

Endotelium Arteria Coronaria Tikus Putih *Sprague Dawley* Hiperlipidemia setelah diberi Chitosan Cangkang Udang Laut (*Penaeus monodon* F.)

Sri Isdadiyanto

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Email : isdadiyanto@yahoo.com

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the influence of chitosan on arteria coronaria endothelium of Sprague Dawley rats induced by high fat ration. The animals for this study were twenty adult male rats divided into four groups, i.e. group I as the control was fed with basal ration containing normal fat for 3 months, group II was fed ration containing high fat for 3 months, group III was fed ration containing high fat and given chitosan 180 mg per kg body weight per day orally in 2 ml aquadest for 3 months, group IV was fed ration containing high fat for 3 months and after 1 month given chitosan 180 mg per kg body weight per day orally in 2 ml aquadest for 2 months. Each group consisted of five animals. After 90 days, the rats were necropsied and the heart were collected to histopathological. CRP expression on coronary artery of rats that given normal diet were negative, whereas rats that given high fat diet and no treatment were positive. CRP expression of coronary artery for rats that given high fat diet and given chitosan were negative, but rats that given chitosan after one month were positive. Based on the result of this study, it was concluded that high fat ration was a major factor induced inflammation in coronary artery and chitosan was able to prevent disfunction of arteria coronaria endothelium cel.

Keywords: Atherosclerosis, arteria coronaria endothelium, chitosan, high fat ration.

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian chitosan terhadap endotelium arteria koronaria yang diberi lemak tinggi. Sebanyak 20 ekor tikus putih *Sprague Dawley* jantan dewasa digunakan sebagai hewan uji. Tikus putih dibagi menjadi empat kelompok lima ekor per kelompok. Kelompok I sebagai kontrol diberi pakan lemak normal. Kelompok II diberi pakan lemak tinggi. Kelompok III diberi lemak tinggi + chitosan 180 mg/ kg BB/ hari. Kelompok IV diberi lemak tinggi dan setelah satu bulan diberi chitosan 180 mg/ kg BB/ hari. Chitosan diberikan per oral dalam larutan 2 ml aquades. Penelitian dilakukan selama 90 hari. Pada hari terakhir perlakuan, hewan dikorbankan dan diambil jantungnya untuk pembuatan preparat histopatologi. Pengamatan endotelium arteria koronaria dengan preparat imunohistokimia dibuat dengan metode *streptavidin-biotin* dan dianalisis secara deskriptif. Hasil uji imunohistokimia ekspresi CRP endotelium arteria koronaria tikus putih yang diberi pakan normal adalah negatif. Gambaran imunohistokimia ekspresi CRP endotelium arteria koronaria tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi adalah positif. Uji imunohistokimia ekspresi CRP endotelium arteria koronaria tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi dan diberi *chitosan* 180 mg/ kg BB/ hari adalah negatif. Endotelium arteria koronaria tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi, kemudian setelah 1 bulan perlakuan, hewan tersebut juga diberi *chitosan* 180 mg/ kg BB/ hari adalah positif. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan, bahwa pakan lemak tinggi adalah faktor utama penyebab kejadian aterosklerosis yang diawali dengan adanya disfungsi sel-sel endotelia dan chitosan dapat mencegah terjadinya disfungsi sel-sel endotelia.

Kata kunci : Aterosklerosis, endotelium arteria koronaria, chitosan, pakan lemak tinggi

PENDAHULUAN

Aterosklerosis merupakan penyakit arterial yang ditandai dengan penebalan dinding arteri karena proliferasi sel otot polos tunika media, akumulasi lipid yang disertai dengan pembentukan jaringan fibrosa, kalsifikasi dan berhubungan dengan perubahan tunika intima (Ross, 1999). Aterosklerosis butuh waktu yang lama. Williams *et al.*, (2002) melaporkan setelah enam bulan perlakuan pakan berkolesterol tinggi, terdapat perubahan struktur arteria yang ditandai dengan terbentuknya *plaque* yang mengandung jaringan fibrosa dan serabut elastin pada lumen arteria. *Plaque* ini terjadi karena akumulasi lipid pada dinding arteri yang akan mengikat jaringan fibrosa dan mengubah bentuk normal tunika intima (Stary *et al.*, 1995). Libby dan Theroux (2005) melaporkan bahwa kadar kolesterol LDL yang tinggi memicu penimbunan kolesterol di sel pembuluh darah, yang menyebabkan munculnya aterosklerosis dan terbentuknya *plaque* di dinding pembuluh darah.

Peningkatan kadar kolesterol akibat konsumsi lemak dalam jumlah tinggi terjadi karena lemak yang dikonsumsi sebagian akan diubah menjadi kolesterol. Lemak yang berasal dari sintesis lokal dan makanan, akan ditransportasikan ke hati. Lemak yang berasal dari sintesis lokal dibebaskan dan ditransportasikan ke hati dalam bentuk asam lemak bebas, sedangkan lemak dari makanan ditransportasikan dalam bentuk kilomikron (Mayes dan Botham, 2003). Schmidt dan Fagerberg (2008) menyatakan bahwa penyakit pada arteri dapat terjadi dengan peningkatan kadar kolesterol *low density*

lipoprotein (LDL) dan *very low density lipoprotein* (VLDL) dalam darah (hiperkolesterol).

Aterosklerosis merupakan penyebab kematian utama di negara berkembang dan melalui proses yang kompleks, melibatkan faktor genetik, faktor lingkungan dan berbagai tipe sel yang saling berpengaruh satu dengan yang lain. Lesi aterosklerotik diawali oleh adanya kerusakan sel-sel endotel pembuluh darah (Maturana *et al.*, 2007). Endotel bersifat antitrombogenik, yang mencegah pembekuan darah. Bila sel-sel endotel rusak akibat lesi aterosklerotik, jaringan ikat subendotelium yang terpapar akan menginduksi penggumpalan trombosit darah. Penggumpalan trombosit mengawali sederetan kejadian yang menghasilkan fibrin dan fibrinogen darah.

Chitosan merupakan produk deasetilasi dari chitin yang ditemukan pada cangkang udang *Penaeus monodon* (Hargono *et al.*, 2008). Penelitian terakhir dilaporkan biopolimer alami chitosan disintesa dari jenis udang *Penaeus monodon* (Sewvandi dan Adikary, 2012). Chitosan merupakan turunan chitin, suatu amino polisakarida yang mengalami asetilasi, terdapat pada eksoskeleton dan kulit arthropoda termasuk insekta, ketam, dan udang (Vahouny *et al.*, 1983; Fan *et al.*, 2006). Chitosan merupakan polimer alami, tidak toksik, biokompatibel dan dapat dibiodegradasi (Hejazi dan Amiji, 2003). Chitosan dapat menangkap lemak di lambung sebelum dimetabolisme (Maezaki *et al.*, 1993). Menurut Gallaher *et al.*, (2002) chitosan bermuatan positif dan mampu berikatan dengan molekul bermuatan negatif, seperti lemak dan garam empedu kemudian membentuk ikatan ionik. Lemak yang terikat oleh chitosan menjadi sebuah massa yang

besar sehingga tidak dapat diabsorpsi dalam traktus digestivus. Isdadiyanto *et al.*, (2013) menyatakan chitosan dapat mencegah terbentuknya plak pada arteria koronaria.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian chitosan terhadap histopatologis endotelium arteri koronaria tikus putih yang diinduksi lemak tinggi. Manfaat penelitian ini untuk mencari bahan alternatif alami untuk mengatasi penyakit penyumbatan arteri yang disebabkan hiperlipidemia.

METODE PENELITIAN

Tikus putih *Sprague Dawley* jantan sebanyak 20 ekor, umur 1,5 bulan dipergunakan sebagai hewan uji. Tikus putih diadaptasikan selama seminggu dalam satu kandang satu ekor tikus diberi pakan standar (mengandung lemak normal 4,5%) dan minum secara *ad libitum*. Tikus putih dibagi menjadi empat kelompok masing-masing kelompok terdiri lima ekor. Kelompok I adalah kelompok kontrol, yaitu tikus putih yang diberi pakan mengandung lemak normal selama tiga bulan. Kelompok II adalah kelompok tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi (mengandung lemak 20%) selama tiga bulan. Kelompok III adalah kelompok tikus putih yang diberi pakan mengandung lemak tinggi dan diberi chitosan 180 mg/ kg BB/ hari dalam 2 ml aquades selama tiga bulan. Kelompok IV adalah tikus putih diberi pakan lemak tinggi selama tiga bulan, setelah satu bulan pertama, hewan tersebut juga diberi chitosan 180 mg/ kg BB/ hari dalam 2 ml aquades selama dua bulan. Chitosan asal cangkang udang laut (*Penaeus monodon*) diberikan per oral dengan bantuan spuit injeksi 2,5 ml berkanula. Pada hari

terakhir perlakuan, hewan dikorbankan nyawanya dan jantungnya diambil kemudian dimasukkan dalam botol film yang berisi 10% *neutral buffered formalin* untuk pembuatan preparat histopatologi.

Pembuatan Preparat Histopatologi

Preparat histopatologi arteri koroner dibuat dengan metode parafin dan fiksatif yang digunakan adalah larutan 10% *neutral buffered formalin*. Preparat imunohistokimia dibuat dengan metode *streptavidin-biotin*.

Analisis Data

Gambaran histopatologis endotelium arteria koronaria dianalisis secara deskriptif. Untuk mengetahui kejadian awal aterosklerosis dilakukan analisis secara deskriptif terhadap gambaran imunohistokimia positif atau negatif. Adanya ekspresi antigen ditunjukkan dengan adanya warna coklat muda sampai coklat tua pada potongan jaringan jika dilihat di bawah mikroskop cahaya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis imunohistokimia dengan *streptavidin-biotin* terhadap endotelium arteria koronaria tikus putih secara lengkap disajikan pada Tabel 1. Hasil uji imunohistokimia ekspresi CRP endotelium arteria koronaria tikus putih yang diberi pakan normal (K) adalah negatif (Gambar 1). Gambaran imunohistokimia ekspresi CRP endotelium arteria koronaria tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi (P1) adalah positif (Gambar 2). Uji imunohistokimia ekspresi CRP endotelium arteria koronaria tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi dan diberi *chitosan* 180 mg/ kg BB/ hari (P2) adalah negatif (Gambar 3).

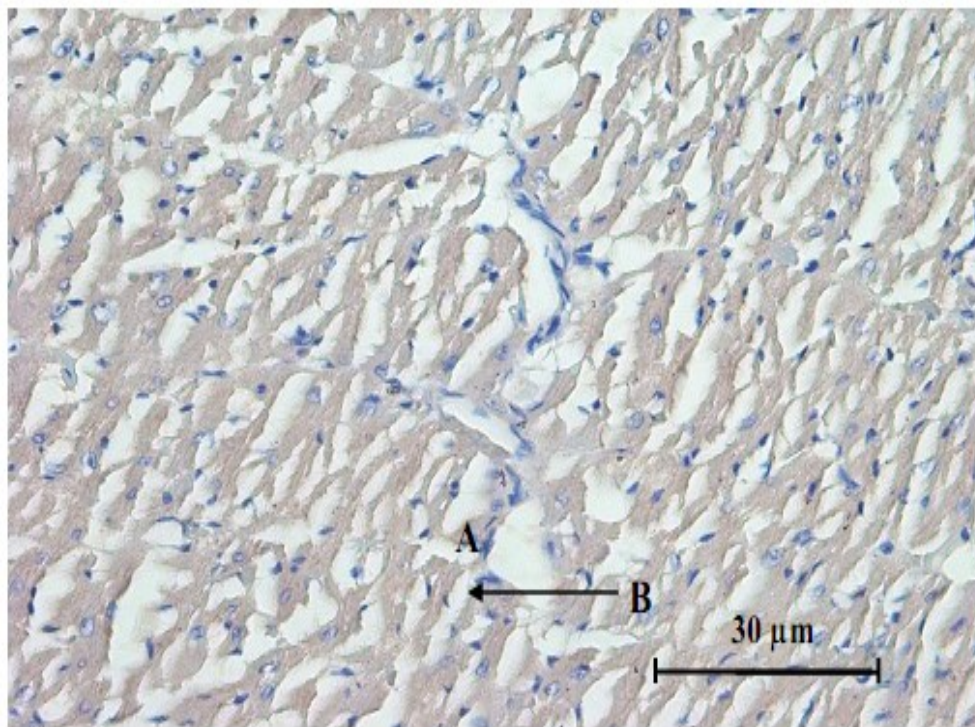
Hasil uji imunohistokimia ekspresi CRP endotelium arteria koronaria tikus putih yang diberi pakan normal (K) adalah negatif (Gambar 1). Gambaran imunohistokimia ekspresi CRP endotelium arteria koronaria tikus putih yang

diberi pakan lemak tinggi (P1) adalah positif (Gambar 2). Uji imunohistokimia ekspresi CRP endotelium arteria koronaria tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi dan diberi *chitosan* 180 mg/ kg BB/ hari (P2) adalah negatif (Gambar 3).

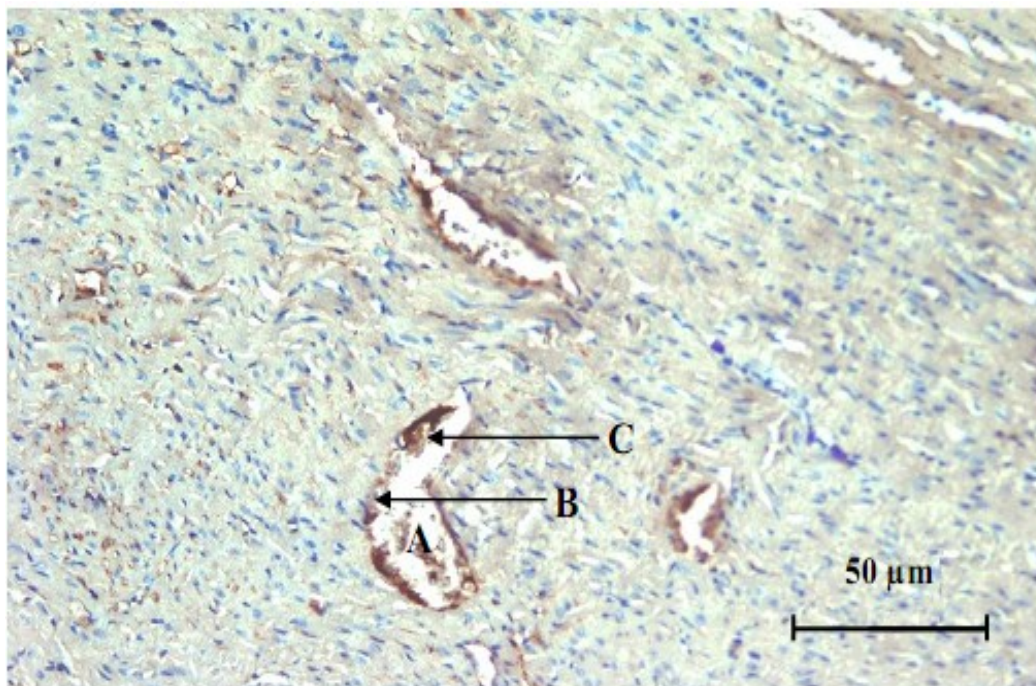
Tabel 1. Hasil uji imunohistokimia terhadap ekspresi CRP endotelium arteria koronaria tikus putih

No	K	P1	P2	P3
1	Negatif	Positif	Negatif	Positif
2	Negatif	Positif	Negatif	Positif
3	Negatif	Positif	Negatif	Positif
4	Negatif	Positif	Negatif	Positif
5	Negatif	Positif	Negatif	Positif

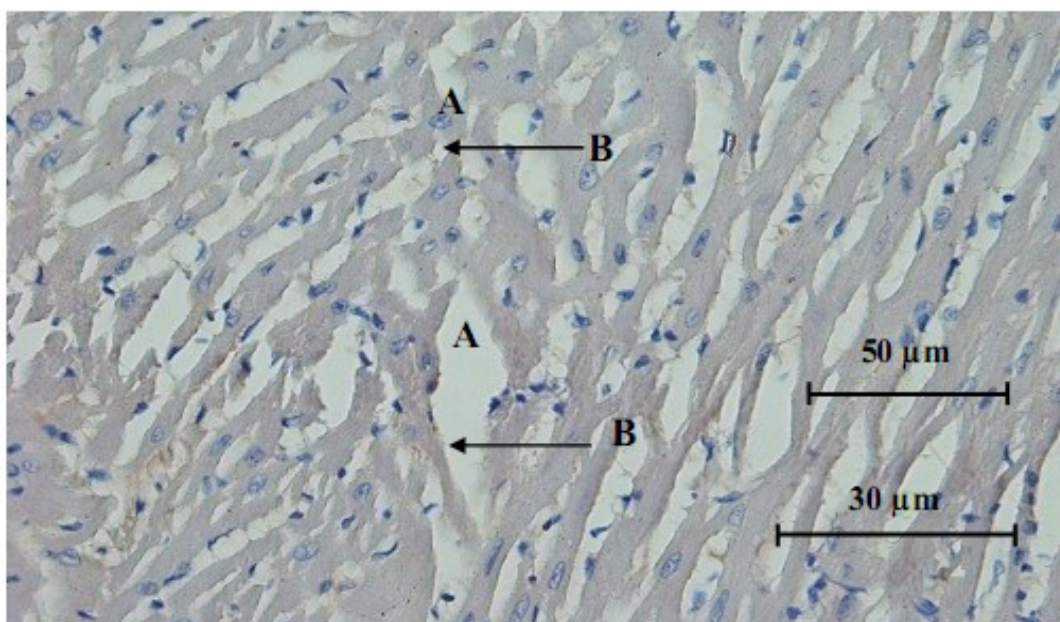
Keterangan : K : kontrol, P1 : Pakan lemak tinggi, P2 : Pakan lemak tinggi + chitosan, P3 : Pakan lemak tinggi + chitosan setelah 1 bulan



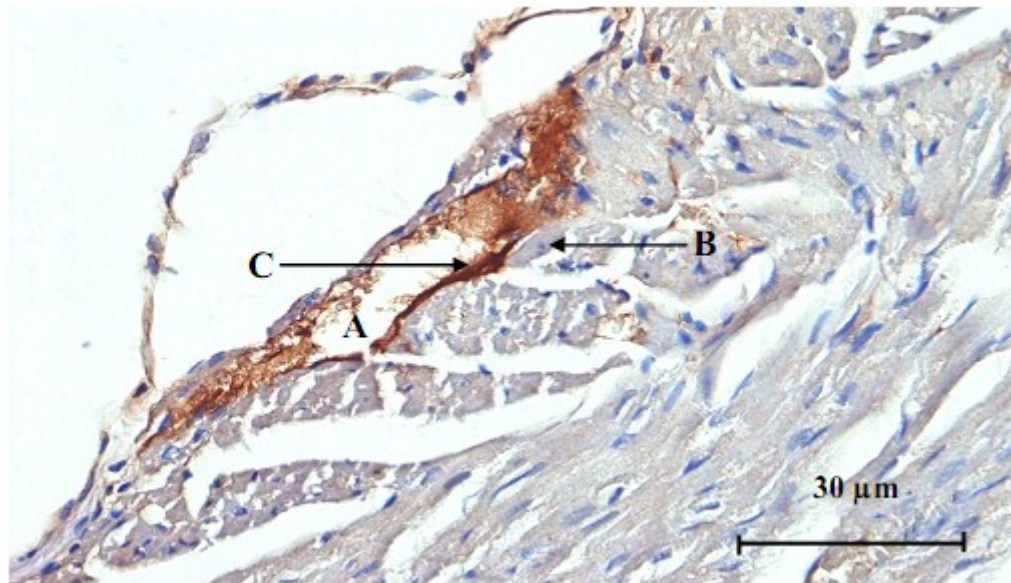
Gambar 1. Gambaran imunohistokimia arteria koronaria tikus putih yang diberi pakan normal (K) selama 90 hari. Pada arteria koronaria terlihat normal (tidak ada warna coklat tua). Lumen arteria koronaria (A) dan Dinding arteria koronaria (B) (SB, 1000x.).



Gambar 2. Gambaran imunohistokimia arteria koronaria tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi (P1) selama 90 hari. Pada arteria koronaria terlihat terjadi reaksi imunologis CRP positif (CRP terlihat coklat tua). Lumen arteria koronaria (A), Dinding arteria koronaria (B) dan CRP terlihat coklat tua (C) (SB, 500x.)



Gambar 3. Gambaran imunohistokimia arteria koronaria tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi dan diberi *chitosan* 180 mg/ kg BB/ hari (P2) selama 90 hari. Pada arteria koronaria terlihat normal (tidak ada warna coklat tua). Lumen arteria koronaria (A) dan Dinding arteria koronaria (B) (SB, 1000x.)



Gambar 4. Gambaran imunohistokimia arteria koronaria tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi selama 90 hari, kemudian setelah 1 bulan perlakuan, hewan tersebut juga diberi *chitosan* 180 mg/ kg BB/ hari (P3). Pada arteria koronaria terlihat terjadi reaksi imunologis CRP positif (CRP terlihat coklat tua). Lumen arteria koronaria (A), Dinding arteria koronaria (B) dan CRP terlihat coklat tua (C) (SB, 1000x.).

CRP akan dihasilkan apabila terjadi peradangan pada arteria koronaria. Hal ini berarti *chitosan* yang diberikan secara simultan dengan pakan lemak tinggi mampu mencegah terjadinya peradangan di arteria koronaria sehingga tidak terbentuk warna coklat tua. Uji imunohistokimia ekspresi CRP arteria koronaria tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi, kemudian setelah 1 bulan perlakuan, hewan tersebut juga diberi *chitosan* 180 mg/ kg BB/ hari (P3) adalah positif (Gambar 4).

Terbentuknya warna coklat tua ini, berarti perlakuan pakan lemak tinggi yang diberikan sudah menyebabkan peradangan pada arteria koronaria dengan terekspresinya CRP, sehingga dapat menjadi penanda terjadinya awal aterosklerosis. Menurut Jialal *et al.* (2004) kejadian aterosklerosis diawali dengan adanya disfungsi sel-sel endotelium. Disfungsi sel-sel

endotelium yang ditandai dengan perubahan kondisi, seperti defisiensi *nitric oxide* (NO) dan prostasiklin, peningkatan *platelet derived growth factor* (PDGF), endotelin-1 (ET-1), angiotensin II (Ang II), dan *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1).

Menurut Key (2009) prinsip dasar dari metode imunohistokimia *streptavidin-biotin* adalah adanya ikatan antigen spesifik dengan antibodi sehingga terjadi presipitasi kromogen (presipitat) dan presipitat tersebut akan terlihat berwarna. Pada penelitian ini yaitu adanya antigen (CRP) berikatan dengan antibodi anti-CRP sehingga terjadi presipitasi kromogen (presipitat). Presipitat tersebut akan terlihat berwarna coklat tua sesuai dengan kromogen 3'3 diaminobensidin (DAB) yang digunakan dalam penelitian ini. Antigen (CRP) terlihat berwarna coklat tua akibat deposisi presipitat pada CRP yang terdapat dalam

jaringan. Hasil uji imunohistokimia dengan *streptavidin-biotin* terhadap ekspresi CRP arteria koronaria adalah positif untuk kelompok P1 yaitu kelompok tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi (Gambar 2) dan kelompok P3 yang diberi pakan lemak tinggi + *chitosan* setelah 1 bulan perlakuan (Gambar 4). Terbentuknya warna coklat tua ini, berarti perlakuan pakan lemak tinggi yang diberikan sudah menyebabkan peradangan pada arteria koronaria yang menghasilkan CRP sehingga dapat menjadi penanda terjadinya awal aterosklerosis, ini sesuai dengan pendapat Pepys & Hirschfield (2003) yang menyatakan bahwa peningkatan produksi CRP menjadi penanda peradangan, kemungkinan dapat digunakan untuk memprediksi kejadian aterotrombosis dan proses aterogenesis. Didukung pula hasil penelitian Jialal *et al.* (2004) yang menunjukkan bahwa kejadian aterosklerosis diawali dengan adanya disfungsi sel-sel endotelial, CRP juga diproduksi dalam lesi aterosklerosis (oleh otot polos dan makrofag) dan CRP diproduksi karena induksi peroksidasi lipid dan infeksi. Disfungsi sel endotelium ditandai dengan perubahan kondisi, seperti defisiensi *nitric oxide* (NO) dan prostasiklin, peningkatan *platelet derived growth factor* (PDGF), endotelin-1 (ET-1), angiotensin II (Ang II), dan *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1). Untuk kelompok tikus putih yang diberi pakan lemak tinggi + *chitosan* secara simultan (P2) hasilnya negatif terhadap CRP (Gambar 3), hal ini berarti *chitosan* yang diberikan secara simultan dengan pakan lemak tinggi mampu mencegah terjadinya peradangan di arteria koronaria sehingga tidak terbentuk warna coklat tua. Lebih lanjut Jialal *et al.* (2004) melaporkan bahwa CRP yang dihasilkan sel-sel otot polos

menyebabkan peningkatan reseptor Angiotensin tipe-1 (Ang-1), peningkatan radikal oksigen (ROS), peningkatan proliferasi sel otot polos pembuluh, peningkatan NF κ b, peningkatan MAP kinase, dan peningkatan iNOS. Pada sel endotelium, CRP menyebabkan penurunan eNOS, prostasiklin, peningkatan PAI-1, ET-1, MCP-1, ICAM, VCAM, E-selektin dan IL-6. Sedangkan pada monosit, CRP menyebabkan peningkatan ROS, sitokin (IL-1, TNF α , IL-6), kemotaktik faktor, faktor jaringan, *uptake* LDL teroksidasi, adesi pada sel endotel dan MMP-1.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan, bahwa pakan lemak tinggi adalah faktor utama penyebab kejadian aterosklerosis yang diawali dengan adanya disfungsi sel-sel endotelial dan *chitosan* dapat mencegah terjadinya disfungsi sel-sel endotelial.

DAFTAR PUSTAKA

- Fan D, Zhu X, Xu M, Yan J. 2006. Adsorption properties of Chromium by chitosan coated montmorillonite. *J Biol Sci* 6:941-945.
- Gallaher DD, Gallaher CM, Mahrt GJ, Carr TP, Hollingshead CH, Heslink Jr. R, Wise J. 2002. A glucomannan and chitosan fiber supplement decreases plasma cholesterol excretion in overweight normocholesterolemic humans. *J Am Coll Nutr* 21: 428-433.
- Hargono, Abdullah, and Sumantri I. 2008. Production of chitosan is made of the *Penaeus monodon* shell waste and application to serum cholesterol reduction. *Reaktor*. 12:53-57.

- Hejazi R and Amiji M. 2003. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 89: 151-165.
- Isdadiyanto, S. Moeljopawiro, S, Puniawati, N. dan Wuryastuty H. 2013. Chitosan Mempertipis dinding dan Memperbesar Diameter Lumen Arteri Koroner Tikus Putih yang Diberi Lemak Tinggi. *Journal Veteriner*. 14:310-316.
- Jialal, I. S. Devaraj and S.K. Venugopal. 2004. C-Reactive Protein: Risk marker or mediator in atherothrombosis. *Hypertension*. 44: 6-11.
- Key, M. 2009. *Immunohistochemical Staining Methods: Immunohistochemistry staining methods*. Fifth Edition. Dako. North America. Carpinteria. California. Pp. 57-59.
- Libby P, and Theroux P. 2005. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 111:3481-3488.
- Maezaki YK, Tsuji Y, Nakagawa Y, Kawai T, Tsugita W, Takekawa A, Terada H, Hara, Mitsuoka T. 1993. Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biochi Biotech and Biochem* 57: 1439-1444.
- Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. 2007. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: Current concepts. *Clinic Version Impresa*. 62: 1807-5932. Sao Paulo.
- Mayes PA. and Botham KM. 2003. *Cholesterol Synthesis, Transport, and Excretion. Harper's Illustrated Biochemistry, 26nd edition*. London. Mc.Graw Hill, 219-227.
- Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield. 2003. C-reactive protein: A critical update. *J. Clin. Invest*. 111: 1805-1812.
- Ross R. 1999. Atherosclerosis An Inflammatory Disease. *NEJM* 340: 115-126.
- Schmidt C, and Fagerberg B. 2008. Apo B/apoA-1 ratio is related to femoral artery plaques in 64-year-old women also in cases with low LDL cholesterol. *Atherosclerosis*. 196: 817-822.
- Sewvandi GA and Adikary SU. 2012. Synthesizing and characterization of natural biopolymer chitosan derived from shrimp type, *Penaeus monodon*. *Tropical Agricultural Research*. 23:272-276.
- Stary HC, Chandler A, Dinsmore BRE, Fuster V, Glagov S, Insull Jr. W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. 1995. A definition of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Circulation*. 92: 1355-1374
- Vahouny GV, Connors WE, Subramanian S, Lin DS, Gallo LL. 1983. Comparative lymphatic absorption of sitosterol, stigmasterol, fucosterol and differential inhibition of cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 33: 576-589.
- Williams HJ, Johnson L, Carson KGS, Jackson CL. 2002. Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice. *ATVB Journal*. 22:788-795.