

**PERBEDAAN PENGARUH METODE INDUKSI
ATEROSKLEROSIS TERHADAP GAMBARAN
HISTOPATOLOGI AORTA DAN KADAR
MALONDIALDEHYDE
(Studi Eksperimen pada Tikus Wistar)**



Tesis

**“Untuk memenuhi persyaratan mencapai
derajat sarjana S-2 dan memperoleh keahlian dalam bidang Ilmu
Biomedik”**

**QORRY AMANDA
22010118410021**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2022**

TESIS
Perbedaan Pengaruh Metode Induksi Aterosklerosis Terhadap Gambaran
Histopatologi Aorta Dan Kadar Malondialdehyde
(Studi Eksperimen pada Tikus Wistar)

diajukan oleh:

Qorry Amanda
22010118410021

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
Pada 3 Agustus 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima
Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II

dr. Bahrudin, Sp.JP, M.Si.Med., Ph.D, FIHA
NIP. 197603152006041001

Penguji Ketua

Dr. dr. Nyoman Suci Widyastiti, M.Kes., Sp.PK(K)
NIP. 197010231997022001

Penguji Anggota

Dr. dr. Yan Wisnu Prajoko, M.Kes, Sp.B(K)Onk
NIP. 1975012420080110066

dr. Nani Maharani, M.Si.Med, Ph.D
NIP. 198111122008122003

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Dr. dr. Yan Wisnu Prajoko, M.Kes, Sp.B(K)Onk
NIP. 1975012420080110066

PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan sebelumnya untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi atau lembaga pendidikan lainnya, serta tidak terdapat unsur-unsur yang tergolong plagiarisme sebagaimana yang dimaksud dalam Permendiknas No. 17 Tahun 2010. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum atau tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 3 Agustus 2022

Qorry Amanda
22010118410021

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Identitas

Nama : dr. Qorry Amanda
NIM : 22010118410021
Tempat/ Tanggal lahir : Surakarta, 21 Agustus 1991
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Perempuan
Status : Sudah Menikah
Alamat : Tlogomulyo Cluster No. 3 Pedurungan Semarang

Riwayat Pendidikan

1. SD Islam 01 Pekalongan : 1997-2003
2. SMP Islam Pekalongan : 2004-2006
3. SMA Negeri 01 Pekalongan : 2006-2009
4. S1-Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung : 2009-2013
5. Profesi Dokter Universitas Islam Sultan Agung : 2013-2015

KATA PENGANTAR

Dengan menyebut nama Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang. Segala puji bagi Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga Tesis yang berjudul “Perbedaan Pengaruh Metode Induksi Aterosklerosis Terhadap Gambaran Histopatologi Aorta Dan Kadar Malondialdehyde (Studi Eksperimen Pada Tikus Wistar)” ini dapat terselesaikan. Dalam penyusunan Tesis ini peneliti mendapat dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini peneliti mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr. Dwi Pudjonarko, M.Kes., Sp.S(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro
2. Dr. dr. Yan Wisnu Prajoko Sp.B(K).Onk, M.Kes selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
3. dr. Bahrudin, M.Si.Med., Ph.D, Sp.JP, FIHA selaku Pembimbing I yang berkontribusi sangat besar dalam membimbing, mengarahkan, dan memberikan masukan selama penulisan Tesis ini
4. Dr. dr. Nyoman Suci W., M.Kes, Sp.PK (K) selaku Pembimbing II yang juga turut berkontribusi dalam memotivasi, membimbing, memberi arahan dan masukan selama penulisan Tesis ini
5. Dr. dr. Yan Wisnu Prajoko, M.Kes, Sp.B (K) Onk.M.Kes selaku Penguji Ketua
6. dr. Nani Maharani, M.Si.Med, PhD selaku Penguji Anggota
7. Staf administrasi dan karyawan Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro yang selalu membantu dalam hal perizinan, persuratan dan lainnya
8. Kedua orang tua (Ibu Hadijah dan Bapak Su’udi Yasin), Suami (Dannu Purwanto), Anak (Hilya Fawzia), serta sahabat penulis (Kicky Eka Shelviani, Nadhira Anindita, Deby Aprilia, dan Yulia Ratna Sofa) yang telah memberikan fasilitas, motivasi, dukungan, doa, serta segenap bantuan lainnya selama masa pendidikan hingga dapat menyelesaikan tesis ini

9. Teman-teman Dosen Departemen Histologi, Biologi, serta Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UNISSULA yang telah banyak memberikan arahan dan masukan selama penyusunan tesis
10. Teman-teman mahasiswa Magister Ilmu Biomedik angkatan 2019 yang selalu memberikan dukungan dan motivasi belajar, serta pihak lainnya yang turut membantu dalam melaksanakan penelitian dan penulisan tesis yang tidak dapat disebutkan satu-persatu

Peneliti menyadari bahwa dalam penyusunan tesis masih jauh dari kata sempurna. Kritik dan saran dari berbagai pihak diharapkan dapat membantu perbaikan penelitian selanjutnya. Peneliti berharap hasil penelitian ini bermanfaat bagi semua pihak. Aamiin

Semarang, 29 Juli 2022

Qorry Amanda
22010118410021

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN	iii
DAFTAR RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH	xvii
ABSTRAK	1
ABSTRACT	2
BAB I PENDAHULUAN	3
1.1 Latar Belakang	3
1.2 Rumusan Masalah	10
1.3 Tujuan Penelitian	11
1.3.1 Tujuan Umum	11
1.3.2 Tujuan Khusus	11
1.4 Manfaat Penelitian	12
1.4.1 Manfaat untuk Pendidikan	12

1.4.2	Manfaat Untuk Penelitian	12
1.4.3	Manfaat Untuk Pelayanan Kesehatan	12
1.5	Orisinalitas Penelitian	13
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....		17
2.1	Aterosklerosis.....	17
2.1.1	Definisi Aterosklerosis.....	17
2.1.2	Faktor risiko Aterosklerosis	18
2.1.3	Tahapan Aterosklerosis.....	19
2.1.4	Patofisiologi Aterosklerosis	22
2.1.5	Diagnosis Aterosklerosis.....	27
2.2	Aterosklerosis pada Hewan.....	34
2.3	Hubungan Merokok terhadap Aterosklerosis.....	36
2.4	Hubungan diet tinggi lemak disertai Injeksi Adrenalin dengan Aterosklerosis.....	39
2.5	Hubungan MDA terhadap Aterosklerosis.....	43
2.6	Kerangka Teori.....	45
2.7	Kerangka Konsep.....	46
2.8	Hipotesis.....	46
2.8.1	Hipotesis Umum.....	46
2.8.2	Hipotesis Khusus.....	47

BAB III METODE PENELITIAN.....	48
3.1 Ruang Lingkup Penelitian.....	48
3.1.1 Lingkup Ilmu.....	48
3.1.2 Lingkup Tempat.....	48
3.1.3 Lingkup Waktu.....	48
3.2 Rancangan Penelitian.....	48
3.3 Populasi dan Sampel.....	49
3.3.1 Populasi.....	49
3.3.2 Sampel.....	49
3.4 Variabel Penelitian.....	50
3.4.1 Variabel Bebas.....	50
3.4.2 Variabel Tergantung.....	50
3.5 Definisi Operasional Variabel.....	51
3.6 Cara Pengumpulan Data.....	53
3.6.1 Bahan Penelitian.....	53
3.6.2 Alat Penelitian.....	53
3.6.3 Prosedur Perlakuan Sampel.....	54
3.6.4 Prosedur Pemeriksaan dan Pengukuran.....	56
3.7 Analisis Deskriptif.....	59
3.8 Analisis Statistika.....	59

3.9	Etika Penelitian	60
3.10	Alur Penelitian	61
BAB IV HASIL PENELITIAN		62
4.1	Karakteristik Subyek Penelitian.....	62
4.2	Gambaran Histopatologi Aorta	63
4.2.1	Rasio Ketebalan Tunika Intima dan Tunika Media	63
4.2.2	Jumlah Sel Busa Tunika Intima	72
4.3	Kadar Malondialdehyde (MDA).....	77
4.3.1	Kadar Malondialdehyde (MDA) Setelah 7 Hari Perlakuan pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Adrenalin-HFD-Rokok	78
4.3.2	Kadar Malondialdehyde (MDA) Setelah Setelah 7, 14, 21, dan 28 Hari Perlakuan pada Subkelompok Adrenalin-Diet Tinggi Lemak-Rokok..	81
4.3.3	Kadar Malondialdehyde (MDA) Setelah Setelah 28 Hari Perlakuan pada Keempat Kelompok Utama Penelitian	84
BAB V PEMBAHASAN		89
5.1	Pengaruh Metode Induksi Aterosklerosis terhadap Gambaran Histopatologi Aorta	89
5.1.1	Pengaruh Metode Induksi Aterosklerosis terhadap Ketebalan Dinding Aorta.....	90
5.1.2	Pengaruh Metode Induksi Aterosklerosis terhadap Jumlah Sel Busa Aorta	91

5.1.3	Pengaruh Injeksi Adrenalin terhadap Histopatologi Aorta	92
5.1.4	Pengaruh Diet Tinggi Lemak terhadap Histopatologi Aorta	93
5.1.5	Pengaruh Paparan Asap Rokok terhadap Histopatologi Aorta	95
5.2	Pengaruh Metode Induksi Aterosklerosis terhadap Kadar Malondialdehyde (MDA)	101
5.2.1.	Pengaruh Injeksi Adrenalin terhadap Kadar MDA	102
5.2.2	Pengaruh Diet Tinggi Lemak terhadap Kadar MDA	103
5.2.3	Pengaruh Paparan Asap Rokok terhadap Kadar MDA	104
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		106
6.1	Kesimpulan	106
6.2	Saran.....	107
BAB VII RINGKASAN		108
DAFTAR PUSTAKA		113
LAMPIRAN.....		139

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Keaslian Penelitian.....	13
Tabel 2. Tahapan perjalanan lesi plak aterosklerosis.....	29
Tabel 3. Definisi Operasional Variabel.....	51
Tabel 4. Data hasil pengukuran Rasio IMT pada K0 dan K3 setelah mendapatkan 7 hari perlakuan.....	64
Tabel 5. Data hasil pengukuran rasio IMT pada subkelompok K3.....	67
Tabel 6. Data hasil pengukuran rasio IMT pada keempat kelompok penelitian...	69
Tabel 7. Hasil penghitungan jumlah sel busa tunika intima pada K0 dan K3 setelah diberi 7 hari perlakuan	72
Tabel 8. Hasil Penghitungan Jumlah Sel Busa pada Subkelompok K3	74
Tabel 9. Hasil penghitungan jumlah sel busa keempat kelompok penelitian	76
Tabel 10. Hasil Pengukuran Kadar MDA Darah pada K0 dan K3 setelah mendapat 7 hari perlakuan.....	78
Tabel 11. Hasil Pengukuran Kadar MDA Darah pada K0 dan K3 setelah mendapat 7 hari perlakuan.....	80
Tabel 12. Hasil Pengukuran MDA Darah pada subkelompok K3	81
Tabel 13. Hasil Pengukuran MDA Jantung pada subkelompok K3	83

Tabel 14. Hasil Pengukuran Kadar MDA Darah pada keempat kelompok penelitian	85
Tabel 15. Hasil Pengukuran Kadar MDA Jantung Keempat Kelompok	87

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Urutan perjalanan terjadinya aterosklerosis pada model hewan coba tikus	28
Gambar 2. Preparat arteri dengan berbagai jenis fase aterosklerosis.....	32
Gambar 3. Kerangka Teori.....	45
Gambar 4. Kerangka Konsep	46
Gambar 5. Alur Penelitian.....	61
Gambar 6. <i>Consolidated Report</i> Penelitian	62
Gambar 7. Preparat aorta potongan transversal pengecatan hematoksilin eosin perbesaran 400 kali. Tampak perbedaan ketebalan tunika intima-subintima pada K0 sebagai kelompok kontrol negatif dan K3A yang diberi perlakuan injeksi adrenalin, diet tinggi lemak, serta paparan asap rokok selama 7 hari	63
Gambar 8. Grafik batang yang menggambarkan rerata (mean) rasio ketebalan tunika intima-media aorta antara kelompok K0 dan K3 setelah 7 hari perlakuan. **p < 0,01	65
Gambar 9. Preparat aorta pengecatan hematoksilin eosin perbesaran 400x. Tampak perbedaan penebalan tunika intima pada K3A, K3B, K3C, dan K3D.....	65
Gambar 10. Perbandingan rerata rasio ketebalan tunika intima-media aorta K3 pada hari ke-7,14,21,dan 28 perlakuan. **p < 0,01	67

Gambar 11. Preparat aorta potongan transversal pengecatan hematoksilin-eosin dengan perbesaran 400x. Tampak perbedaan permukaan tunika intima pada K0, K1, K2, dan K3. K0 memiliki tunika intima yang masih halus dan tidak mengalami penonjolan plak aterosklerosis ke lumen; K1 memiliki lapisan tunika intima yang mulai mengalami peninggian di beberapa lokasi; K2 memiliki lapisan tunika intima beserta subintima yang lebih menonjol dibandingkan K0 dan K1; K3 memiliki lapisan tunika intima yang telah meninggi dan mengalami plak di banyak bagian 68

Gambar 12. Grafik batang yang menggambarkan rerata (mean) rasio ketebalan tunika intima-media aorta (IMT) K0 (kontrol), K1 (adrenalin-HFD), K2 (rokok), dan K3 (adrenalin-HFD-rokok). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ 70

Gambar 13. Preparat aorta potongan transversal pengecatan hematoksilin eosin perbesaran 100x (kiri) dan 400x (kanan) pada K3. Tampak plak aterosklerosis yang menonjol ke dalam lumen 71

Gambar 14. Preparat aorta potongan transversal pengecatan hematoksilin eosin perbesaran 400x pada K3. Tampak plak *fibrofatty* aterosklerosis pada dinding tunika intima menonjol ke lumen aorta (tanda pada i, ii, dan iii). K3 mendapatkan perlakuan induksi aterosklerosis dengan menggunakan injeksi adrenalin, diet tinggi lemak berupa kuning telur bebek, serta paparan asap rokok selama 28 hari 71

Gambar 15. Grafik batang yang menggambarkan rerata (mean) jumlah sel busa aorta antara kelompok K0 dan K3 setelah 7 hari perlakuan. ** $p < 0,01$ 73

- Gambar 16. Grafik batang yang menggambarkan perbandingan rerata jumlah sel busa aorta pada K3 pada hari ke-7,14,21,dan 28 perlakuan. * $p < 0,05$ 74
- Gambar 17. Preparat aorta pengecatan *oil red O* perbesaran 100x. Tampak adanya sel busa yang terplulas warna merah di daerah tunika intima dan subintima pada K1, K2, dan K3 (tanda panah) 75
- Gambar 18. Grafik batang yang menggambarkan rerata (mean) jumlah sel busa aorta K0 (kontrol), K1 (adrenalin-HFD), K2 (rokok), dan K3 (adrenalin-HFD-rokok). ** $p < 0,01$ 76
- Gambar 19. Grafik batang yang menggambarkan perbedaan rerata kadar MDA darah pada K0 dan K3A setelah diberi perlakuan selama 7 hari 79
- Gambar 20. Grafik batang yang menggambarkan perbedaan rerata kadar MDA jaringan jantung pada K0 dan K3A setelah diberi perlakuan selama 7 hari. ** $p < 0,01$ 80
- Gambar 21. Grafik batang yang menggambarkan perbedaan rerata kadar MDA darah pada K0, K1, K2, dan K3 setelah diberi perlakuan selama 28 hari. ** $p < 0,01$ 84
- Gambar 22. Grafik batang yang menggambarkan perbedaan rerata kadar MDA darah pada K0, K1, K2, dan K3 setelah diberi perlakuan selama 28 hari. ** $p < 0,01$ 85

DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

ACE	: Angiotensin-I Converting Enzyme
ALK1	: Activin Receptor-Like Kinase 1
APOE	: Apolipoprotein-E
ATP	: Adenosine Triphosphate
CD68	: Cluster of Differentiation 68
CO	: Carbon Monoxide
COX-2	: Cyclooxygenase-2
CRP	: C-Reactive Protein
CXCL	: Chemocine Ligand
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
eNOS	: Endothelial Nitric Oxide Synthase
GM-CSF	: Granulocyte-macrophage colony-stimulating Factor
Hb	: Hemoglobin
HDL	: High Density Lipoprotein
HE	: Hematoxylin Eosin
HFD	: Hight Fat Diet
hsCRP	: High Sensitivity C-Reactive Protein
ICAM-1	: Intercellular Cell Adhesion Molecule - 1
IL-1	: Interleukin - 1
IL-6	: Interleukin - 6
IL-8	: Interleukin - 8
iNOS	: Inducible Nitric Oxide Synthase

KLF-2	: Kruppel like Factor 2
LDL	: Low Density Lipoprotein
LDL-C	: Low-Density Lipoprotein Cholesterol
M-CSF	: Macrophage Colony Stimulating Factor
MCP-1	: Monocyte Chemoattractant Protein - 1
MCP-1	: Monocyte Chemottractant Protein-1
MDA	: Malondialdehyde
MPO	: Myeloperoksidase
NAD(P)H	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate) Hydrogen
NADH	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen
NF-kB	: Nuclear Factor Kappa B
NF-KB	: Nuclear Factor Kappa B
NO	: Nitric Oxide
NRF-2	: Nuclear Factor Erythroid 2
OECD	: Organisation for Economic Co-operation and Development
oxLDL	: Oxidized Low Density Lipoprotein
oxLDL	: Oxidized Low-Density Lipoprotein
PAH	: Polycyclic Aromatic Hydrocarbon
PDGF	: Platelet-derived Growth Factor
PKC	: Protein Kinase C
PKC	: Protein Kinase C
PPAR	: Peroxisome proliferator-activated receptors
ROS	: Reactive Oxygen Species

SDF-1	: Stromal cell derived Factor-1
SR-B1	: Scavenger Receptor Class B Type 1
TG	: Triglyceride
TGF-beta	: Transforming Growth Factor-beta
TLR	: Toll-like Receptor
TMAO	: Trimethylamine N-Oxide
TNF	: Tumor Necrosis Factor
VCAM-1	: Vascular Cell Adhesion Molecule - 1
VHFD	: Very High Fat Diet
VLDL	: Very Low-Density Lipoprotein
VSMC	: Vascular Smooth Muscle Cell
WHO	: World Health Organization
XO	: Xanthine Oxidase

ABSTRAK

Latar belakang: Aterosklerosis pada tikus dapat disebabkan oleh diet tinggi lemak atau paparan asap rokok (CSE). Namun, belum ada penelitian yang membandingkan efektivitas antara metode tersebut.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan pengaruh kedua metode tersebut terhadap histopatologi aorta dan kadar malondialdehid (MDA) pada tikus.

Metode: Desain penelitian ini adalah *experimental* dengan *time interrupted series*. 36 ekor tikus wistar dibagi menjadi 4 kelompok utama dan 4 subkelompok tambahan. Kelompok kontrol negatif (K0) terdiri dari 9 ekor tikus dan diberi pakan standar. Kelompok K1 terdiri dari 6 ekor tikus dan diberi adrenalin intravena diikuti diet tinggi lemak (HFD), K2 terdiri dari 6 ekor tikus dan diberi diet standar dan CSE, sedangkan K3 terdiri dari 15 ekor tikus dan diberi kombinasi CSE dan HFD. Kelompok K3 dibagi menjadi subkelompok K3A yang mendapat perlakuan selama 7 hari, K3B yang mendapat perlakuan selama 14 hari, K3C yang mendapat perlakuan selama 21 hari, serta K3D yang mendapat perlakuan selama 28 hari. Kadar MDA serum dan jantung diukur menggunakan ELISA. Pewarnaan hematoxylin eosin dan oil red O pada aorta dilakukan masing-masing untuk mengukur rasio ketebalan intima-media (IMT) dan untuk menghitung sel busa.

Hasil: Kadar MDA serum dan jaringan jantung baik pada K1, K2, atau K3 secara signifikan lebih tinggi ($p < 0,01$) dibandingkan pada K0. Rasio IMT pada K3 signifikan lebih tinggi dibandingkan kelompok lain ($p < 0,01$). Jumlah sel busa secara signifikan lebih tinggi pada kelompok K2 dan K3 dibandingkan pada kelompok K0 atau K1 ($p < 0,01$). Tidak ada perbedaan signifikan pada histopatologi aorta antar subkelompok K3.

Kesimpulan: Metode induksi aterosklerosis baik dengan CSE atau kombinasi CSE dan HFD mampu menginduksi aterosklerosis pada tikus, tetapi kombinasi lebih baik daripada sendiri.

Kata Kunci: Aterosklerosis, intima: rasio ketebalan media, sel busa, malondialdehid, paparan asap rokok, diet tinggi lemak.

ABSTRACT

Background: Atherosclerosis in rats can be caused by a high-fat diet or exposure to cigarette smoke (CSE). However, there have been no studies comparing the effectiveness between these methods.

Objective: This study aimed to determine the difference in the effect of the two methods on aortic histopathology and malondialdehyde (MDA) levels in rats.

Methods: The design of this study was experimental with time interrupted series. 36 wistar rats were divided into 4 main groups and 4 additional subgroups. The negative control group (K0) consisted of 9 rats and were given standard feed. The K1 group consisted of 6 rats and was given intravenous adrenaline followed by a high-fat diet (HFD), K2 consisted of 6 rats and was given a standard diet and CSE, while K3 consisted of 15 rats and was given a combination of CSE and HFD. The K3 group was further divided into 4 subgroups: K3A that received treatment for 7 days, K3B that received treatment for 14 days, K3C that received treatment for 21 days, and K3D who received treatment for 28 days. Serum and heart MDA levels were measured using ELISA. Hematoxylin eosin and oil red O staining of the aorta was performed to measure the intima-media thickness ratio (IMT) and to count foam cells, respectively.

Results: Serum and heart tissue MDA levels at either K1, K2, or K3 were significantly higher ($p < 0.01$) than at K0. IMT ratio in K3 was significantly higher than other groups ($p < 0.01$). The number of foam cells was significantly higher in group K2 and K3 than in groups K0 or K1 ($p < 0.01$). There was no significant difference in aortic histopathology between K3 subgroups.

Conclusion: Atherosclerosis induction method with either CSE or a combination of CSE and HFD was able to induce atherosclerosis in rats, but the combination was better than alone.

Keywords: Atherosclerosis, intima:media thickness ratio, foam cells, malondialdehyde, cigarette smoke exposure, high fat diet.