

EFEK PEMBERIAN *ALPHA LIPOIC ACID* PADA ENDOTEL TIKUS PUTIH YANG DIINDUKSI *LIPOPOLISAKARIDA*

Olvie Syenni Datu¹⁾, Fransisco P Sumalong²⁾

¹⁾Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

²⁾Instalasi Farmasi, Dinas Kesehatan Provinsi SULUT Manado,

ABSTRACT

Endothelial dysfunction play a major role in the pathogenesis of vascular diseases, especially atherosclerosis. Endothelial dysfunction causes endothelial cells are activated and resulting homeostasis changes in endothelial cell. Rats were induced by LPS 0.5 mg/kg and treated with ALA at doses of 30 mg/kg, 60 mg/kg and 120 mg/kg BW for 2 weeks which given 1 hour before the LPS administration. This study show that LPS causes morphological changes in rat aorta based on histochemical staining show that endothelial cell are irregular, not homogeneous and increase permeability but in group that received show that ALA can improve the morphological of endothelial cell by reduces ROS, regenerates of exogenous and endogenous antioxidants. Administration of ALA and LPS reduce the rats body weight but not significant compared to the control group. Therefore can be concluded that administration of ALA can prevent endothelial dysfunction.

Keywords: *Endothel dysfunction, alpha lipoic acid, lipopolysaccharide*

ABSTRAK

Disfungsi endotel berperan penting pada pathogenesis penyakit vascular, khususnya aterosklerosis. Disfungsi endotel menyebabkan sel endotel teraktivasi dan terjadi perubahan homeostatis pada sel endotel. Tikus diinduksi dengan LPS 0.5 mg/Kg BB dan selanjutnya di terapi dengan ALA pada dosis 30mg/Kg BB, 60mg/Kg BB, dan 120mg/Kg BB selama 2 minggu 1 jam sebelum pemerian LPS. Penelitian ini menunjukan bahwa LPS dapat menyebabkan perubahan morfologi pada sel nedotel berdasarkan pada hasil pewarnaan jaringan yang menunjukan sel endotel yang tersusun tidak beraturan, tidak homogeny dan terjadi peningkatan permeabilitas tapi pada kelompok perlakuan yang mendapatkan terapi ALA menunjukan ALA dapat memperbaiki morfologi sel endotel dengan mengurangi ROS, meningkatkan antioksidan eksogen dan endogen. Pemberian ALA dan LPS tidak menyebabkan perubahan berat badan tikus yang signifikan di dibandingkan dengan kelompok control. Sehingga dapat disimpulkan pemberian ALA dapat mencegah disfungsi endotel.

Kata Kunci: disfungsi endotel, histokimia, *alpha lipoic acid*, lipopolisakarida

PENDAHULUAN

Penyakit Kardiovaskular merupakan penyakit yang menyebabkan \pm 36% dari total kematian di Indonesia. Berdasarkan laporan WHO pada tahun 2008 ada tujuh ratus lima ribu orang yang meninggal karena penyakit kardiovaskular (WHO, 2011).

Penyebab utama dari penyakit ini adalah aterosklerosis (Li *et al*, 2009). Aterosklerosis merupakan penyakit inflamasi kronis yang ditandai dengan penurunan ketebalan arteri secara berangsur-angsur, penyempitan dan pengurangan suplai darah (Xu *et al*, 2013).

Tahap awal pada patogenesis penyakit kardiovaskular adalah disfungsi endotel. Sel endotel merupakan barier yang memisahkan trombosit dan protein-protein koagulasi, dari komponen-komponen trombogenik yang terdapat pada jaringan sub endotel (Lee *et al*, 2012)

Sel Endotel berfungsi sebagai regulator lokal aliran darah yaitu dengan menghasilkan senyawa-senyawa vasoaktif seperti *endothelial derived relaxation factor* (EDRF) dan *prostaglandin prostacyclin* (PGI₂) (Caterina dkk, 2007) Aktivasi faktor transkripsi *Nuclear Factor Kappa β* (NF- κ B) dan overproduksi *reactive oxygen species* (ROS) berkontribusi pada proses inflamasi pada sel endotel (Caterina *et al*, 2007., Liu *et al*, 2012).

Disfungsi endotel merupakan lesi aterosklerotik dini, dimana terjadi respon inflamasi yang merubah homeostatis sel endotel, peningkatan permeabilitas sel endotel yang menyebabkan terjadinya migrasi leukosit pada intima dan adhesivitas terhadap lipoprotein, leukosit, platelet dan kandungan plasma lain (Ribeiro *et al*, 2009).

Paparan LPS pada sel endotel baik secara *in vivo* dan *in vitro* menyebabkan aktivasi pada sel endotel. Penelitian yang menggunakan model hewan coba

menunjukkan paparan LPS dapat meningkatkan lesi aterosklerosis (Li *et al*, 2009). LPS akan berikatan dengan reseptor dan mengaktifkan *signaling* intraseluler termasuk NF- κ B dan pembentukan ROS (Wang *et al*, 2000)

Salah satu terapi yang efektif mengatasi permasalahan stres oksidatif adalah penggunaan antioksidan, ada beberapa Antioksidan yang telah uji berpotensi pada pengobatan disfungsi endotel seperti vitamin C dan vitamin E.

Alpha lipoic acid (ALA) atau 1,2-dithiolane-3-pentanoic acid, yang adalah komponen dithiol yang terbentuk secara alami melalui mekanisme enzimatik pada mitokondria dari asam oktanoic. ALA adalah salah satu antioksidan kuat. ALA adalah kofaktor yang diperlukan untuk *mitochondrial α -ketoacid dehydrogenase*/reaksi bioenergetik mitokondria dan dengan demikian berperan penting pada metabolisme energi pada mitokondria (Shay *et al*, 2009).

METODOLOGI PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Departemen Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Soetomo, Penelitian ini dilakukan dari Bulan Februari-April 2015.

Alat dan Bahan

a. Alat

Timbangan tikus, Preparat untuk mikroanatomi : Disecting kit, staining jar, mikrotom, waterbath, objek glas, dek glas, penjepit kayu, mikroskop, kamera.

b. Bahan

Hewan percobaan, *Alpha-lipoic acid* (ALA) (Dexa Medica), Pakan hewan uji

pBR-II (Comfeed), NaCl 0,9% (Widatra), Aquadestilata (PT. Brataco), Eter (PT. Brataco), CMC Na 0,1% (PT. Brataco), Lipopolisakarida *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich), Hematoksin-Eosin

Pembuatan model hewan coba terinduksi LPS

LPS dibuat dengan melarutkan 5 mg LPS kedalam 100 mL NaCl 0,9% sehingga diperoleh konsentrasi 0,05 mg/mL. LPS 2 mL disuntikan secara intraperitoneal (IP) pada hewan coba kelompok II-V, sedangkan hewan coba kelompok I sebagai kelompok kontrol disuntik dengan NaCl 0,9%. Dosis LPS yang disuntikan adalah 0,5 mg/kg BB di suntikan 3 kali setiap 3 hari pada minggu pertama penelitian (Zhao *et al.*, 2014., Lee *et al.*, 2012).

Pembuatan dan Pemberiaan sediaan uji ALA

Dosis yang digunakan pada penelitian ini adalah 30 mg/kg BB, 60 mg/kg BB dan 120 mg/kg BB. Sediaan uji dengan dosis 25 mg/kg BB dibuat dengan mensuspensikan ALA sejumlah 300 mg ke dalam 100 mL NaCMC 0,1%, untuk dosis 60 mg/kg BB dibuat dengan mensuspensikan ALA sejumlah 600 mg ke dalam 100 mL NaCMC 0,1% dan untuk dosis 120 mg/kg BB dibuat dengan mensuspensikan ALA sejumlah 1,2 g ke dalam 100 mL NaCMC 0,1%.

Pemberiaan sediaan uji dilakukan secara p.o dengan menggunakan sonde, pemberian disesuaikan dengan berat badan masing-masing tikus. Sediaan uji diberikan 1 jam sebelum induksi LPS dan selanjutnya diberikan setiap hari selama 14 hari. Untuk kontrol negatif, diberikan NaCMC 0,1% sebanyak 2 mL/tikus setiap hari.

Pembuatan Preparat Slide

Cara pembuatan preparat jaringan aorta

- Jaringan Aorta diambil, kemudian difiksasi dalam *neutral buffered* formalin 10%. Formalin diserap cukup baik oleh jaringan dalam waktu relatif lama yaitu 1-4 jam.
- Setelah itu jaringan dicuci dengan xylene, direndam dalam parafin dan dipotong.
- Jaringan aorta tikus yang telah diberi parafin dipotong dengan mikrotome setebal 3-5 μm dan diletakan pada objek glass.
- Selanjutnya aorta tikus dilakukan pewarnaan dengan menggunakan pewarna jaringan Hematoksin-Eosin

Analisis Data

Data Berat badan di analisis dengan menggunakan *Indendepent T test* dan *Anova Two Way*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

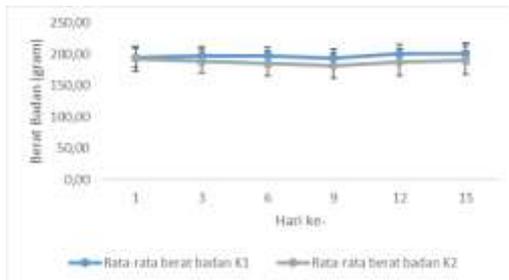
Dalam Penelitian ini digunakan 30 ekor tikus jantan strain wistar berumur 2-3 bulan dan dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus. Empat (4) kelompok tikus terdiri dari tiga kelompok perlakuan yaitu tikus yang diinduksi dengan LPS 0,5 mg/kg BB dan diterapi dengan *Alpha lipoic acid* dengan 3 dosis yang berbeda yaitu (30 mg/kg BB, 60 mg/kg BB, 120 mg/kg BB), sedangkan satu kelompok lainnya merupakan kelompok kontrol yang diinjeksi dengan NaCl 0,9% dan selanjutnya diberi larutan Propilenglikol.

Setiap kelompok menerima perlakuan selama 14 hari, Hewan diinduksi dengan LPS pada hari ke-1, hari ke-3, hari ke-7 dan pada hari ke 15 hewan di korbakan dan dilakukan pengambilan jaringan aorta. Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah berat badan tikus, Histologi jaringan aorta.

- Berat Badan Tikus

Pemberian LPS 0,5 mg/kg BB pada tikus bertujuan untuk menyebabkan keadaan

disfungsi endotel. Selama 14 hari penelitian berat tikus coba selalu di pantau, perkembangan berat badan tikus dapat dilihat pada grafik perubahannya dapat dilihat pada Gambar 1



Gambar I. Grafik Perubahan BB tikus normal dan tikus terinduksi LPS

Berdasarkan uji statistik *independent t test* antara kelompok tikus sehat dan tikus disfungsi endotel secara statistik tidak ada perbedaan bermakna pada perkembangan berat badan tikus baik pada hari 1 sampai pada hari ke 15, dimana nilai $P = 0,310 \geq 0,05$. Hal ini menunjukkan pada pemberian LPS 0,5 mg/kg BB tidak menyebabkan perubahan pada berat badan tikus disfungsi endotel.

Pada kelompok perlakuan Berdasarkan uji statistik *Anova two way* antara kelompok tikus perlakuan I, perlakuan II dan perlakuan III secara statistik tidak ada perbedaan bermakna pada perkembangan berat badan tikus baik pada hari 1 sampai pada hari ke 15, dimana nilai $P \geq 0,05$. Hal ini menunjukkan pada pemberian LPS 0,5 mg/kg BB dan ALA dosis 30-120 mg/kg BB tidak menyebabkan perubahan pada berat badan tikus disfungsi endotel.

b. Histologi Jaringan aorta

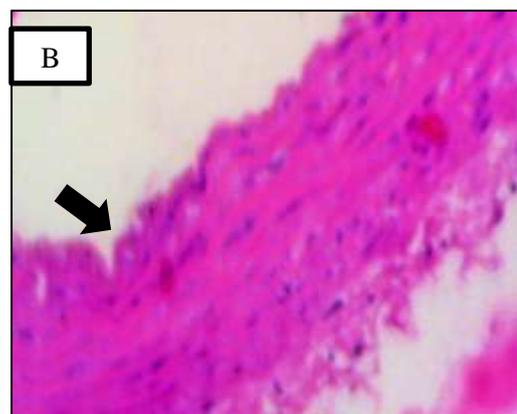
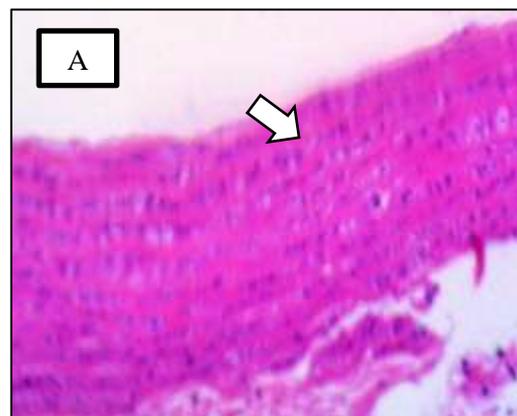
Endotel adalah selapis sel yang melapisi seluruh pembuluh darah. Sel endotel berperan penting dalam menjaga hemostasis, permeabilitas pembuluh darah dan respon pembuluh darah pada keadaan fisiologi dan patologis. Pemberian LPS pada tikus akan

mempengaruhi morfologi dari endotel.

Gambaran perubahan morfologi pada endotel setelah diinjeksi dengan LPS dipreparasi secara histokimia dengan pewarnaan hematoxylin-eosin (HE).

Pada Gambar 2 dapat diamati irisan melintang Aorta tikus sehat (Gambar A) terlihat sel-sel dengan bentuk memanjang, bentuk dan ukuran sel homogen, tunika intima dan tunika media tampak berbatasan dengan jelas dan rapat sehingga jaringan lebih terlihat dengan jelas (tanda \Rightarrow).

Sedangkan pada aorta tikus disfungsi endotel (gambar B) dapat diamati setelah diinduksi dengan LPS, sel endotel terlihat tidak beraturan, tidak homogen, terjadi peningkatan permeabilitas pada endotel dan susunan pada tunika intima dan media terlihat lebih longgar dan tidak beraturan (tanda \blackrightarrow).



Gambar 2. Irisan melintang jaringan Aorta tikus dengan pewarnaan HE. Aorta tikus sehat ditunjukkan oleh gambar A (perbesaran 400x) dan Aorta tikus disfungsi endotel ditunjukkan pada gambar B (perbesaran 400x).

Sedangkan pada kelompok Perlakuan I, II, dan III setelah pemberian ALA selama 14 hari menunjukkan sel-sel yang tampak homogen dan susunan pada tunika intima dan media terlihat lebih rapat dan beraturan.

Hal ini menunjukkan bahwa ALA yang bersifat antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif (Bourassa dan Tardif, 2006).

ALA memiliki kemampuan untuk menghambat kerusakan pada beberapa jaringan termasuk otak, retina dan ginjal. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa ALA memiliki efek perlindungan melawan iskemia/ reperfusi yang diinduksi stress oksidatif (Wang *et al.*, 2011). ALA digunakan secara luas sebagai obat untuk pencegahan berbagai penyakit kronis yang berhubungan dengan stres oksidatif dan pemberian setiap hari bertujuan sebagai antiaging, antidiabetes dan penyakit kardiovaskular (Kofuji *et al.*, 2008).

KESIMPULAN

Pemberian LPS dapat menimbulkan perubahan pada morfologi sel endotel dan Pemberian ALA dosis 30mg/Kg BB, 60mg/Kg BB dan 120mg/Kg BB dapat memberikan efek proteksif pada endotel.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek ALA pada disfungsi endotel dengan menggunakan parameter spesifik disfungsi endotel

DAFTAR PUSTAKA

- Bourassa, G., Tardif, C. 2006. *Antioxidants and Cardiovascular Disease Second Edition*. Springer. Amerika
- Caterina, R., Peter, L., Michael, G. 2007. *Endothelial Dysfunctions and Vascular Disease*. Blackwell Publishing, USA.
- Kofuji, K., Isobe, T., Yoshifumi, M. 2009. Controlled Release Of Alpha-Lipoic Acid Through Incorporation Into Natural Polysaccharide-Based Gel Beads. *Food Chemistry* **115**: 483–487.
- Lee, W., Ku, SK., Bae, JS. 2012. Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology* **50**: 3048–3055.
- Li, S., Yuanyuan, G., Ping, Z., Tingshu, Y. 2013. Role of Ox-LDL/LOX-1/NF- κ B signaling pathway in regulation of atherosclerotic plaque growth by testosterone in male rabbits. *Vascular Pharmacology* **59**: 131–137.
- Shay, P., Régis, M., Eric, S., Anthony, S., Tory M., Hagen. 2010. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta* **1790**: 1149–1160.
- Wang, X., Yu, Y., Ji, L., Liang, X., Zhang, T., Hai, C. 2011. Alpha-Lipoic Acid Protects Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury Via Multiple Target Effects. *Food and Chemical Toxicology*. **49**: 2750–2757.
- WHO. 2011. *Noncommunicable Diseases Country Profiles*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. ISBN 978 92 4 150228 3 © World Health Organization 2011.
- Xu, Y., Kong, X., Zhou, H., Zhang, X., Liu, J., Yana, J., Xie, H., Xie, Y. 2013.

oxLDL/ β 2GPI/anti- β 2GPI complex induced macrophage differentiation to foam cell involving TLR4/NF-kappa B signal transduction pathway. *Thrombosis Research* **134**: 384-392

Zhao, W., Ma, G., Chen, X. 2014. Lipopolysaccharide Induced LOX-1 Expression via TLR4/MyD88/ROS Activated p38MAPK-NF- κ B Pathway. *Vascular Pharmacology*. **63**: 162-172