

Original Research Paper

GAMBARAN HISTOPATOLOGI HATI TIKUS MODEL OBESITAS PASCA PEMBERIAN METFORMIN

Rahna Nur Ramadhanti¹, David Pakaya²

¹Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako

²Departemen Histologi, Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako

Email Corresponding:

davidpakaya09@gmail.com

Page : 47-52

Kata Kunci :

obesitas, histopatologi, hati, metformin

Keywords:

obesity, histopathology, liver, metformin

Article History:

Received: 23-04-2024

Revised: 16-11-2024

Accepted: 20-11-2024

Published by:

Tadulako University,
Managed by Faculty of Medicine.
Email: tadulakomedika@gmail.com
Address:
Jalan Soekarno Hatta Km. 9. City of
Palu, Central Sulawesi, Indonesia

ABSTRAK

Obesitas merupakan salah satu penyebab *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) yang ditandai dengan inflamasi dan kerusakan hepatosit yang dapat berkembang menjadi fibrosis hati. Metformin sebagai antidiabetes memiliki efek antiinflamasi sehingga dapat mengurangi steatosis hati dan juga NAFLD. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek metformin terhadap gambaran histopatologi hati tikus model obesitas. Penelitian ini merupakan studi eksperimental dengan rancangan *posttest only controlled group design* dengan pendekatan kualitatif dan kuantitatif. Penelitian ini menggunakan tikus putih galur Wistar jantan, berusia 10-12 minggu, berat badan (BB) 200-250 gram, berjumlah 15 ekor. Tikus dibagi dalam 3 kelompok perlakuan; K1: kontrol normal; K2: kontrol negatif (model obesitas); K3: model obesitas + terapi metformin 250 mg/kgBB. Tikus dimodifikasi menjadi model obesitas dengan pemberian *high fat diet* (HFD). Dilakukan pengukuran BB secara berkala. Gambaran histopatologi didapatkan dari pewarnaan *Hematoksin eosin* (HE). Data yang diperoleh dari pengamatan preparat histopatologi hati tikus Wistar dianalisis secara deskriptif kualitatif dengan menilai tingkat kerusakan hepatosit dan analisis kuantitatif dengan menilai tingkat fibrosis. Ditemukan bahwa terapi metformin menunjukkan tingkat kerusakan hepatosit lebih sedikit atau tingkat sedang dan pembentukan fibrosis hati pada tikus model obesitas menunjukkan perbedaan bermakna ($p=0,0002$). Kesimpulan penelitian ini metformin dapat menunjukkan kerusakan hepatosit dan terbentuknya fibrosis hati lebih sedikit pada tikus model obesitas.

ABSTRACT

Obesity is one of the causes of *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) which is characterized by inflammation and damage to hepatocytes that can progress to liver fibrosis. Metformin is an antidiabetic is reported to have an anti-inflammatory effect so that it can reduce hepatic steatosis and also NAFLD. The aim of this study is to determine the effect of metformin on the liver histopathology of obese rat models. This is an experimental research with *posttest only control group design* with qualitative and quantitative approaches. This study used white male Wistar rats, aged 10-12 weeks, body weight (BB) 200-250 grams, totaling 15 rats. Rats were divided into 3 treatment groups; K1: normal control; K2: negative control (obesity model); K3: obesity model + 250 mg/kgBB metformin therapy. The rats were modified into obesity models by administering a high fat diet (HFD). BB measurements are carried out periodically. The histopathological appearance was obtained from Hematoxylin-eosin (HE) staining. Data obtained from observations of histopathological preparations of the liver of Wistar rats were analyzed descriptively qualitatively by assessing the level of hepatocyte damage and quantitative analysis by assessing the level of fibrosis. Metformin therapy showed a less or moderate level of hepatocyte damage and the formation of liver fibrosis in obese rat models showed a significant difference ($p=0.0002$). In conclusion metformin can show less hepatocyte damage and liver fibrosis formation in obese rats.

PENDAHULUAN

Obesitas merupakan kondisi penimbunan lemak yang berlebihan.¹ Kondisi ini berdampak negatif bagi kesehatan dengan meningkatkan risiko beberapa penyakit termasuk penyakit hati kronis. Obesitas dapat menyebabkan inflamasi dan kerusakan sel-sel hati/hepatosit yang pada akhirnya dapat terbentuk fibrosis, sirosis bahkan karsinoma hepatoseluler, hal ini disebut sebagai *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD).^{2,3,4}

Obesitas menyebabkan terjadinya perluasan (hipertrofi) jaringan adiposa. Gangguan fungsi pada jaringan adiposa ini menyebabkan terjadinya lipolisis. Lipolisis akan meningkatkan *free fatty acid* (FFA) dan leptin dalam sirkulasi sedangkan adiponektin menurun. Keadaan ini menghasilkan akumulasi lemak intrahepatik (*simple steatosis* (SS)). Sel-sel imun kemudian akan memproduksi sitokin dan interleukin yang kemudian memicu proses inflamasi. Dalam keadaan kronis, sel-sel selula hati akan memulai fibrogenesis yang kemudian menyebabkan regenerasi jaringan hati akan terganggu. Hepatosit yang sudah mati tidak mengalami pergantian, sehingga menyebabkan fibrosis bahkan sirosis hati.^{5,6,7}

Metformin merupakan obat antidiabetes yang banyak digunakan dan memiliki efek anti peradangan. Metformin terbukti meningkatkan sensitifitas insulin dan dapat mengurangi steatosis hati, *non alcoholic stetohepatitis* (NASH), dan juga NAFLD. Berkurangnya kandungan lemak hati setelah pengobatan metformin dikaitkan dengan peningkatan oksidasi asam lemak dan penghambatan lipogenesis, yang dimediasi oleh aktivasi *adenosine monophosphate* (AMP)-*activated protein kinase* (AMPK).^{7,8,9,10} Tujuan penelitian ini untuk menilai gambaran

histopatologi hati tikus pada kondisi obesitas melalui pemberian *high fat diet* (HFD) pasca pemberian metformin.

BAHAN DAN CARA

Sampel Hewan Coba

Dalam penelitian ini digunakan 15 ekor tikus putih jantan galur Wistar, berusia 3 bulan dengan berat badan (BB) berkisar 200-250 gram. Hewan coba dikelompokkan sebagai berikut: K1: kelompok kontrol normal; K2: kontrol negatif (tikus model obesitas); K3: tikus model obesitas dengan terapi metformin 250 mg/kgBB. Tikus obesitas dibuat dengan pemberian *high fat diet* (HFD) dengan jumlah 20 gram perhari selama 63 hari. Metformin diberikan setelah 35 hari perlakuan pemberian HFD dan selama 28 hari. Dalam perawatan, hewan coba diukur BB setiap minggu sampai akhir penelitian. Penggunaan hewan dan secara keseluruhan penelitian ini telah mendapat persetujuan etik dari komisi etik penelitian FK Universitas Tadulako dengan nomor: 4083/UN 28.1.30/KL/2021.

Pewarnaan Histologi

Tikus korban dan dilakukan pengambilan jaringan hati (nekropsis) pada hari terakhir perawatan. Hasil nekropsis dibuat sediaan histologis dengan ketebalan 4 µm yang diwarnai menggunakan hematoxilin eosin. Analisis sediaan histologis menggunakan mikroskop cahaya Olympus CX23 dengan perbesaran 40x10 dan *numerical aperture* (NA):1,25 menggunakan perangkat lunak *optilab*. Pengamatan menggunakan 5 lapangan pandang yang tidak tumpang tindih dan dipilih secara acak. Hasil gambar akan dianalisis secara kualitatif deskriptif dan kuantitatif dengan metode Mitchel dan kuantitatif dengan menggunakan skor Metavir.

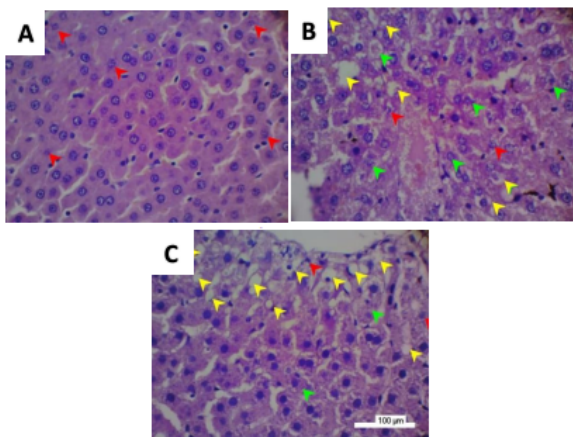
Analisis Statistik

Analisis statistik menggunakan uji nonparametrik Kruskal Wallis dengan menggunakan *Graphad Prsima 8.0.0*.

HASIL

Gambaran Histopatologi Hati

Struktur histopatologi hati dapat ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Gambaran struktur histopatologi hati. (A). Kelompok K1; (B). Kelompok K2; (C). Kelompok K3. Keterangan: Panah Merah: nekrosis; Panah Kuning: Degenerasi Lemak; Panah Hijau: Degenerasi hidrofilik. (Pewarnaan: HE, Perbesaran 400 kali, skala 100 µm).

Hasil tingkat kerusakan hepatosit dapat diamati pada tabel 1.

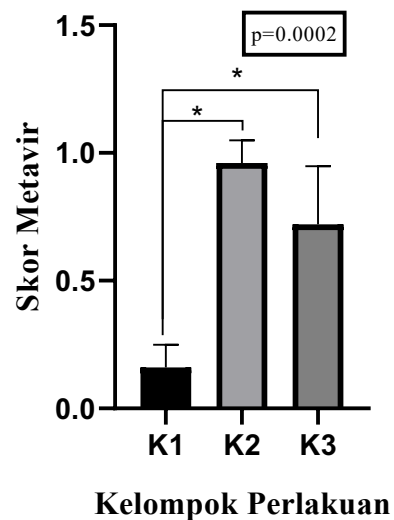
Tabel 1. Tingkat kerusakan hepatosit perkelompok perlakuan.

Kelompok perlakuan	Tingkat Kerusakan
K1	Ringan
K2	Berat
K3	Sedang

Gambar 2 memperlihatkan struktur histologis hati dari ketiga kelompok perlakuan. Kelompok K1 sebagai kontrol normal menunjukkan adanya sebagian hepatosit yang mengalami pembengkakan dan sedikit adanya degenerasi lemak sehingga diklasifikasi pada tingkat kerusakan ringan. Pada K2 sebagai kontrol positif, ditemukan degenerasi lemak

yang luas dan sel-sel yang mengalami degenerasi hidrofilik serta nekrosis yang cukup banyak. Hal tersebut menjadi dasar klasifikasi tingkat kerusakan berat. Pada K3 yang diterapi dengan metformin masih menunjukkan adanya degenerasi lemak, namun tidak seluas pada K2 dan adanya degenerasi hidrofilik serta nekrosis pada beberapa lapangan pandang, sehingga diklasifikasikan tingkat kerusakan sedang.

Analisis dilanjutkan secara kuantitatif melalui penghitungan skor Metavir, yang dilakukan untuk mengidentifikasi gambaran tingkat fibrosis pada hati. Evaluasi skor metavir dilakukan dengan cara:¹¹ 1). skor 0: Tidak ada fibrosis; 2). skor 1: fobrosis portal tanpa septa; 3). skor 2: fibrosis portal dengan beberapa septa; 4). skor 3 banyak septa tanpa fibrosis; 5). skor 4: sirosis. Hasil penghitungan dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Grafik gambaran tingkat fibrosis hati perkelompok perlakuan. Keterangan: K1: Kelompok kontrol tikus sehat; K2: Kelompok tikus model obesitas; K3: Kelompok tikus model obesitas dengan terapi metformin. Uji Kruskal Wallis $p=0,0002$. Uji post hoc Mann Whitney: K1 vs K2 ($p=0,0079$), K1 vs K3 ($p=0,0079$), K2 vs K3 ($p=0,1270$). $*=p<0,05$.

Pada uji normalitas *Shapiro Wilk* menunjukkan distribusi yang normal pada seluruh kelompok. Uji *Kruskal-Wallis*

menunjukkan adanya perbedaan area fibrosis yang bermakna ($p=0.0002$). Kelompok K1 dan K2 berbeda secara signifikan ($p=0,0079$) berdasarkan uji lanjut *post hoc Mann Whitney*.

PEMBAHASAN

Pengukuran BB berkala pada setiap minggu menunjukkan peningkatan BB tikus pada seluruh kelompok perlakuan. Peningkatan BB tampak konstan pada seluruh kelompok perlakuan mulai minggu pertama (H0) sampai H+63. Pakan HFD diberikan tikus kelompok K2 dan K3. Tikus kelompok K2 yang tidak diberikan terapi metformin terus mengalami peningkatan BB hingga H+63. Pemberian HFD dapat menyebabkan obesitas pada hewan coba dengan mengganggu metabolisme hewan coba tersebut. *High fat diet* dapat meningkatkan adipositas tubuh dan leptin, sehingga akumulasi lemak pada tubuh meningkat.¹² Pada tikus kelompok K3 yang juga diberikan HFD dengan metformin tampak adanya penurunan laju peningkatan BB mulai H+49 bila dibandingkan dengan K1 dan K2. Hal ini dikarenakan metformin dapat mempengaruhi penurunan berat badan.¹³ Metformin memiliki efek menurunkan berat badan dan berhubungan dengan regulasi makan berupa penekanan nafsu makan.^{13,14}

Hasil data kualitatif tingkat kerusakan hati tikus tiap kelompok yang diperoleh (gambar 2) menunjukkan tingkat kerusakan paling tinggi pada kelompok K2 yaitu kelompok tikus model obesitas (kontrol negatif) dengan tingkat kerusakan berat. Kelompok K2 mengalami degenerasi lemak, degenerasi hidrofilik dan nekrosis. Kapasitas jaringan adiposa untuk menyimpan kelebihan energi berkurang pada keadaan obesitas, sehingga hepatosit akan menyimpan kelebihan lemak dalam bentuk trigliserida. Penimbunan abnormal trigliserida dalam hepatosit ini akan menjadi degenerasi lemak.^{5,15} Selain degenerasi

lemak terdapat juga degenerasi hidrofilik dan nekrosis. Adanya bahan-bahan toksik yang ditemukan di dalam hepatosit, menjadi sinyal untuk sel tersebut mengalami degenerasi hidrofilik. Salah satunya adalah asam lemak bebas jenuh yang meningkat pada keadaan obesitas.^{15,16} Degenerasi yang terjadi secara terus menerus akan menyebabkan nekrosis pada hepatosit.¹⁵ Pada kelompok K3 dengan terapi metformin menunjukkan kerusakan sedang. Hal ini menunjukkan terdapat kondisi hepatosit yang lebih baik dibandingkan kelompok K2 pasca pemberian metformin.

Analisis statistik *Kruskal Wallis* untuk menilai rerata skor Metavir tingkat fibrosis hati masing-masing kelompok menunjukkan perbedaan signifikan ($p=0,0002$). Pada kelompok K2 tingkat fibrosis paling berat (rerata $0,96 \pm 0,08$). Pada kondisi obesitas, kelebihan trigliserida dalam hepatosit dapat menyebabkan peningkatan stres oksidatif, defek mitokondria dan stres retikulum endoplasma. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya inflamasi. Inflamasi ini yang berlanjut akan mengaktifasi sel stelata hati sehingga menyebabkan peningkatan produksi kolagen yang kemudian merangsang terbentuknya fibrosis hati.⁵

Uji *Mann Whitney* antara K2 dan K3 menunjukkan hasil tidak berbeda signifikan ($p=0,1270$). Walaupun didapatkan K3 memiliki tingkat fibrosis yang lebih ringan ($0,72 \pm 0,20$) dibandingkan kelompok K2. Metformin diketahui menghambat aktivitas sel stelata hepatic dengan mengaktifkan AMPK.¹⁷ Hal ini mengindikasikan metformin dapat meringankan perkembangan fibrosis hati. Hasil uji yang tidak signifikan ini dapat dikarenakan metformin memiliki waktu paruh yang rendah dan sekresi yang cepat dari darah sehingga efeknya akan melemah.¹⁸

KESIMPULAN DAN SARAN

Pemberian metformin mampu mengurangi kerusakan hepatosit dan mencegah pembentukan fibrosis pada tikus model obesitas secara signifikan ($p=0,0002$).

DAFTAR PUSTAKA

1. Sudargo T, Freitag LM, H, Rosiyani F, Kusmayanti NA. Pola Makan dan Obesitas. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press; 2014.
2. Christianto DA, Br Barus AM, Ramadhanti AND, Puspitasari AR, Pramudito PA, Fenty F. Hubungan Aktivitas Fisik Terhadap Kejadian Obesitas Berdasarkan Indeks Massa Tubuh Di Desa Banjaroyo. *Berkala Ilmiah Kedokteran Duta Wacana*. 2018;3(2):78-88.
3. Engin A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Bio*. 2017;960:1-17.
4. Newsome P, Francque S, Harrison S, Ratziu V, Van Gaal L, Calanna S, *et al*. Effect of Semaglutide on Liver Enzymes and Markers of Inflammation in Subjects with Type 2 Diabetes and/or Obesity. *Aliment Pharmacol Ther*. 2019;50(2):193-203.
5. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: from Pathophysiology to Therapeutics. *Metabolism*. 2019;92:82-97.
6. Lefere S, Tecke F. Macrophages in Obesity and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Crosstalk with Metabolism. *JHEP Rep*. 2019; 1(1):30-43.
7. Shaunak M, Byrne CD, Davis N, Afolabi P, Faust SN, Davies JH. Non-alcoholic Liver Disease and Childhood Obesity. *Arch Dis Child*. 2020;106(1):3-48.
8. Jing Y, Wu F, Li D, Yang L, Li Q, Li R. Metformin Improves Obesity-Associated Inflammation by Altering Macrophages Polarization. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;5(461):256-64.
9. Leoni S, Tovoli F, Napoli L, Serio I, Ferri S, Bolondi, L. Current Guidelines for the Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review with Comparative Analysis. *World J Gastroenterol*. 2018;24(30):3361-73.
10. Markowicz-Piasecka M, Huttunen KM, Mateusiak L, Mikiciuk-Olasik E, Sikora J. Is Metformin a Perfect Drug? Updates in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Curr Pharm Des*. 2017;23(17):2532-50.
11. Li C., Li R., Zhang W. Progress in non-invasive detection of liver fibrosis. *Cancer Biol Med*. 2018;15(2):124-136.
12. Dias MM, Dos Reis SA, Da Conceição LL, Sediya CMN De O, Pereira SS, De Oliveira LL, *et al*. Diet-Induced Obesity In Animal Models: Points To Consider And Influence On Metabolic Markers. *Diabetol Metab Syndr*. 2021;13(1).
13. Abrori C, Tiya L, Rosalina D. Efek Metformin Lepas Lambat dalam Penurunan Berat Badan dan Jumlah Asupan Kalori pada Sukarelawan Obesitas. *Journal of AMS*. 2017;3(1):50-5.
14. Yerevanian A, Soukas AA. Metformin: Mechanisms in Human Obesity and Weight Loss. *Curr Obes Rep*. 2019;8(2):156-64.
15. Sijid SA, Muthiadin C, Zulkarnain, Hidayat AS, Amelia RR. Pengaruh Pemberian Tuak terhadap Gambaran Histopatologi Hati Mencit (*Mus musculus*) ICR Jantan. *Jurnal Pendidikan Matematika dan IPA*. 2020;11(2):193-205.
16. Farrell GC, Haczeyni F, Chitturi S. Pathogenesis of NASH: How Metabolic Complications of Overnutrition Favour Lipotoxicity and Pro-Inflammatory Fatty Liver Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1061:19-44.
17. Li Z, Ding Q, Ling LP, Wu Y, Meng DX, Li X, *et al*. Metformin attenuates motility, contraction, and fibrogenic response of hepatic stellate cells in vivo and in vitro by activating AMP-activated protein kinase. *WJG*. 2017;24(7): 819-32.
18. Derkach K, Zakharova I, Zorina I, Bakhtyukov A, Romanova I, Bayunova L, *et al*. The Evidence of Metabolic-Improving Effect of Metformin in Ay/a

Mice with Genetically-Induced Melanocortin Obesity and the Contribution of Hypothalamic Mechanisms to this Effect. *PLoS One*. 2019;14(3):e0213779.