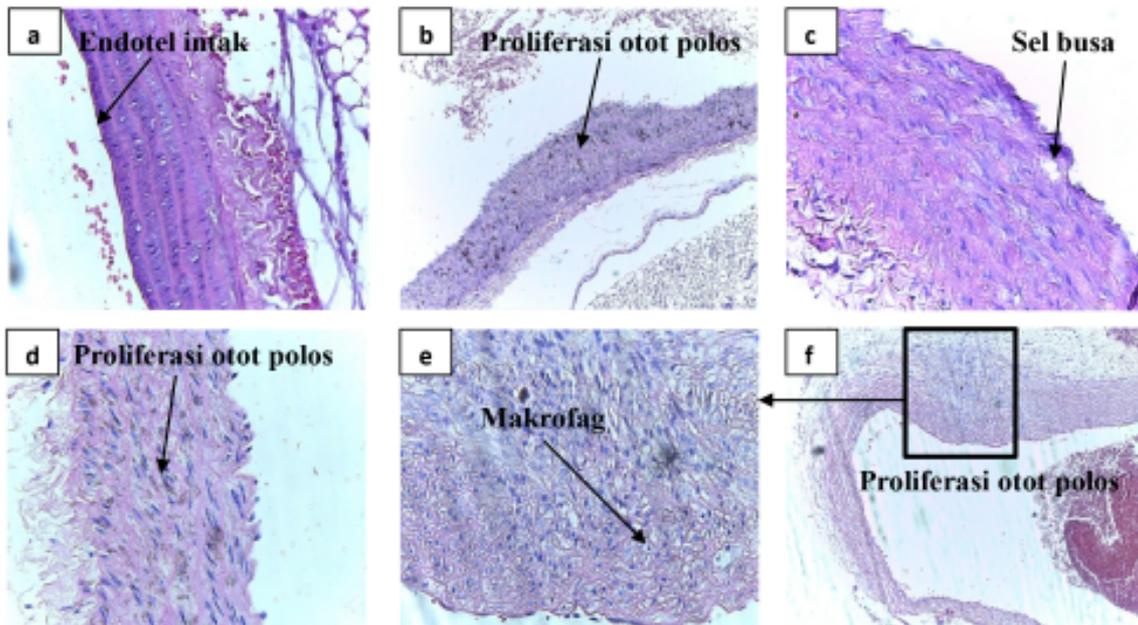
Gambaran Histopatologi Aorta Torakalis Tikus Setiap Kelompok Percobaan

Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan lesi aterosklerosis pada kelompok DM dan kelompok DM + ALA berupa proliferasi otot polos, adanya makrofag dan sel busa. Pada kelompok kontrol lesi aterosklerosis lebih sedikit berupa proliferasi otot polos dan hanya ditemukan pada dua sampel jaringan (Gambar 1). Seperti terlihat pada tabel 1, tiga sampel jaringan pada tikus kelompok kontrol memiliki rata-rata skor lesi aterosklerosis dengan nilai 0, dua sampel jaringan lainnya memiliki rata-rata skor 0,44. Rata-rata skor lesi aterosklerosis aorta torakalis kelompok kontrol adalah $0,176 \pm 0,24$.

Pada kelompok DM tipe 2 terdapat peningkatan lesi aterosklerosis, dengan rata-rata skor adalah

0,352 ± 0,37. Lesi aterosklerosis ditemukan pada tiga sampel kelompok DM tipe 2 dengan rata-rata skor masing masing adalah 0,88, 0,44, dan 0,44. Hasil penilaian rata-rata lesi aterosklerosis pada kelompok diabetes melitus tipe 2 dengan pemberian ALA merupakan yang tertinggi dengan nilai 0,572 ± 0,18

dikarenakan terjadinya lesi aterosklerosis pada semua sampel jaringan dengan nilai rata-rata lesi masing-masing adalah 0,66, 0,44, 0,44, 0,44, 0,88. Uji beda skor lesi aterosklerosis menggunakan uji *Kruskal-Wallis* anatar kelompok aorta torakalis tikus kontrol, tikus DM tipe 2, dan tikus DM tipe 2 + ALA didapatkan nilai p=0,071.



Gambar 1. Gambaran histopatologi aorta torakalis di setiap kelompok perlakuan (Pewarnaan H&E). (a) kelompok kontrol, perbesaran 400x; (b) kelompok kontrol, perbesaran 100x; (c,d) kelompok DM tipe 2, perbesaran 400x; (e) kelompok DM tipe 2 dengan pemberian ALA, perbesaran 400x; (f) kelompok DM tipe 2 dengan pemberian ALA perbesaran 100x

Tabel 1. Rata-rata skor lesi aterosklerosis aorta torakalis di setiap kelompok perlakuan

Nomor Sampel	Rata-rata skor lesi aterosklerosis setiap sampel jaringan		
	Kontrol	DM tipe 2	DM tipe 2 + ALA
1	0	0,88	0,66
2	0	0,44	0,44
3	0	0	0,44
4	0,44	0	0,44
5	0,44	0,44	0,88
Rata-rata skor per kelompok ± SD	0,176 ± 0,24	0,352 ± 0,37	0,572 ± 0,18

PEMBAHASAN

Gambaran Histopatologi Aorta Torakalis Tikus Diabetes Melitus Tipe 2

Pada tikus kelompok diabetes melitus tipe 2 terjadi peningkatan lesi aterosklerosis dibandingkan tikus kelompok kontrol berupa proliferasi otot polos. Hal ini terjadi akibat inflamasi jaringan yang merangsang makrofag mengeluarkan TLR selanjutnya akan mengaktifkan jalur persinyalan faktor transkripsi NF- κ B dan MAPK sehingga menyebabkan otot polos berproliferasi. Faktor penanda inflamasi lain seperti sel busa juga ditemukan pada sampel jaringan kelompok diabetes disebabkan karena makrofag pada jaringan memfagosit LDL teroksidasi.¹¹

Peningkatan lesi aterosklerosis pada kelompok DM tipe 2 dibandingkan tikus kelompok kontrol ternyata tidak bermakna secara statistik. Salah satu alasan yang menjadi penyebabnya dikarenakan tikus merupakan hewan yang relatif resisten terhadap aterosklerosis sehingga sulit untuk menginduksi tikus agar proses aterosklerosis dapat terjadi. Model tikus yang paling efektif untuk menginduksi aterosklerosis adalah melalui modifikasi genetik pada metabolisme lipoprotein diikuti dengan penambahan diet aterogenik.¹² Alasan lain yang mendukung hasil yang tidak bermakna tersebut dikarenakan terdapat dua sampel jaringan aorta torakalis kontrol yang mengalami lesi aterosklerosis berupa proliferasi otot polos, sehingga perbedaan lesi aterosklerosis kedua kelompok tersebut tidak bermakna. Karena penelitian ini menggunakan desain *post test only*, peneliti tidak bisa memastikan adanya aterosklerosis pada tikus sebelum dilakukan penelitian namun tikus sudah dipastikan sehat berdasarkan kriteria inklusi. Faktor lain yang mungkin menjadi penyebab adanya lesi pada kelompok kontrol adalah perbedaan jumlah *intake* makanan setiap tikus.^{12,13}

Hasil yang berbeda ditemukan pada penelitian Ismawati (2017)¹⁴ menggunakan hewan coba yang sama namun ditemukan peningkatan lesi aterosklerosis bermakna pada aorta abdominalis tikus DM tipe 2. Alasan utama yang dapat diduga menjadi penyebab aterosklerosis tidak bermakna dibandingkan dengan aorta abdominalis adalah faktor hemodinamik dan geometri dinding pembuluh darah. Faktor hemodinamik dan geometri pembuluh darah

mempengaruhi gaya gesek aliran darah pada permukaan lapisan endotel dan memberikan tekanan pada dinding pembuluh darah, teori ini dinamakan *wall shear stress* (WSS).¹⁵ Peran WSS dominan pada tahap inisiasi proses aterosklerosis melalui gesekan lapisan endotel sehingga permeabilitas endotel meningkat. Aliran darah pada teori WSS terbagi menjadi dua tipe, yaitu aliran laminar stabil dan aliran laminar terganggu. Aliran laminar stabil seperti pada aorta torakalis bersifat ateroprotektif karena dapat menghambat disfungsi endotel, proses koagulasi darah, diapedesis leukosit, dan proliferasi sel otot polos. Sebaliknya tipe aliran laminar terganggu seperti pada aorta abdominalis dan arteri koroner cenderung sebaliknya yaitu mengisi proses aterosklerosis karena dapat merubah gradien tekan ke arah dinding pembuluh darah. Aliran ini merubah pola sekresi molekul-molekul kimia sel endotel menjadi bersifat pro-inflamasi sehingga mengarah kepada aterosklerosis.¹⁶ Alasan ini mendukung ditemukannya hasil penelitian yang tidak bermakna secara statistik antara lesi aterosklerosis pada kelompok tikus diabetes dibandingkan kelompok tikus kontrol.

Gambaran Histopatologi Aorta Torakalis Tikus DM tipe 2 dengan pemberian ALA

Pada kelompok tikus DM dengan pemberian ALA ditemukan peningkatan lesi aterosklerosis berupa proliferasi otot polos pada seluruh sampel jaringan. Sel busa ditemukan pada satu sampel jaringan dimana tidak ditemukan pada sampel jaringan lain. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian Ismawati (2017)¹⁴ yang menggunakan hewan coba yang sama selama 3 minggu ternyata didapatkan penurunan lesi aterosklerosis pada jaringan aorta abdominalis. Hasil yang berbeda tersebut dikarenakan peningkatan lesi aterosklerosis pada kelompok DM tipe 2 dibandingkan kelompok kontrol bermakna, sehingga pengaruh ALA pada lesi aterosklerosis dapat bernilai signifikan.

Penilaian efek ALA pada aterosklerosis tikus diabetes hanya dapat dilihat jika ada peningkatan lesi aterosklerosis yang bermakna pada tikus DM tipe 2. Pada penelitian Damora (2017)¹⁷ yang meneliti tentang efek ALA terhadap aterosklerosis arteri koroner tikus DM tipe 2 selama 3 minggu juga

menunjukkan hasil yang tidak signifikan karena peningkatan lesi aterosklerosis pada kelompok DM tipe 2 tidak bermakna.

Analisis perbedaan lesi aterosklerosis tikus DM tipe 2 dan tikus DM tipe 2 dengan pemberian ALA

Efek pemberian ALA pada tikus diabetes melitus tipe 2 tidak bisa dinilai karena peningkatan skor lesi aterosklerosis pada kelompok DM tipe 2 tidak bermakna secara statistik. Hasil akhir perbedaan skor lesi aterosklerosis ketiga kelompok penelitian juga tidak menunjukkan hasil yang signifikan.

Hasil yang tidak signifikan tersebut disebabkan karena ditemukannya lesi aterosklerosis pada kelompok kontrol dan juga adanya sampel kelompok diabetes yang normal sehingga peningkatan lesi aterosklerosis pada kelompok DM tipe 2 tidak bermakna. Selain alasan tikus sebagai hewan yang relatif resisten terhadap aterosklerosis, alasan utama yang menjadi penyebab hasil penelitian ini tidak bermakna yaitu berkaitan dengan jaringan yang diteliti yaitu aorta torakalis (aorta desenden) yang memiliki tipe aliran darah laminar stabil. Hal tersebut menjadikan aterosklerosis lebih sulit terjadi dan efek ALA pada tikus diabetes yang mengalami aterosklerosis tahap inisiasi tidak bisa dinilai.

SIMPULAN

Pemberian ALA 60 mg/kgbb setiap hari selama 3 minggu tidak memberikan efek yang signifikan terhadap pencegahan pembentukan lesi aterosklerosis aorta torakalis tikus diabetes melitus tipe 2.

DAFTAR PUSTAKA

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37 Suppl 1:81-90.
2. Depkes.go.id [homepage on the internet]. Jakarta : Kemen trian Kesehatan Republik Indonesia. [updated 2011 March 30; cited 2017 sept 30]. available from : <http://www.depkes.go.id/article/view/1452/menkes-akses-masyarakat-terhadap->

[pelayanan-kesehatan-jantung-meningkat.html](http://www.depkes.go.id/article/view/1452/menkes-akses-masyarakat-terhadap-pelayanan-kesehatan-jantung-meningkat.html).

3. Golbidi S, Badran M, Laher I. Diabetes and alpha lipoic acid. *Front Pharmacol*. 2011;2:1-15.
4. Shay K, Moreau R, Smith E. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys*. 2009;1790(10):1149-60.
5. Lee W-R, Kim A, Kim K-S, et al. Alpha-lipoic acid attenuates atherosclerotic lesions and inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells through targeting of the Ras/MEK/ERK signaling pathway. *Mol Biol Rep*. 2012;39(6):6857-66.
6. Ismawati, Winarto, Sari RP. Pencegahan lesi aterosklerosis oleh asam alfa lipoat pada aorta mencit jantan (*Mus Musculus*) yang diberi diet tinggi kolesterol. *JIK*. 2011;5(1):19-25.
7. Szkudelski T. Streptozotocin-nikotinamid-induced diabetes in the rats. Characteristics of the experimental model. *EBM*. 2012;237:481-90.
8. Annadurai T, Muralidharan A, Joseph T, Hsu M, Thomas P, Garaldine P. antihyperglykemic and antioxidant effect of flavanone, naringenin, in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats. *J Physiol Biochem*. 2012;68:307-318.
9. Endardjo, Sutjahjo. Pedoman penanganan bahan pemeriksaan untuk histopatologi. Jakarta: IDAI. 2008.
10. Ismawati, Oenzil F, Yanwirasti, Yerizel E. Changes in expression of proteasome in rats at different stages of atherosclerosis. *Anat Cell Biol*. 2016;49(2):99-106.
11. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Hear Lung Circ*. 2013;22(6):399-411.
12. Zaragoza C, Guerro CG, Ventura JLM, Colio LB, Lavin B, Mallavia B, et al. Animal model of atherosclerosis. *J Biomed Biotech*. 2011;1-13
13. Campos AC, Fogaca MV, Aguiar DC, Guimaraes FS. Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2013;35:S101-11.
14. Ismawati, Sembiring LP. Pencegahan lesi aterosklerosis pada aorta abdominal oleh asam

- alfa lipoat pada tikus Diabetes Melitus. 2017;5(3):155-160
15. Tomita H, Hagaman J, Friedman MH, Maeda N. Relationship between hemodynamics and atherosclerosis in aortic arches of apolipoprotein E-null mice on 129S6/SvEvTac and C57BL/6J genetic backgrounds. *Atherosclerosis*. 2012;220(1):78-85
16. Heo KS, Fujiwara K, Abe JI. Shear stress and atherosclerosis. *Mol Cells*. 2014;37(6):435-40
17. Damora D. Efek pemberian asam alfa lipoat terhadap histopatologi arteri koronaria tikus yang diinduksi diabetes melitus tipe 2 [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Universitas Riau; 2017.