

ARTIKEL PENELITIAN

Pengaruh Fraksi Air Buah Lemon terhadap Gambaran Morfologi Jaringan Hati Mencit Tua yang Diberi Pakan Tinggi Lemak**Nur Azmiati Mundiri,¹ Meta Maulida,³ Maya Tejasari,²
Annisa Rahmah Furqaani,² R.A Retno Ekowati²**¹Program Studi Pendidikan Dokter, Universitas Islam Bandung²Bagian Biologi Medik dan Histologi, Universitas Islam Bandung³Bagian Patologi Anatomi, Universitas Islam Bandung**Abstrak**

Dislipidemia merupakan salah satu faktor risiko dari *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD). NAFLD mempunyai karakteristik steatosis hepatik, *hepatocyte ballooning*, inflamasi lobular, dan fibrosis. Kandungan flavonoid pada *Citrus limon* dipercaya dapat mencegah steatosis hepatik. Tujuan penelitian ini mengetahui pengaruh fraksi air buah lemon terhadap gambaran morfologi jaringan hati mencit tua yang diberi pakan tinggi lemak. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan subjek penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) jantan galur DDY tua yang dibagi menjadi empat kelompok secara acak, terdiri atas kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan dengan konsentrasi fraksi air buah lemon 20,6; 41,2; 82,4 mg/20 gram BB mencit. Data jumlah hepatosit dengan droplet lemak dan *hepatocyte ballooning* dianalisis menggunakan uji ANOVA dan Uji Kruskal Willis. Terdapat perbedaan jumlah hepatosit dengan droplet lemak ($p=0,063$) dan hepatosit yang mengalami pembengkakan ($p=0,109$) antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Simpulan penelitian ini adalah fraksi air buah lemon dapat mencegah *hepatocyte ballooning* dan pembentukan droplet lemak pada hepatosit mencit tua yang diberikan pakan tinggi lemak.

Kata kunci: Citrus limon, hepatocyte ballooning, non alcoholic fatty liver disease, steatosis hepatik

Protective Effect of Water Fraction of Lemon on High-Fat Diet-Induced Liver Injury in Old Mice**Abstract**

Dyslipidemia is one of the risk factors of non alcoholic fatty liver disease (NAFLD). NAFLD is characterized by hepatic steatosis, hepatocyte ballooning, lobular inflammation, and fibrosis. Flavonoid in Citrus limon is believed to prevent hepatic steatosis. The aim of this study is to know the protective effect of lemon's water fraction on high-fat diet-induced liver injury in old mice. This was an experimental study with old male mice (*Mus musculus*) DDY strain divided into four groups randomly, consisting of control group and three groups given with water fraction of lemon at concentration 20.6; 41.2; 82.4 mg/20 gram mice body weight. Total count of hepatocytes with fat droplets and hepatocytes ballooning were analyzed using ANOVA and Kruskal Willis tests. There are differences in the amount of hepatocytes with fat droplets ($p=0.063$) and hepatocytes ballooning ($p=0.109$) between the control group and the treatment group. The conclusion of this study is lemon's water fraction can prevent the formation of hepatocyte ballooning and fat droplet in old mice's hepatocyte fed by high-fat diet.

Key words: Citrus limon, hepatic steatosis, hepatocyte ballooning, non alcoholic fatty liver disease

Pendahuluan

Dislipidemia adalah merupakan kondisi medis berupa peningkatan lipid termasuk kolesterol, trigliserida, LDL, dan penurunan HDL di dalam darah.¹ Salah satu penyebab dislipidemia adalah konsumsi makanan tinggi lemak sebagai faktor eksogen dan usia sebagai faktor endogen.^{2,3} Dislipidemia merupakan salah satu faktor risiko *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) yang merupakan penyebab paling sering penyakit hati kronik.⁴

Non alcoholic fatty liver disease atau NAFLD adalah sekelompok kondisi ditemukannya steatosis hepatic pada individu yang tidak mengonsumsi alkohol atau mengonsumsi alkohol dalam jumlah sedikit (kurang dari 20 g etanol/minggu). Penyakit ini berkaitan erat dengan obesitas dan komponen lain dari sindrom metabolik seperti dislipidemia, hiperinsulinemia, dan resistensi insulin.⁴ NAFLD secara utama menyerang usia 50 tahun dan lansia dengan prevalensi yang terus meningkat seiring dengan usia yang bertambah karena terdapat perubahan fungsi dan anatomi hati.⁵

Peningkatan asam lemak bebas dan trigliserida di liver serta gangguan pada beta-oksidasi asam lemak di dalam sel hepatosit dapat menyebabkan akumulasi trigliserida di dalam sel hepatosit. Hati dengan lemak berlebih akan lebih rentan terhadap banyak stresor seperti ROS, adipokin, dan sitokin dibanding dengan hati yang normal. Kapasitas regenerasi sel hati yang berlemak pun akan terganggu.⁶

Lemon atau *Citrus limon* merupakan salah satu bahan tanaman yang dapat digunakan sebagai obat herbal. Lemon itu mengandung banyak komponen kimia natural termasuk senyawa *phenolic* (terutama flavonoid), kandungan flavonoid tersebut termasuk naringenin, hesperidin, nobiletin, dan juga tangeretin. Kandungan flavonoid pada *Citrus* sp. dapat mencegah steatosis hepatic, dislipidemia, dan meningkatkan sensitivitas insulin secara primer melalui inhibisi sintesis asam lemak hepatic dan juga meningkatkan oksidasi asam lemak.⁷

Pada penelitian yang dilakukan oleh Trovato dkk.⁸ di Italia pemberian jus lemon (*Citrus limon*) dapat menurunkan kadar kolesterol sebanyak 50%, kadar LDL 56%, dan kadar trigliserida sebanyak 43% pada tikus yang diberikan pakan tinggi lemak selama 30 hari. Penelitian yang dilakukan di Cina, ditemukan bahwa pemberian naringin yang merupakan flavonoid dapat menurunkan steatosis hepatic yang diinduksi oleh diet tinggi lemak pada tikus, serta dapat menurunkan pengeluaran TNF dan mencegah kerusakan sel hati.⁹

Penelitian ini bertujuan meneliti pengaruh fraksi air buah lemon terhadap morfologi jaringan sel hati mencit tua diberi pakan tinggi lemak terkait dengan penyakit hati yang disebabkan oleh dislipidemia, salah satunya adalah *non alcoholic fatty liver disease*.

Metode

Penelitian ini adalah eksperimental laboratorik dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Variabel bebas merupakan fraksi air buah lemon yang dibuat di Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran, variabel terikat adalah jumlah hepatosit dengan droplet lemak

dan jumlah hepatosit yang mengalami pembengkakan. Bahan penelitian yang digunakan adalah buah lemon lokal (*Citrus limon*), pakan standar (CP 551), dan pakan tinggi lemak yang merupakan pakan standar dicampurkan dengan telur bebek dan lemak sapi cair.

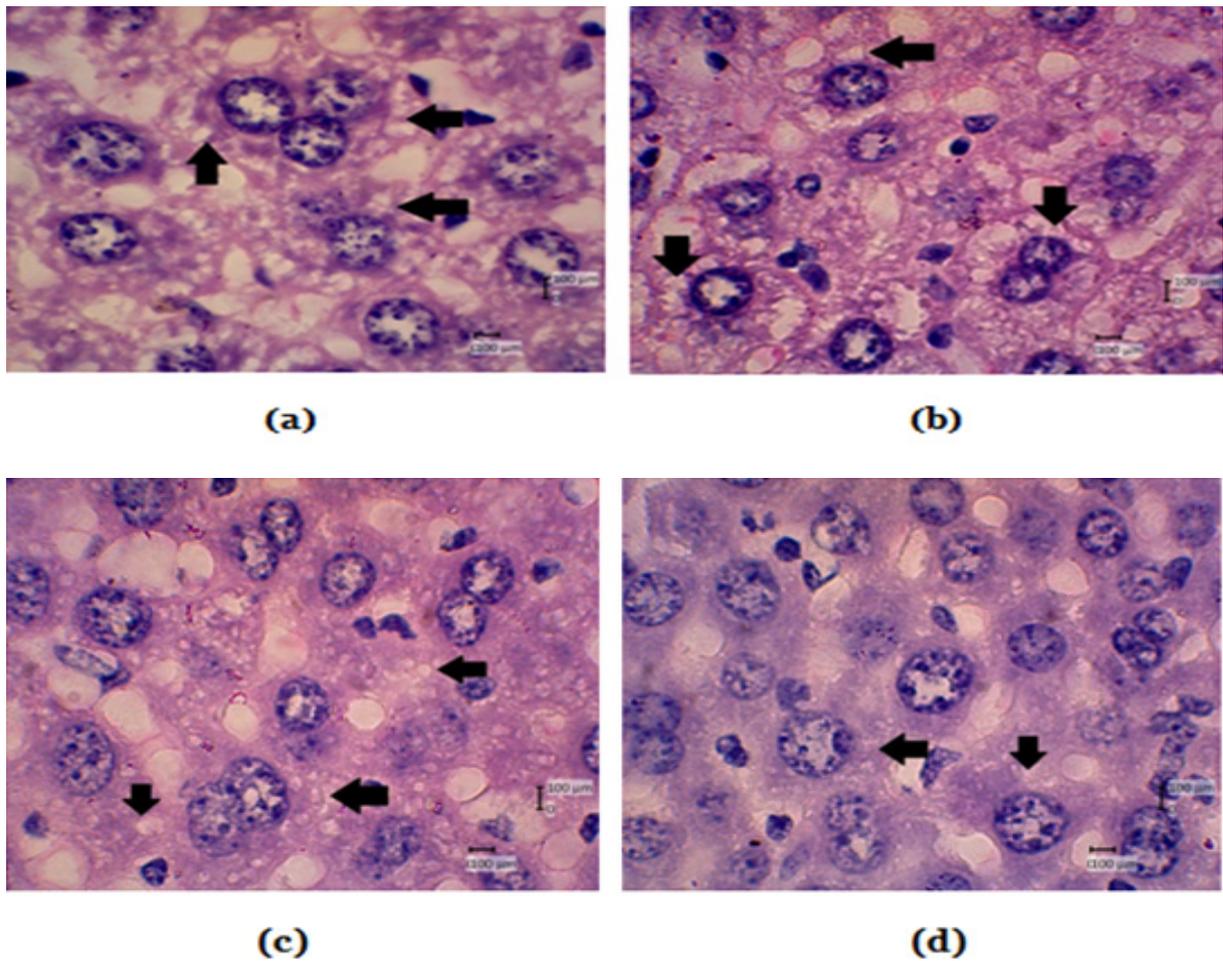
Subjek penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) jantan galur DDY yang didapatkan dari Biofarma, berusia 45–49 minggu dengan bobot 40–60 gram, sehat dengan ciri-ciri awas, lincah, mata terbuka dan jernih, telinga berdiri tegak, bulu tebal dan bersih serta tidak ada luka. Hewan uji diadaptasi terlebih dahulu selama 30 hari. Mencit yang telah melewati masa adaptasi, namun mengalami penurunan bobot minimal 10% atau sakit dieksklusi dari penelitian. Setelah masa adaptasi, hewan uji dibagi menjadi empat kelompok secara acak yang terdiri atas kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. Kelompok I (kontrol) diberikan pakan tinggi lemak dan akuades; kelompok II (perlakuan I) diberikan pakan tinggi lemak dan fraksi air buah lemon dengan konsentrasi 20,6 mg/20 g bobot mencit/hari; kelompok III (perlakuan II) diberikan pakan tinggi lemak dan fraksi air buah lemon dengan konsentrasi 41,2 mg/20 g bobot mencit/hari; kelompok IV (perlakuan III) diberikan pakan tinggi lemak dan fraksi air buah lemon dengan konsentrasi 82,4 mg/20 g bobot mencit/hari. Konsentrasi fraksi air buah lemon yang diberikan merupakan hasil penghitungan konversi konsentrasi manusia ke mencit dengan dikalikan 0,026. Pemberian sediaan fraksi air buah lemon diberikan melalui oral, konsentrasi yang akan diberikan disesuaikan terlebih dahulu dengan bobot mencit pada saat akan diberikan sediaan fraksi air buah lemon.

Semua hewan uji diberi perlakuan sesuai dengan kelompoknya selama 26 hari, pada hari ke-27 hewan uji dikorbankan untuk diambil organ hatinya dan dibuat preparat histologi dengan pewarnaan *hematoxylin & eosin* (H&E). Preparat kemudian dibagi area menjadi 12 kotak, pengamatan hanya dilakukan pada kotak genap (ke-2, 4, 6, 8, 10, dan 12), satu lapang pandang diambil dari setiap kotak serta diamati di bawah mikroskop cahaya. Pada pembesaran 400x melihat *hepatocyte ballooning* dan pada pembesaran 1.000x untuk melihat sel hepatosit dengan droplet lemak.¹⁰ Penghitungan sel-sel dilakukan menggunakan *image raster*.

Data yang diperoleh merupakan jumlah hepatosit dengan droplet lemak dan juga jumlah *hepatocyte ballooning*. Uji normalitas data itu mempergunakan Uji Shapiro Wilk. Uji beda menggunakan uji ANOVA pada data yang berdistribusi normal dan dengan Uji Kruskal Wallis pada data tidak berdistribusi normal dengan derajat kepercayaan 95%. Penelitian ini telah memperoleh persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan (*ethical approval*) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung pada tanggal 19 Maret 2018 dengan No: 227/Komite Etik.FK/III/2018.

Hasil

Hasil menunjukkan hepatosit dengan droplet lemak dan *hepatocyte ballooning* pada tiap-tiap kelompok. Gambaran hepatosit dengan droplet lemak ditunjukkan pada Gambar 1 dan gambaran *hepatocyte ballooning*



Gambar 1 Gambaran Hepatosit dengan Droplet Lemak pada Tiap-tiap Kelompok dengan Pembesaran 1.000x

Keterangan: (a) kelompok I ditemukan cukup banyak hepatosit dengan droplet lemak, (b) kelompok II ditemukan hepatosit dengan droplet lemak memenuhi lapang pandang, (c) kelompok III ditemukan cukup banyak hepatosit dengan droplet lemak, (d) kelompok V hanya ada sedikit hepatosit dengan droplet lemak. Droplet lemak pada hepatosit (panah hitam).

ditunjukkan pada Gambar 2.

Hasil pembacaan preparat pada seluruh kelompok terlihat gambaran jaringan hati dengan arsitektur lobulus hati yang terdiri atas lempengan hepatosit yang masih tersusun secara radier mengelilingi *central vein*, tanpa terdapat area nekrosis. Pada seluruh kelompok ditemukan hepatosit dengan droplet lemak dengan karakteristik ditemukan area pucat berbatas tidak tegas dalam sitoplasma.

Sebelum analisis statistik, dilakukan uji normalitas menggunakan Shapiro Wilk disebabkan oleh jumlah sampel <50. Berdasar atas uji normalitas didapatkan bahwa data semua kelompok uji berdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$. Selanjutnya, dilakukan uji beda mempergunakan uji ANOVA untuk melihat apakah terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Hasil uji tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

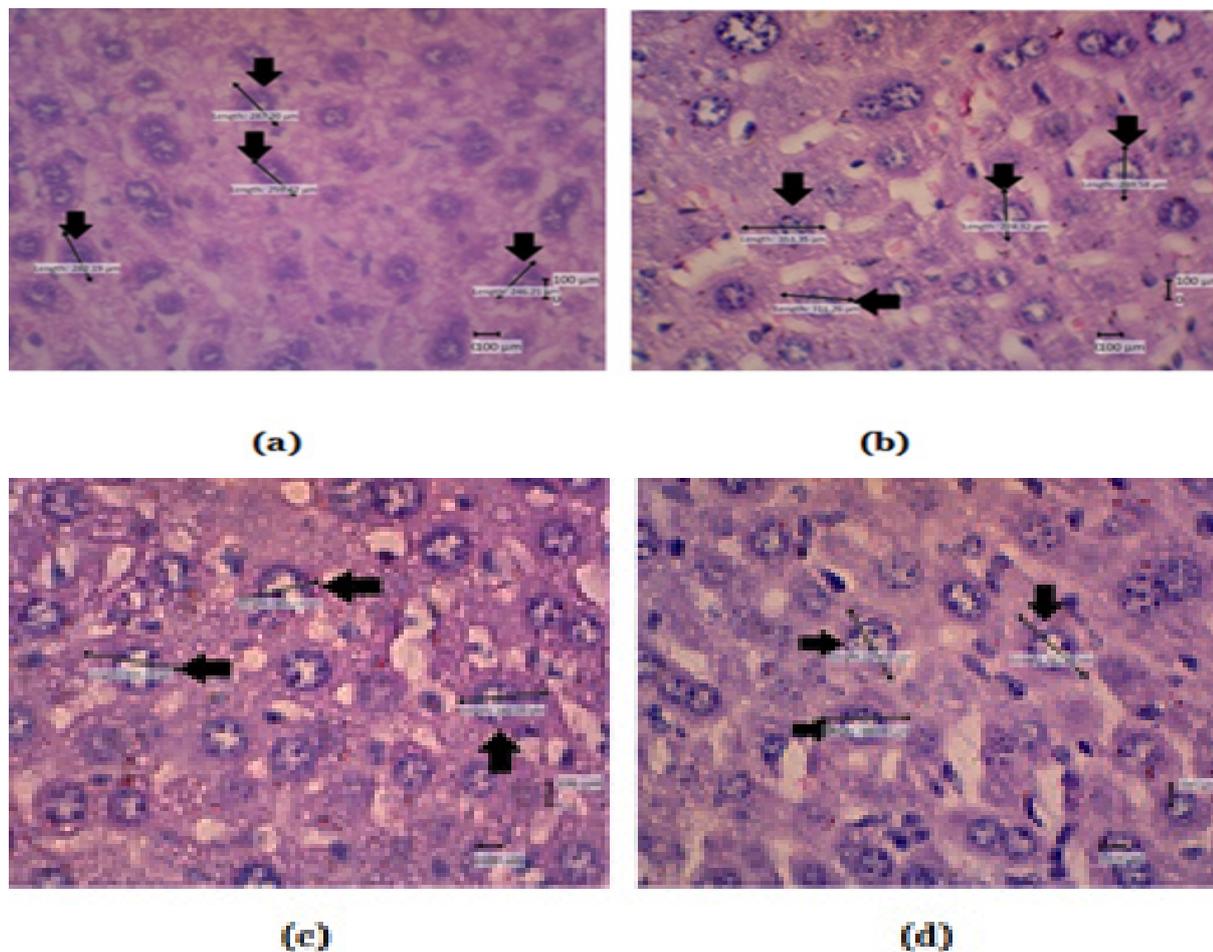
Berdasar atas uji ANOVA itu terdapat perbedaan,

namun tidak bermakna secara statistik antara jumlah hepatosit dan droplet lemak antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ($p > 0,063$).

Tabel 1 Rerata dan Hasil Uji ANOVA Jumlah Hepatosit dengan Droplet Lemak

Kelompok	Jumlah Hepatosit dengan Droplet Lemak	Nilai p
	Mean (SD)	
I (kontrol)	29,80 (2,49)	0,063
II (perlakuan I)	32,60 (12,48)	
III (perlakuan II)	29,00 (6,48)	
IV (perlakuan III)	17,50 (5,45)	

Hasil pembacaan preparat pada seluruh kelompok



Gambar 2 Gambaran Hepatosit yang Mengalami Pembengkakan pada Tiap-tiap Kelompok dengan Pembesaran 400x

Keterangan: (a) kelompok I ditemukan *hepatocyte ballooning* memenuhi lapang pandang, (b) kelompok II ditemukan cukup banyak *hepatocyte ballooning*, (c) kelompok III ditemukan *hepatocyte ballooning* yang lebih sedikit dibanding dengan kelompok I dan II, (d) kelompok V hanya ada sedikit *hepatocyte ballooning*. *Hepatocyte ballooning* (panah hitam).

ditemukan *hepatocyte ballooning* dengan karakteristik diameter lebih besar dari 20–30 µm.

Uji normalitas pada jumlah *hepatocyte ballooning* didapatkan bahwa kelompok memiliki distribusi tidak normal dengan nilai $p < 0,05$ dan dilanjutkan dengan Uji Kruskal Wallis untuk menilai apakah terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Hasil uji tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Uji Kruskal Wallis menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna jumlah *hepatocyte ballooning* antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ($p > 0,109$).

Pembahasan

Pada penelitian ini didapat perbedaan jumlah hepatosit dengan droplet lemak antara kelompok kontrol dan kelompok IV (Perlakuan III; Tabel 1).

Tabel 2 Rerata dan Hasil Uji Kruskal Wallis *Hepatocyte Ballooning*

Kelompok	Jumlah <i>Hepatocyte Ballooning</i>	Nilai p
	Mean (SD)	
I (kontrol)	51,20 (14,81)	0,109
II (perlakuan I)	38,20 (8,41)	
III (perlakuan II)	37,00 (6,58)	
IV (perlakuan III)	32,75 (4,57)	

Perbedaan ini disebabkan oleh aktivitas kandungan flavonoid pada buah lemon yang berperan mencegah steatosis hepatic dengan mereduksi lipogenesis yang dimediasi oleh SREBP-1c dan meningkatkan oksidasi asam lemak.¹¹ Selain itu, flavonoid dapat meningkatkan

ekspresi PPAR γ di liver dan menurunkan ekspresi LXR, SREBP-1c, dan SREBP-1a.⁹ Namun, perbedaan jumlah hepatosit dengan droplet lemak kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan tidak bermakna secara statistik. Hal ini tidak sejalan dengan penelitian yang dilaksanakan di Cina bahwa pemberian suplementasi naringin 0,2 gram/kg yang merupakan flavonoid terbukti dapat mengurangi steatosis hepatic. Terdapat perbedaan pada periode perlakuan dan jumlah hewan coba, pada penelitian yang dilakukan di Cina periode perlakuan berlangsung selama 20 minggu terhadap 60 mencit yang diberikan pakan tinggi lemak.¹² Pada penelitian yang dilakukan oleh Assefa dkk.¹³ mengenai kandungan flavonoid yang berasal dari *Citrus* sp. pada tiga jenis fraksi dengan pelarut berbeda (etil asetat, metanol, dan heksan) didapatkan bahwa kandungan flavonoid dan *phenolic* tertinggi terdapat pada fraksi etil asetat.

Terdapat perbedaan jumlah *hepatocyte ballooning* antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kandungan flavonoid pada buah lemon dapat mencegah cedera sel hati yang diinduksi oleh lipopolisakarida. Selain itu, flavonoid menyupresi pengeluaran TNF dan juga menurunkan stres oksidatif yang diproduksi oleh *carbon tetrachloride* karena peroksidasi lipid.¹¹ Kandungan vitamin C pada buah lemon merupakan antioksidan yang mampu mencegah peroksidasi lipid serta degradasi protein yang dimediasi oleh ROS.¹¹ Namun, perbedaan jumlah *hepatocyte ballooning* antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan itu tidak bermakna secara statistik ($p > 0,05$). Hal ini tidak sejalan dengan penelitian oleh Bhavsar dkk.¹⁴ dari *L.M College* di India mengenai aktivitas hepatoprotektif *Citrus limon*, serta terdapat perbedaan pada pelarut yang dipergunakan. Pada penelitian Bhavsar dkk.¹⁴ perlakuan menggunakan ekstrak etanol *Citrus limon* dan terbukti mampu menurunkan kadar AST, ALT, dan juga ALP pada tikus yang diinduksi oleh *carbon tetrachloride*, serta mampu meningkatkan kadar enzim antioksidan *superoxide dismutase* (SOD) pada jaringan hati.

Simpulan

Pemberian fraksi air buah lemon mampu mencegah pembentukan hepatosit dengan droplet lemak dan *hepatocyte ballooning* pada mencit tua yang diberikan pakan tinggi lemak, namun perbedaan jumlah antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tidak berbeda.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kepada Pimpinan Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran, Laboratorium Hewan Farmasi Institut Teknologi Bandung, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung,

Daftar Pustaka

1. Karam I, Yang YJ LJ. Hyperlipidemia background and progress. *SM Atheroscler J*. 2017;1(1):1003.
2. Onwe PE, Folawiyi MA, Anyigor -Ogah CS, Umahi G, Okorochoa AE, Afoke AO. Hyperlipidemia: etiology and possible control. *IOSR J Dent Med Sci*. 2015;14(10):93-100.
3. Shanmugasundaram M, Rough SJ, Alpert JS. Dyslipidemia in the elderly: should it be treated? *Clin Cardiol*. 2010 Jan;33(1):4-9.
4. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Pathologic basis of disease*. Edisi ke-8. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.
5. Bertolotti M, Lonardo A, Mussi C, Baldelli E, Pellegrini E, Ballestri S, dkk. Nonalcoholic fatty liver disease and aging: epidemiology to management. *World J Gastroenterol*. 2014;20(39):14185-204.
6. Basaranoglu M, Ormeci N. Nonalcoholic fatty liver disease: diagnosis, pathogenesis, and management. *Turkish J Gastroenterol*. 2014;25(2):127-32.
7. Assini JM, Mulvihill EE, Huff MW. Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2013;24(1):34-40.
8. Trovato A, Monforte MT, Barbera R, Rossitto A, Galati EM, Forestieri AM. Effects of fruit juices of *Citrus sinensis* L. and *Citrus limon* L. on experimental hypercholesterolemia in the rat. *Phytomedicine [Internet]*. 1996 Jan;2(3):221-7. (diunduh 29 Desember 2017). Tersedia dari: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711396800468>.
9. Alam MA, Subhan N, Rahman MM, Uddin SJ, Reza HM, Sarker SD. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Adv Nutr An Int Rev J [Internet]*. 2014;5(4):404-17.
10. Syafitri M, Tejasari M, Tresnasari C. Perubahan morfologi jaringan hati tikus pada pemberian ekstrak daun sirsak jangka panjang. *Bandung Meeting on Global Medicine & Health (BaMGMH)*, 2017;1(1):120-4.
11. Zhou T, Zhang YJ, Xu DP, Wang F, Zhou Y, Zheng J, dkk. Protective effects of lemon juice on alcohol-induced liver injury in mice. *Biomed Res Int [Internet]*. 2017;2017:7463571. (diunduh 31 Desember 2017). Tersedia dari: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28567423>.
12. Pu P, Gao DM, Mohamed S, Chen J, Zhang J, Zhou XY, dkk. Naringin ameliorates metabolic syndrome by activating AMP-activated protein kinase in mice fed a high-fat diet. *Arch Biochem Biophys [Internet]*. 2012;518(1):61-70.
13. Assefa AD, Ko EY, Moon SH, Keum YS. Antioxidant and antiplatelet activities of flavonoid-rich fractions of three citrus fruits from Korea. *Biotech*. 2016;6(1):1-10.
14. Bhavsar SK, Joshi P, Shah MB, Santani DD. Investigation into hepatoprotective activity of *Citrus limon*. *Pharm Biol*. 2007;45(4):303-11.