

Identifikasi Leptin setelah Luka Irisan pada Tikus yang Diberi Pakan Lemak Tinggi

Leptin Identification After Wound Incision in The Rats Fed High Fat Diet

Devita Anggraeni¹, Dhirgo Adji¹, Sitarina Widyarini²

¹Bagian Ilmu Bedah dan Radiologi, ²Bagian Patologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada
Jl. Fauna 2, Yogyakarta, Telp : 0274-6411525.
Email : devita_anggraeni@yahoo.com

Abstract

Leptin is a hormone produced by adipocytes and plays an important role in wound healing. The objectives of this research were to identify leptin and total leukocyte after incision on rat fed high fat diet and zinc topical application. Sixteen male Sprague Dawley rats at 3 months of age were used in this study. Rats were randomly allotted into 4 groups (A,B,C and D) of 4. Rats in group A and B were fed normal diet, while rats in group C and D were fed high fat diet. After 2 months of treatment, skin incision was done at the back side of the rat. Incision wound was then closed with single interrupted suture. The wound of the rats in group A and C was treated with vaseline, while in group B and D was treated with zinc 10%. Three days after surgery, blood was collected from each rat for leptin analysis and total leukocyte. Leptin level and total leukocyte were analyzed statistically using ANOVA for factorial experiment (2x2). The results showed that leptin level was significantly higher in rats fed high fat diet compared to that of the rats fed normal diet ($P<0.05$). There was no significant different on total leukocyte. Therefore, it was concluded that leptin level was affected by diet, while total leukocyte was not affected neither by diet nor topical application. However, total leukocyte tends to be lowered in the rat with zinc topical application.

Keywords: high fat diet, leptin, zinc, total leucocyte, Sprague Dawley rats

Abstrak

Leptin merupakan hormon yang disintesis oleh sel lemak dan berperan dalam proses kesembuhan luka. Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi leptin dan leukosit setelah luka irisan pada tikus yang diberi pakan lemak tinggi dan aplikasi topikal *zinc*. Penelitian ini menggunakan 16 ekor tikus Sprague Dawley jantan berumur tiga bulan (150-200 g). Tikus dibagi secara acak menjadi empat kelompok (A, B, C, dan D), masing-masing terdiri dari empat ekor. Kelompok A dan B diberi pakan normal, sedangkan kelompok C dan D diberi pakan lemak tinggi. Setelah dua bulan perlakuan pakan, seluruh tikus dioperasi untuk membuat luka irisan pada kulit, kemudian luka ditutup kembali dengan jahitan. Pada kelompok A dan C, luka jahitan diberi aplikasi topikal vaselin (tanpa *zinc*), sedangkan pada kelompok B dan D, luka jahitan diberi aplikasi topikal *zinc* 10%. Tiga hari setelah operasi, tikus diambil darahnya untuk analisis kadar leptin dan leukosit total. Data leptin dan total leukosit dianalisa dengan ANOVA untuk faktorial eksperimen (2x2). Hasil penelitian menunjukkan kadar leptin secara signifikan lebih tinggi pada tikus yang diberi pakan lemak tinggi dibandingkan tikus yang diberi pakan normal ($P<0.05$), sedangkan leukosit total tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Dengan demikian, kadar leptin pada hari ketiga setelah luka irisan dipengaruhi oleh pakan, yaitu pakan lemak tinggi dapat meningkatkan kadar leptin. Leukosit total tidak dipengaruhi oleh pakan dan aplikasi topikal, meskipun demikian, leukosit total cenderung lebih rendah pada tikus yang diberi aplikasi topikal *zinc*.

Kata kunci: pakan lemak tinggi, leptin, *zinc*, leukosit total, tikus Sprague Dawley

Pendahuluan

Kesembuhan luka merupakan proses yang kompleks, melibatkan inflamasi, pembentukan jaringan granulasi dan remodeling. Proses ini memerlukan interaksi berbagai macam sel, sitokin, faktor-faktor pertumbuhan dan molekul matriks ekstraseluler (Nascimento dan Costa, 2006). Menurut Giltzer dan Goebeler (2001), leukosit sebagai komponen seluler dalam proses inflamasi tidak hanya sebagai sel efektor imunologik untuk melawan agen patogen, tetapi juga terlibat dalam fase anabolik dari degradasi jaringan melalui produksi protease dan *reactive oxygen intermediate*, serta dalam fase katabolik dari pembentukan jaringan melalui produksi faktor-faktor pertumbuhan. Selain itu, leptin diketahui juga berperan dalam proses kesembuhan luka. Leptin adalah hormon polipeptida yang berasal dari sel-sel lemak (Scolaro *et al.*, 2010) dan sekresinya secara langsung proporsional dengan massa jaringan lemak (Fain *et al.*, 2004). Leptin sebagai molekul angiogenik dapat berperan dalam neovaskularisasi luka (Honigmann *et al.*, 1998) dan memiliki efek tambahan pada sel-sel yang terlibat dalam proses kesembuhan luka, seperti fibroblas, makrofag, dan keratinosit. Menurut Murad *et al.* (2003), sel-sel residen pada luka secara aktif terlibat dalam sintesis akut leptin dalam 4 jam pertama setelah luka dan produksi leptin akan berlanjut selama proses kesembuhan. Peningkatan sintesis leptin dalam luka menyebabkan peningkatan sementara leptin dalam sirkulasi. Efek menguntungkan dari leptin pada perbaikan luka adalah aksi mitogeniknya secara

langsung pada keratinosit di tepi luka (Frank *et al.*, 2000).

Zinc merupakan komponen penting pada sejumlah enzim dan berpengaruh terhadap berbagai proses biologi seperti kontrol terhadap asupan pakan dan pertumbuhan (Kwun *et al.*, 2007). Aplikasi topikal *zinc* diketahui juga dapat menurunkan diameter luka terbuka pada pasien yang mengalami defisiensi maupun non defisiensi *zinc* (Lasek dan Hallman, 1985). Menurut Mantzoros *et al.* (1998), defisiensi *zinc* pada rodensia dapat menurunkan leptin, sedangkan suplementasi *zinc* dapat meningkatkan leptin. *Zinc* merupakan mediator dalam produksi leptin, sedangkan leptin diketahui sebagai mediator kuat untuk proliferasi keratinosit. Oleh sebab itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi leptin dan leukosit selama proses kesembuhan luka dalam kondisi berat badan berlebih akibat pakan lemak tinggi dan kaitannya dengan *zinc*.

Materi dan Metode

Enam belas ekor tikus *Sprague Dawley* jantan berumur tiga bulan dengan berat badan 150-200 g digunakan dalam penelitian ini dan dipelihara di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM. Tikus dibagi secara acak menjadi empat kelompok (A, B, C, dan D), masing-masing terdiri dari empat ekor dan ditempatkan dalam kandang individu. Kelompok A dan B diberi pakan normal, sedangkan kelompok C dan D diberi pakan lemak tinggi (Tabel 1).

Tabel 1. Komposisi pakan tikus

Komponen pakan	Normal (g/100 g)	Lemak tinggi (g/100 g)
Vitamin	5	5
Selulosa	5	5
Lemak hewani	5	20
Sukrosa	10	10
Tepung jagung	50	35
Tepung telur	25	25
Total	100	100

Setelah dua bulan perlakuan pakan, seluruh tikus dioperasi untuk membuat luka irisan pada kulit. Sebelum dioperasi, tikus dianestesi umum terlebih dahulu dengan ketamine (50 mg/kg) dan xylazin (5 mg/kg) secara intramuskular (Fish *et al.*, 2008). Setelah tikus terbius, luka irisan dibuat sepanjang \pm 2 cm pada kulit di bagian dorsolateral punggung dengan kedalaman luka sampai dengan subkutan. Luka irisan kemudian dijahit kembali dengan menggunakan benang katun. Pada kelompok A dan C, luka jahitan diberi aplikasi topikal vaseline (tanpa *zinc*), sedangkan pada kelompok B dan D, luka jahitan diberi aplikasi topikal *zinc* 10%. Tiga hari setelah operasi, tikus diambil darahnya dan dimasukkan ke dalam *vacutainer* yang berisi *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) untuk analisis leptin dan total leukosit. Data leptin dan total leukosit dianalisis secara statistik dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk faktorial eksperimen (2x2). Faktor pertama adalah pakan (pakan normal dan lemak tinggi) dan faktor kedua adalah aplikasi topikal (tanpa *zinc*/vaselin dan *zinc* 10%) pada kulit yang luka. Hasil yang signifikan dilanjutkan dengan menggunakan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).

Analisis leptin dilakukan dengan metode ELISA di Laboratorium Bioteknologi Pusat Antar Universitas (PAU) UGM. Analisis ini menggunakan plasma darah dan dilakukan sesuai dengan prosedur standar dari *Rat Leptin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay kit* (Genway Biotech Inc).

Analisa darah untuk pemeriksaan total leukosit dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan UGM.

Hasil dan Pembahasan

Pada hari ketiga setelah operasi membuat luka irisan pada kulit, darah diambil untuk analisis leptin dan total leukosit pada tikus yang diberi perlakuan pakan normal dan lemak tinggi yang dikombinasi dengan aplikasi topikal tanpa *zinc* (vaselin) dan *zinc* 10%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar leptin dalam darah setelah operasi tidak dipengaruhi oleh aplikasi topikal, tetapi dipengaruhi oleh pakan ($P < 0.05$). Kadar leptin pada tikus yang diberi pakan lemak tinggi (4.86 ± 2.26 ng/ml) secara signifikan lebih tinggi dibandingkan tikus yang diberi pakan normal (2.61 ± 1.08 ng/ml) (Tabel 2).

Tabel 2. Mean leptin (ng/ml) dari tikus yang diberi perlakuan pakan normal dan pakan lemak tinggi yang dikombinasi dengan atau tanpa aplikasi topikal zinc pada hari 3 setelah operasi.

Perlakuan		Pakan		Mean
		Normal	Lemak tinggi	
Topikal	Tanpa zinc	3.20 ± 1.26	5.22 ± 2.90	4.21 ± 2.33
	Zinc	2.02 ± 0.45	4.50 ± 1.77	3.26 ± 1.78
	mean	2.61 ± 1.08 ^y	4.86 ± 2.26 ^x	3.74 ± 2.07

Huruf yang berbeda dalam baris yang sama (x,y) menunjukkan perbedaan signifikan pada level 5%

Hasil juga menunjukkan total leukosit tidak dipengaruhi oleh pakan dan aplikasi topikal. Di samping itu, tidak ada interaksi yang signifikan antara pakan dan aplikasi topikal terhadap kadar leptin dan total leukosit.

Diet lemak tinggi diketahui dapat mengakibatkan kelebihan berat badan dan berkembangnya obesitas (Nascimento dan Costa, 2006). Penelitian yang dilakukan oleh Lauterio *et al.* (1994) menunjukkan bahwa tikus yang diberi pakan lemak tinggi mengalami peningkatan berat badan serupa dengan kejadian pada manusia, dimana peningkatan berat badan mencerminkan peningkatan massa lemak (Dobrian *et al.*, 2000). Leptin merupakan hormon polipeptida yang disintesis dari sel-sel lemak (Scolaro *et al.*, 2010), di mana sekresinya secara langsung proporsional dengan massa jaringan lemak (Fain *et al.*, 2004). Oleh sebab itu, kadar leptin dalam darah tikus yang diberi pakan lemak tinggi secara signifikan lebih tinggi dibanding tikus yang diberi pakan normal.

Aksi leptin secara keseluruhan pada sistem imun yaitu mempunyai efek pro inflamatori, mengaktifasi sel-sel pro inflamatori, meningkatkan

respon *T-helper* 1 dan memperantarai produksi sitokin pro inflamatori lain seperti TNF α , IL2 dan IL 6 (Riejos *et al.*, 2010). Menurut Nascimento dan Costa (2006), jaringan lemak diketahui dapat memproduksi dan mensekresikan sitokin pro inflamatori. Coppack (2001) juga menyebutkan bahwa peningkatan jaringan lemak berhubungan dengan meningkatnya mediator pro inflamatori seperti TNF α dan berbagai macam IL (IL-1 β , IL-6 dan IL-8). Apabila jumlah sitokin pro inflamatori berlebihan, maka dapat memperpanjang masa inflamasi dan menunda kesembuhan luka.

Pada fase inflamasi terjadi peningkatan permeabilitas vaskuler yang diikuti dengan migrasi leukosit seperti neutrofil, limfosit dan makrofag. Neutrofil berperan untuk membersihkan debris seluler dan menyerang mikroorganisme di sekitar luka. Apabila tidak terjadi kontaminasi, maka migrasi neutrofil akan menurun beberapa hari pertama setelah luka (Mac Kay dan Miller, 2003). Neutrofil secara langsung akan menuju ke agen infeksi (kemotaksis) untuk menangkap bakteri kemudian memfagositosis dan membunuhnya dengan *reactive oxygen species* (ROS). Neutrofil,

monosit dan limfosit diketahui juga memiliki reseptor leptin. Stimulasi neutrofil oleh leptin dapat menyebabkan kemotaksis (Faggioni *et al.*, 2001) dan meningkatkan akumulasi ROS (Chezet *et al.*, 2001). Pada akhir fase inflamasi, monosit akan diubah menjadi makrofag yang berperan untuk membersihkan debris, membunuh bakteri dan menghancurkan sisa-sisa neutrofil. Setelah itu, makrofag kemudian akan mengalami transisi dari fungsi inflamasi ke fungsi perbaikan luka, yaitu dengan mensekresikan faktor kemotaktik dan faktor-faktor pertumbuhan yang akan menstimuli migrasi dan proliferasi keratinosit serta pembentukan matriks jaringan (Mac Kay dan Miller, 2003).

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa total leukosit tikus yang diberi aplikasi topikal *zinc* ($8.12 \pm 3.06 \times 10^3/\mu\text{l}$) cenderung lebih rendah dibandingkan dengan tikus yang diberi aplikasi topikal tanpa *zinc* ($10.51 \pm 1.43 \times 10^3/\mu\text{l}$) (Tabel 3). Aplikasi topikal *zinc* diketahui dapat menurunkan diameter luka

terbuka pada pasien yang mengalami defisiensi maupun non defisiensi *zinc* (Lasek dan Hallman, 1985) serta dapat mempercepat re-epitelialisasi (Agren *et al.*, 1991). Menurut Agren *et al.* (1991), efek anti inflamasi dari *zinc* dan meningkatnya level *zinc* dalam darah menunjukkan bahwa *zinc* dapat penetrasi ke jaringan yang lebih dalam dan diabsorpsi ke dalam sirkulasi darah. Pada tikus yang mengalami defisiensi *zinc* dapat terjadi penurunan sintesis DNA, penurunan deposisi jaringan granulasi, penurunan kekuatan regangan luka dan tertundanya penutupan luka yang terbuka.

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa kadar leptin pada hari ketiga setelah operasi membuat luka irisan dipengaruhi oleh faktor pakan, yaitu pakan lemak tinggi dapat meningkatkan kadar leptin. Total leukosit tidak dipengaruhi oleh pakan dan aplikasi topikal, meskipun demikian, total leukosit cenderung lebih rendah pada tikus yang diberi aplikasi topikal *zinc*.

Tabel 3. Mean leukosit ($10^3/\mu\text{l}$) dari tikus yang diberi perlakuan pakan normal dan pakan lemak tinggi yang dikombinasi dengan atau tanpa aplikasi topikal *zinc* pada hari 3 setelah operasi

Perlakuan		Pakan		Mean
		Normal	Lemak tinggi	
Topikal	Tanpa <i>zinc</i>	11.14 ± 1.34	9.89 ± 1.39	10.51 ± 1.43
	<i>Zinc</i>	9.30 ± 3.77	6.94 ± 2.00	8.12 ± 3.06
	mean	10.22 ± 2.80	8.41 ± 2.24	9.32 ± 2.62

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada DP2M, DIKTI, Kemendikbud, RI yang telah mendanai Penelitian Hibah Fundamental ini.

Daftar Pustaka

Agren, M.S., Chvapil, M. and Franzén, L. (1991) Enhancement of Re-epithelialization with Topical Zinc Oxide in Porcine Partial-Thickness Wounds. *J. Surg. Res.* 50: 101-105.

- Chezet, F.C., Poulin, A., Tridon, A., Sion, B. and Vasson, M.P. (2001) Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action? *J. Leukoc. Biol.* 69: 414–418.
- Coppack, S.W. (2001) Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 60: 349–356.
- Dobrian, A.D., Davies, M.J., Prewitt, R.L. and Lauterio, T.J. (2000) Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension* 35: 1009–1015.
- Fain, J.N., Madan, A.K., Hiler, M.L., Cheema, P. and Bahouth, S.W. (2004) Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145: 2273–2282.
- Faggioni, R., Feingold, K.R. and Grunfeld, C. (2001) Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. *FASEB Journal* 15: 2565–2571.
- Frank, S., Stallmeyer, B., Kampfer, H., Kolb, N. and Pfeilschifter, J. (2000) Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. *J. Clin. Invest.* 106: 501–509.
- Fish, R.E., Brown, M.J., Danneman, P.J. and Karaz, A.Z. (2008) *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animal*. 2nd Edition, Academic Press, Elsevier.
- Gillitzer, R. and Goebeler, M. (2001) Chemokines in cutaneous wound healing. *J. Leukoc. Biol.* 69: 513–521.
- Honigsmann, M.R.S., Nath, A.K., Murakami, C., García-Cardena, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C., Madge, L.A., Schechner, J.S., Schwabb, M.B., Polverini, P.J. and Flores-Riveros, J.R. (1998) Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*. 281: 1683–1686.
- Kwun, I.S., Cho, Y.E., Lomeda, R.A., Kwon, S.T., Kim Y. and Beattie, J.H. (2007) Marginal zinc deficiency in rats decreases leptin expression independently of food intake and corticotrophin-releasing hormone in relation to food intake. *British J. Nutr.* 98: 485–489
- Lasek, J and Hallmans, G. (1985) The Effect of topical zinc absorption from wounds on growth and the wound healing process in zinc deficient rats. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* 19: 119
- Lauterio, T.J., Bond, J.P. and Ulman, E.A. (1994) Development and characterization of a purified diet to identify obesity-susceptible and resistant rat populations. *J. Nutr.* 124: 2172-2178.
- MacKay, D. and Miller, A.L., (2003) Nutritional Support for Wound Healing. *Altern. Med. Rev.* 8: 359-377.
- Mantzoros, C.S., Prasad, A.S., Beck, F.W.J., Grabowski, S., Kaplan, J., Adair, C. and Brewer, G.J. (1998) Zinc May Regulate Serum Leptin Concentrations in Humans. *J. A.C. Nutr.* 17: 270–275.
- Murad, A., Nath, A.K., Cha, S.T., Demir, E., Riveros, J.F. and Honigman, M.R.S. (2003) Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing. *FASEB* 17: 1896-1897.
- Nascimento, A.P. and Costa, A.M.A. (2006) Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. *British J. Nutr.* 96: 1069–1077.
- Riejos, P.F., Najib, S., Alvarez, J.S., Romero, C.M., P'erez, A.P., Yanes, C.G. and Margalet, V.S. (2010) Role of Leptin in the Activation of Immune Cells. *Mediators of Inflammation*. Retrieved Des 17, 2011. <http://www.hindawi.com/journals/mi/2010/568343/>
- Scolaro, L., Cassone, M., Kolaczynski, J.W., Otvos, L. and Surmacz, E. (2010) Leptin-based Therapeutics. *Expert. Rev. Endocrinol. Metab.* 5: 875-889.
- MacKay, D. and Miller, A.L. (2003) Nutritional Support for Wound Healing. *Altern Med Rev* 8: 359-377.
- Mantzoros, C.S., Prasad, A.S., Beck, F.W.J., Grabowski, S., Kaplan, J., Adair, C. and Brewer, G.J. (1998) Zinc May Regulate Serum Leptin Concentrations in Humans. *J. AC. Nutr.* 17: 270–275.

Murad, A., Nath, A.K., Cha, S.T., Demir, E., Riveros, J.F., Honigman, M.R.S. (2003) Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing. *FASEB*.17 : 1896-1897.

Nascimento, A.P. and Costa, A.M.A. (2006) Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. *British J. Nutr.* 96 : 1069–1077.

Riejos, P.F., Najib, S., Alvarez, J.S., Romero, C.M., P´erez, A.P., Yanes, C.G. and Margalet, V.S. (2010) *Role of Leptin in the Activation of Immune Cells. Mediators of Inflammation*, Hindawi Publishing Corporation.

Scolaro, L., Cassone, M., Kolaczynski, J.W., Otvos, L. and Surmacz, E. (2010) Leptin-based Therapeutics. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 5: 875-889.