



**PENGARUH SUPLEMENTASI PROBIOTIK TERHADAP  
MARKER INFLAMASI DAN FIBROGENESIS HATI TIKUS  
SPRAGUE-DAWLEY:**

**Studi Eksperimental Induksi Diet *High-Fat High-Fructose***

**Ninung Rose Diana Kusumawati**

**NIM 30000115510008**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN/ KESEHATAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO**

**2022**

# HALAMAN PERSETUJUAN

## DISERTASI

### PENGARUH SUPLEMENTASI PROBIOTIK TERHADAP MARKER INFLAMASI DAN FIBROGENESIS HATI TIKUS SPRAGUE-DAWLEY:

#### Studi Eksperimental Induksi Diet *High-Fat High-Fructose*

Disusun oleh :

**Ninung Rose Diana Kusumawati**

NIM 30 000 11 55 1000 8

Telah disetujui dan dinyatakan lulus pada tanggal 5 Juli 2022 oleh Tim Penguji Program Studi  
Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Promotor

Ko Promotor

**Prof. dr. Magdalena Sidhartani Zain, M.Sc, Sp.A(K)**

NIP. 19460801 197403 2 001

**DR. dr. Maria Mexitalia Setiawati, Sp.A(K)**

NIP. 19670227 199509 2 001

**Mengetahui**

Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas Diponegoro

Ketua Program Studi Doktor Ilmu  
Kedokteran/Kesehatan

**Prof. Dr. dr. Dwi Pudjonarko, M.Kes, Sp.S(K)**

NIP. 19660720 199512 1 001

**Prof. Dr. dr. Tri Indah Winarni, M.Si.Med.PA**

NIP. 19660510 1997022 001

## HALAMAN PENGESAHAN

**PENGARUH SUPLEMENTASI PROBIOTIK TERHADAP MARKER  
INFLAMASI DAN FIBROGENESIS HATI TIKUS SPRAGUE-DAWLEY:  
Studi Eksperimental Induksi Diet *High-Fat High-Fructose***

Disusun Oleh:

**Ninung Rose Diana Kusumawati**

30 000 11 55 1000 8

### TIM PENGUJI

1. Dr.dr.Trilaksana Nugroho, M.Kes, Sp.M(K) 1.....  
(Ketua)
2. Prof. dr. Magdalena Sidhartani Zain, MSc, Sp.A(K) 2.....  
(Promotor)
3. Dr.dr.Maria Mexitalia Setiawati, Sp.A(K) 3.....  
(Ko-Promotor)
4. Prof. Dr. dr. Ign Riwanto, Sp.B, KBD 4.....  
(Anggota)
5. Dr. dr. Awal Prasetyo, MKes, Sp.THT-KL 5.....  
(Anggota)
6. Prof. Dr. dr. Subiyanto. MS, Sp.A(K) 6.....  
(Anggota)

## LEMBAR PERSEMBAHAN

Sabar iku ingaran mustikaning laku.

*(Bertingkah laku dengan mengutamakan kesabaran adalah sesuatu yang sangat berharga dalam kehidupan)*

Gusti paring dalan kanggo uwong sing gelam ndalan.

*(Allah SWT memberi jalan untuk manusia yang mau mengikuti jalan kebenaran)*

Datan serik lamun ketaman, datan susah lamun kelangan

*(Jangan terlalu bersedih saat mendapat bencana atau kehilangan karena semua adalah milik Allah SWT)*

Urip iku urup

*(Kehidupan manusia harus memberikan manfaat untuk sesama, agar hidup menjadi lebih bermakna)*

Seratan menika katur kagem....

Bapa lan Ibu Ir. Bakuh Nindyo Suripno, Dipl. HE

lan Risya Purwaningsih

Almarhum lan almarhumah Bapa lan Ibu

dr. R. Soebekti lan Dra. Soeharmijati

Garwa lan anak-anak kawula

Guru lan Maha Guruku

Sedherek lan kekanca sedaya

## PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : dr. Ninung Rose Diana Kusumawati, M.Si.Med, Sp.A(K)

NIM : 30000115510008

Mahasiswa : Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran  
Universitas Diponegoro Semarang

Dengan ini saya menyatakan bahwa Disertasi berjudul :

**PENGARUH SUPLEMENTASI PROBIOTIK TERHADAP MARKER INFLAMASI  
DAN FIBROGENESIS HATI TIKUS SPRAGUE-DAWLEY:  
Studi Eksperimental Induksi Diet *High-Fat High-Fructose***

Adalah karya ilmiah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik (Doktor) di perguruan tinggi manapun.

1. Disertasi ini adalah murni gagasan, rumusan, dan hasil penelitian saya serta dilakukan tanpa bantuan orang lain, kecuali Promotor, Ko-Promotor dan Narasumber.
2. Disertasi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dicantumkan sebagai acuan dalam naskah dengan menyebutkan nama pengarang dan judul aslinya serta dicantumkan dalam daftar pustaka.
3. Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila di kemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang saya peroleh dan sanksi lain sesuai dengan norma yang berlaku di Universitas Diponegoro Semarang.

Semarang, 5 Juli 2022

Yang membuat pernyataan,

Ninung Rose Diana Kusumawati

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penyusunan hasil disertasi dengan judul **”Pengaruh Suplementasi Probiotik Terhadap Marker Inflamasi dan Fibrogenesis Hati Tikus Sprague-Dawley: Studi Eksperimental *Diet High-Fat High-Fructose*”** dapat selesai. Penelitian ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar akademik Doktor pada Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

Banyak sekali pihak yang telah berkenan membantu penulis dalam menyusun disertasi ini, sehingga kiranya tidaklah berlebihan apabila pada kesempatan ini penulis menghaturkan rasa terima kasih dan penghormatan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Rektor Universitas Diponegoro Semarang Prof. Dr. Yos Johan Utama, SH, M.Hum yang telah menerima, memperkenankan, dan memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan di Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang Prof. Dr. dr. H. Dwi Pudjonarko, M.Kes, Sp.S(K) dan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang periode sebelumnya, Prof. Dr. dr. Tri Nur Kristina, DMM, M.Kes beserta jajarannya yang telah menerima, memperkenankan, dan memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan di Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

3. Prof. Dr. dr. Tri Indah Winarni, Ketua Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan Dr. dr. Fifin Luthfia Rahmi, MS, Sp.M(K), Ketua Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro periode sebelumnya, yang telah memperkenankan dan memberikan arahan kepada penulis dalam mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan di Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
4. Prof. dr. Magdalena Sidhartani Zain, M.Sc, Sp.A(K) , selaku Promotor, yang dengan penuh kesabaran selalu memberikan motivasi, dukungan, arahan dan bimbingan dalam mendampingi penulis selama proses penyelesaian penelitian disertasi.
5. DR. dr. Maria Mexitalia Setiawati, Sp.A(K), selaku Ko-Promotor, yang dengan penuh kesabaran selalu memberikan motivasi, dukungan, arahan dan bimbingan dalam mendampingi penulis selama proses penyelesaian disertasi.
6. Prof. DR. dr. Agus Firmansyah, Sp.A(K) (Alm), selaku Ko-Promotor, yang selalu memberikan motivasi, dukungan, arahan selama proses penyelesaian disertasi.
7. Prof. Dr. dr. Ign. Riwanto, Sp.B KBD selaku narasumber (penguji) yang senantiasa memberikan sumbangan pemikiran, masukan, saran, pendalaman materi dan justifikasi ilmiah dalam setiap tahapan proses penulisan disertasi.
8. Dr. dr. Awal Prasetyo, Sp.THT-KL, M.Kes selaku narasumber (penguji) yang senantiasa memberikan masukan, arahan, saran, yang sangat bermanfaat pada penulisan disertasi ini.
9. Prof. Dr. dr. Subiyanto, M.S, Sp.A(K) selaku narasumber (penguji) yang telah memberikan masukan, arahan serta bimbingan untuk perbaikan penulisan disertasi ini.

10. Prof. Dr. dr. Edhi Dharmana (Alm) selaku penguji proposal kami untuk semua masukan dan arahan beliau sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan lancar.
11. Prof. Dr. Widjiati, drh, M.Si yang telah memberikan ijin penelitian di FKH Universitas Airlangga Surabaya dan memberi dukungan, masukan serta saran yang sangat berguna pada penelitian ini.
12. Kepada seluruh staf pengajar di Program Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, penulis sampaikan rasa hormat, terima kasih, serta penghargaan yang setinggi-tingginya atas segala bimbingan, petunjuk, dan pemberian konsep-konsep dasar keilmuan yang sangat bermanfaat untuk penyelesaian disertasi ini.
13. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada seluruh staf administrasi Program Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro atas segala bantuan sehingga proses pendidikan penulis berjalan lancar.
14. Direktur Utama Rumah Sakit Umum Pusat dr. Kariadi Semarang drg. Farichah Hanum, M.Kes dan Direktur Utama Rumah Sakit Umum Pusat dr. Kariadi Semarang periode sebelumnya, dr. Agus Suryanto, Sp.PD-KP, MARS, beserta jajaran direksi yang telah memberikan ijin bagi penulis untuk menempuh pendidikan Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan di Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
15. Dr. I. Hartantyo, Sp.A(K) (Alm) yang selalu mendukung, memberikan arahan bantuan dan doa dengan tulus kepada penulis, segala pesan dan nasihat beliau akan selalu penulis ingat sepanjang hayat.



16. Dr. Budi Santosa, Sp.A(K) untuk dukungan, bimbingan, nasihat dan arahannya kepada penulis.
17. Para guru besar dan seluruh staf pengajar di bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP dr. Kariadi Semarang : Prof. Dr. Moeljono S. Trastotenojo, Sp.A(K) (Alm); Prof. Dr. Hariyono Suyitno, Sp.A(K); Prof. Dr. dr. Ag. Soemantri, Sp.A(K), Ssi (Stat) (Alm); Prof. Dr. dr. I. Sudigbia, Sp.A(K) (Alm); Prof. Dr. dr. Lydia Kristanti K, Sp.A(K) (Almh); Prof.dr.Magdalena Sidhartani Zain, M.Sc, Sp.A(K) ; Prof. Dr. dr. Harsoyo N, Sp.A(K), DTM&H; Prof. Dr. dr. Tatty Ermin S, Sp.A(K), PhD (Almh); Dr. Budi Santosa, Sp.A(K) ; Prof. Dr. dr. H. M. Sholeh Kosim, Sp.A(K) (Alm); Dr. I. Hartantyo, Sp.A(K) (Alm); dr. H.R. Rochmanadji Widajat, Sp.A(K), MARS; Dr. dr. Kamilah Budhi R, Sp.A(K); Dr. dr. Tjipta Bahtera, Sp.A(K) (Alm); Dr. dr. Moedrik Tamam, Sp.A(K); dr. Rudy Susanto, Sp.A(K) (Alm); Dr. dr. Hendriani Selina, Sp.A(K), MARS; dr. J.C. Susanto, Sp.A(K) (Alm); dr. Agus Priyatno, Sp.A(K); Dr. dr. Asri Purwanti, Sp.A(K), MPd; dr. Bambang Sudarmanto, Sp.A(K), MARS; dr. MMDEAH Hapsari, Sp.A(K); Dr. dr. Alifiani Hikmah Putranti, Sp.A(K); Dr. dr. Mexitallia S, Sp.A(K); Dr. dr. M. Heru Muryawan, Sp.A(K); dr. Gatot Irawan Sarosa, Sp.A(K); Dr. dr. Anindita Soetadji, Sp.A(K); dr. Wistiani, M.Si.Med, Sp.A(K); dr. M. Supriatna TS, Sp.A(K); Dr. dr. Fitri Hartanto, Sp.A(K); Dr. dr. Omega Mellyana, Sp.A(K); dr. Yetty Movieta Nancy, Sp.A(K); dr. Nahwa Arkhaesi, M.Si.Med, Sp.A; dr. Yusrina Istanti, M.Si.Med, Sp.A(K); dr. Tun Paksi S, M.Si.Med, Sp.A; dr. MS. Anam, M.Si.Med, Sp.A; dr. Arsita Eka Rini, M.Si.Med, Sp.A(K); dr. Dewi Ratih, M.Si.Med, Sp.A(K); Dr. dr. Agustini Utari, M.Si.Med, Sp.A(K); dr. Adhie Nur Radityo, M.Si.Med,

Sp.A(K); dr. Galuh Hardaningsih, M.Si.Med, Sp.A(K); dr. Farid Agung Rahmadi, M.Si. Med, Sp.A; dr. Rina Pratiwi, M.Si.Med, Sp.A(K); dr. Helmia Farida, M.Kes, Sp.A, PhD; dr. Mulyono, Sp.A; dr. Dimas Tri Anantyo, Sp.A; dr. Riza Sahyuni, Sp.A(K), M.Kes; dr. Juwita Pratiwi, Sp.A; dr. Stephanie Adelia, Sp.A; dr. Ariawan, Sp.A; dr. Astra Prahita, Sp.A; dr. Nisa Alifia Rahmi, Sp.A atas doa dan dukungannya, semoga Allah SWT membalas semua kebaikan beliau-beliau dengan karunia terbaik-Nya.

18. Bakti, hormat dan doa serta terima kasih yang tulus kepada kedua orang tuaku tercinta Bapak Ir. Bakuh Nindyo Suripno, Dipl. HE dan Ibu Risyah Purwaningsih, yang dengan penuh kasih sayang, ketelatenan, ketulusan dan pengorbanan telah mengasuh, membesarkan, mendidik, mengajarkan nilai-nilai hidup, menanamkan kemandirian dan tanggung jawab serta memberikan dorongan semangat, serta, bantuan moril dan material. Tanpa doa restu beliau berdua penulis tidak akan dapat menyelesaikan tanggung jawab, tugas-tugas dan kewajiban penulis.
19. Bapak dan ibu mertua terkasih, Bapak dr. R.Soebekti (Alm) dan Ibu Dra. Soeharmijati (Almh) yang telah memberikan kasih sayang luar biasa serta doa restu yang tak pernah putus pada penulis. Kasih sayang dan dukungan beliau berdua sungguh luar biasa.
20. Suamiku tercinta, dr. Eko Adhi Pangarsa, Sp.PD-KHOM, yang telah dengan setia mendampingi, mendukung, dan tiada henti mendorong serta mendoakan penulis dalam penyelesaian disertasi ini. Terima kasih atas semua pengorbanan, perhatian, dan kasih sayang yang membuat percaya diri dan membangkitkan semangat penulis untuk menyelesaikan disertasi ini dengan baik. Disertasi ini penulis bingkiskan untuk Suami tercinta.

21. Permata hatiku tersayang Adhi Baskara Kusumaputra, Rania Adhiani Kusumaputri, dan Radika Adhi Tranggono Kusumaputra, terimakasih atas motivasi, inspirasi, energi, cinta, kasih sayang, dukungan, semangat, doa dan pengertiannya selama penulis menyelesaikan pendidikan.
22. Adik-adikku terkasih, dr. Putri Meneng Kusumoindiah, M.Si,Sp.A; Bintoro Suatmadji, SP; dr. Meutia Amirah, AAK atas do'a, bantuan dan dukungannya.
23. Keponakanku tersayang Lanang Kukuh Kusumoseito dan Evan Rasyid Adjisaputra untuk doa dan dukungannya.
24. Sahabat terbaikku Dr. dr. Agustini Utari, M.Si.Med, Sp.A(K), untuk semua motivasi, bantuan dan dorongan serta doanya sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi ini. Terimakasih ya Titoet sayang, karena dorongan dan bantuannya, penulis menjadi bersemangat dan termotivasi menyelesaikan disertasi ini.
25. Untuk adik tersayang dr. Juwita Pratiwi, Sp.A, untuk semua bantuan, support dan doanya. Terimakasih sudah bersedia direpoti dan meluangkan waktu untuk penulis.
26. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan pada teman-teman yang telah membantu dan bekerja sama dalam penelitian ini, terutama dalam pengambilan data di lapangan serta pengolahan data. Damianus Galih Panunggal, dan Mey Vanda Pusparina Sajida, terimakasih ya adik-adik yang baik.
27. Terima kasih juga penulis sampaikan pada Indri Maidiani, serta Dina Labbaika yang selalu siap sedia membantu penulis dalam mempersiapkan disertasi ini.

28. Rekan-rekan Program Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan angkatan 2015 untuk bantuan, dorongan semangat, dukungan, serta kebersamaannya selama proses pendidikan dan penyelesaian disertasi.
29. Teman-teman Bidang pelayanan medik RSUP Dr Kariadi, teman-teman Instalasi Paviliun Garuda RSUP Dr Kariadi, teman-teman Instalasi Cendrawasih RSUP Dr Kariadi, untuk motivasi dan pengertiannya selama penulis menyelesaikan disertasi ini.
30. Semua orang hebat yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah berperan dalam hidup dan studi penulis.

Akhir kata dari lubuk hati yang paling dalam, penulis juga menyampaikan permohonan maaf kepada semua pihak yang mungkin telah mengalami hal yang kurang berkenan dalam berinteraksi dengan penulis selama kegiatan penelitian dan penyusunan disertasi ini. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan berkah dan karunia-Nya kepada kita semua. Amin.

Semarang, 5 Juli 2022

Penulis

Ninung Rose Diana Kusumawati

## ABSTRAK

**Latar Belakang** *Non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) merupakan salah satu komorbiditas pada anak dan remaja dengan obesitas. Disbiosis usus dapat mengakibatkan masuknya lipopolisakarida ke sirkulasi vena porta, yang akan mengaktifkan TNF- $\alpha$  dan IL-6 serta meningkatkan TLR4 yang memicu fibrosis melalui peningkatan sinyal pada TGF- $\beta$ . Disbiosis juga meningkatkan NLRP3 dan IL-1 $\beta$  yang memicu NASH. Probiotik diketahui mampu memperbaiki disbiosis.

**Tujuan** Membuktikan apakah suplementasi probiotik memperbaiki NAFLD melalui perbaikan parameter inflamasi dan fibrogenesis pada tikus Sprague-Dawley yang diinduksi oleh diet *high-fat high-fructose* (HFHFr)

**Metode** Penelitian *post-test only control group design* dilakukan pada 63 ekor tikus jantan dibagi menjadi 1 kelompok kontrol dan 8 kelompok perlakuan. Dari 8 kelompok ini kemudian dibagi menjadi kelompok dengan probiotik dan tanpa probiotik. Masing-masing kelompok diberikan HFHFr selama 8, 12, 16, dan 24 minggu. Kemudian, kelompok probiotik diberikan kombinasi HFHFr dan probiotik selama 8 minggu. Setelah perlakuan, kadar TLR4, IL-1 $\beta$ , IL6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , NLRP3 dan derajat fibrosis setiap tikus diukur, kemudian dibandingkan antara yang mendapat dan tidak mendapat probiotik.

**Hasil** Terdapat hasil yang bervariasi pada masing-masing kelompok, namun didapatkan bahwa pada kelompok 12 minggu memberikan hasil yang paling baik dimana terdapat penurunan marker imunologi, walaupun kadar IL-1 $\beta$  dan derajat fibrosis tidak menurun secara signifikan. Pemberian probiotik selama 8 minggu mencegah terjadinya NASH pada kelompok 8 minggu dan 12 minggu.

**Kesimpulan** Pemberian probiotik memperbaiki marker inflamasi namun tidak memperbaiki fibrogenesis.

**Kata Kunci** NAFLD, Fibrosis, Probiotik, NASH, Parameter Imunologi

## ABSTRACT

**Background** Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the comorbidities for children and adolescent obesity. Gut dysbiosis can cause lipopolysaccharide to enter the portal vein system, activate TNF- $\alpha$  and IL-6, increasing TLR4, that promotes fibrosis via TGF- $\beta$  activation. Dysbiosis also elevates NLRP3 and IL-1 $\beta$ , causing NASH. Probiotic is known to alleviate dysbiosis.

**Aim** To find if probiotic improves NAFLD by alleviating inflammatory parameters and fibrogenesis in Sprague-Dawley rats induced by high-fat high-fructose (HFHFr) diet.

**Method** A post-test only control group design study was conducted on 63 male rats, each divided into 1 control group and 8 treatment groups. Treatment groups were further divided into groups with probiotics and without probiotics. Each group was given HFHFr for 8, 12, 16, and 24 weeks. After passing this period, the probiotic group was given a combination of HFHFr and probiotics for 8 weeks. After treatment, levels of TLR4, IL-1 $\beta$ , IL6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , NLRP3 and degree of fibrosis were measured, then compared between those receiving probiotics and those not receiving probiotics.

**Results** There were varied results on each group, but we found that in the 12 weeks group there was a decrease of immunological parameter after probiotic, despite IL-1 $\beta$  and fibrosis degree were not significantly reduced. 8 weeks of probiotic could prevent NASH in the 8 weeks and 12 weeks group.

**Conclusion** Administration of probiotics reduced inflammatory parameters but did not alleviate fibrogenesis.

**Keywords** NAFLD, Fibrosis, Probiotic, NASH, Immunological Parameter.

## RINGKASAN

### Latar Belakang

*Non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) merupakan salah satu komorbiditas yang penting dari obesitas pada anak dan remaja. Spektrum NAFLD mulai dari penemuan histopatologi perlemakan hati (steatosis) menjadi perlemakan dengan peradangan (steatohepatitis) sampai sirosis hati dan stadium akhir penyakit hati. *Non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) dalam waktu singkat dapat berkembang menjadi fibrosis hati. Kini diketahui bahwa disbiosis (ketidakseimbangan mikrobiota) di usus berperan dalam perkembangan NAFLD. Mikrobiota mempengaruhi NAFLD melalui beberapa mekanisme, melalui proses digesti dan absorpsi nutrisi, melalui perannya pada permeabilitas usus, sistem imunitas dan inflamasi host, melalui metabolisme kolin, melalui metabolisme asam empedu, dan produksi etanol endogen. Gangguan permeabilitas usus dapat menyebabkan masuknya lipopolisakarida (LPS) dan *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) yang selanjutnya akan mengaktifkan sitokin pro inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12. LPS kemudian akan berikatan dengan *lipopolysaccharide-binding protein* (LBP), LBP kemudian berikatan dengan CD14. Kompleks ini akan mengaktifkan TLR4 pada sel Kuppfer. TLR4 berperan penting dalam terjadinya NASH dan deposisi lemak. TLR4 memicu terjadinya fibrosis melalui peningkatan sinyal pada *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ).

Inflammasom merupakan salah satu komponen lain yang berperan dalam NAFLD. Inflammasom ini sendiri adalah multi-protein sitoplasma kompleks yang disusun oleh *leucine-rich-repeat containing proteins* dan *nucleotide-binding domain* (NLRPs), yang merupakan sensor PAMPs dan *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Saat ini diketahui bahwa ekspresi NLRP3 dan komponennya meningkat bermakna pada penelitian yang menggunakan tikus dan manusia yang menderita *Non-Alcoholic Steatohepatitis* sebagai subyek. Pada pasien dengan NASH, ekspresi dari protein yang berhubungan dengan inflammasom (NLRP3, pro-IL-1 $\beta$ , dan pro-IL-18) secara signifikan lebih tinggi dibanding pasien tanpa NASH. Penelitian dengan menggunakan NLRP3 *knock-out* tikus dan penelitian dengan bahan farmakologi yang menghambat NLRP3 memberikan hasil perbaikan pada steatosis hepar, inflamasi hepar, dan

fibrosis hepar. Hasil ini menunjukkan bahwa NLRP3 memiliki peran penting pada kejadian NASH dan dapat berperan dalam pembuatan terapi target untuk NASH. Seperti halnya TLR4, perubahan pada mikrobiota saluran cerna dapat mempengaruhi kadar inflammasom NLRP3. Sebagai usaha untuk mengetahui peran probiotik dalam patogenesis NAFLD dan untuk selanjutnya agar dapat mengetahui apakah probiotik bermanfaat pada pencegahan NAFLD maka dilakukan penelitian dengan hewan coba yang fokusnya adalah untuk mengetahui pengaruh probiotik terhadap kadar sitokin proinflamasi dan fibrogenesis liver pada hewan coba yang mengalami NAFLD.

### **Tujuan Umum**

Membuktikan apakah suplementasi probiotik memperbaiki *non-alcoholic fatty liver disease* melalui perbaikan marker inflamasi dan fibrogenesis pada tikus Sprague-Dawley yang diinduksi oleh diet *high-fat high-fructose* (HFHFr)

### **Tujuan Khusus**

- a. Apakah suplementasi probiotik menurunkan kadar TLR4, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , dan NLRP3 pada tikus Sprague-Dawley yang diinduksi oleh diet *high-fat high-fructose*.
- b. Apakah suplementasi probiotik mempengaruhi *non-alcoholic steatohepatitis* (NAS) score pada tikus Sprague-Dawley yang diinduksi oleh diet *high-fat high-fructose*.
- c. Apakah suplementasi probiotik mempengaruhi derajat fibrosis pada tikus Sprague-Dawley yang diinduksi oleh diet *high-fat high-fructose*.

### **Metode Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan pendekatan *Post test only design*. Subjek penelitian ini adalah 63 tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley berusia 7–8 minggu, berat badan sekitar 110 – 200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian Hewan Percobaan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Subyek dilakukan aklimatisasi selama 1 minggu. Setelah aklimatisasi selama 1 minggu tikus dibagi secara acak ke dalam 9 kelompok sebagai berikut:

Kelompok K- : kelompok kontrol diberikan diet standar selama 8 minggu



- Kelompok P.1.1 : diberikan diet *high-fat high-fructose* (HFHFr) selama 8 minggu
- Kelompok P.1.2 : diberikan diet HFHFr selama 8 minggu, mulai minggu 9 diberikan tambahan probiotik selama 8 minggu
- Kelompok P.2. : diberikan diet HFHFr selama 12 minggu
- Kelompok P.2.2 : diberikan diet HFHFr selama 12 minggu, mulai minggu 13 diberikan tambahan probiotik selama 8 minggu
- Kelompok P.3.1 : diberikan diet HFHFr selama 16 minggu
- Kelompok P.3.2 : diberikan diet HFHFr selama 16 minggu, mulai minggu 17 diberikan tambahan probiotik selama 8 minggu
- Kelompok P.4.1 : diberikan diet HFHFr selama 24 minggu
- Kelompok P.4.2 : diberikan diet HFHFr selama 24 minggu, mulai minggu 25 diberikan tambahan probiotik selama 8 minggu

Dekapitasi dilakukan pada akhir dari periode waktu diet pada masing-masing kelompok kemudian dilakukan pemeriksaan histopatologis hati, pemeriksaan laborat fungsi hati, kadar TLR4, kadar NLRP3, kadar IL-1 $\beta$ , kadar IL-6, kadar TNF- $\alpha$ , dan kadar TGF- $\beta$ . Jaringan hati yang diambil dari subyek ditanam dalam paraffin dipotong sebesar 4  $\mu$ m, dan dilakukan pengecatan dengan *hematoxylin-eosin*. Untuk mengetahui fibrosis hati dilakukan pengecatan Masson. Kemudian dilakukan skoring untuk melihat tingkat keparahan steatosis hati, inflamasi dan fibrosis. Pemeriksaan kadar TLR4, kadar NLRP3, kadar IL-1 $\beta$ , kadar IL-6, kadar TNF- $\alpha$ , dan kadar TGF- $\beta$  dilakukan di Unit Layanan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Pemeriksaan ELISA menggunakan ELISA kit untuk TLR4, NLRP3, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , dan TGF $\beta$ . Pada uji hipotesis untuk melihat pengaruh pemberian probiotik terhadap tingkat fibrosis kadar TLR4, kadar NLRP3, kadar IL-1 $\beta$ , kadar IL-6, kadar TNF- $\alpha$ , dan kadar TGF- $\beta$  digunakan *independent t-test* jika sebarannya normal atau menggunakan uji *Mann-Whitney* jika tidak normal. Untuk mengetahui perbedaan NAS-Score dan derajat fibrosis antar kelompok digunakan uji *Fisher's Exact*. Uji multivariat digunakan untuk mengetahui parameter imunologis yang paling berpengaruh pada NAS score dan derajat fibrosis.

## Hasil Penelitian

Penelitian ini menggunakan 63 tikus, sebanyak 6 ekor tikus mengalami penurunan berat badan dan 57 ekor mengalami kenaikan berat badan. Setelah perlakuan sejumlah 20 tikus memiliki berat badan yang termasuk dalam kategori obesitas, dengan berat badan di atas 208 gram.

Uji *Mann-Whitney* pada kelompok tikus dengan probiotik dan kelompok tikus tanpa probiotik, tidak menunjukkan perbedaan signifikan pada semua parameter imunologi. Kadar IL-6 dan IL-1 $\beta$  pada kelompok K dengan kelompok P.1.1 tidak berbeda secara signifikan, namun terdapat perbedaan signifikan terutama pada kadar NLRP3, TLR4, TGF- $\beta$ , dan TNF- $\alpha$ . Perbedaan signifikan antara parameter imunologi pada kelompok P.1.1 dan P.1.2 hanya ditemukan pada kadar IL-1 $\beta$  (kadarnya di P.1.2 lebih tinggi) dan kadar NLRP3 (kadarnya di P.1.2 lebih rendah). Hampir semua parameter imunologi pada kelompok P.2.1 dan kelompok P.2.2 menunjukkan perbedaan yang signifikan, dimana kadarnya di kelompok P.2.2 lebih rendah dibandingkan P.2.1, namun tidak ditemukan perbedaan yang signifikan pada kadar IL-1 $\beta$ . Pada kelompok P.3.1 dan P.3.2, tidak ditemukan perbedaan bermakna pada variabel parameter imunologi. Parameter imunologi pada kelompok P.4.2 hampir seluruhnya meningkat jika dibandingkan dengan kelompok P.4.1, kecuali kadar NLRP3, TGF- $\beta$  dan TNF- $\alpha$ . Hanya kadar IL-6 dan TNF- $\alpha$  yang menunjukkan perbedaan yang signifikan pada dua kelompok.

Uji *Fisher's Exact* untuk *NAS-score* pada masing-masing kelompok didapatkan perbedaan bermakna pada kelompok P.1.1 dengan P.1.2 dan kelompok P.2.1 dengan P.2.2. Dimana pada kelompok yang diberikan probiotik lebih sedikit tikus yang mengalami NASH. Pada derajat fibrosis, tidak didapatkan perbedaan bermakna di semua kelompok.

Uji multivariat yang dilakukan untuk mencari faktor yang paling berpengaruh untuk *NAS-score* dan derajat fibrosis didapatkan bahwa peningkatan *NAS-score* paling dipengaruhi oleh kadar TGF- $\beta$ , sedangkan peningkatan derajat fibrosis paling dipengaruhi oleh kadar IL-1 $\beta$  dan kadar TGF- $\beta$ .

## **Pembahasan**

### **Pengaruh Pemberian Probiotik Pada Kadar Faktor Proinflamasi Secara Umum**

Penelitian yang kami lakukan ini didapatkan hasil pada kelompok yang diberi probiotik kadar IL-1 $\beta$ , NLR, TGF- $\beta$ , TLR4, serta kadar TNF- $\alpha$  lebih rendah dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberikan probiotik, tetapi perbedaan ini secara statistik tidak bermakna. Dilihat dari kadar IL-6 didapatkan hasil yang lebih tinggi pada kelompok probiotik dibanding pada kelompok yang tidak diberikan probiotik, dengan perbedaan yang tidak bermakna pada kedua kelompok.

Perbedaan signifikan kadar imunologi pada antara kelompok yang diberikan HFHFr selama 8 minggu dengan kelompok yang diberikan HFHFr selama 8 minggu dan kemudian diberikan probiotik selama 8 minggu, hanya ditemukan pada kadar IL-1 $\beta$  (lebih tinggi pada kelompok probiotik) dan kadar NLRP3 (lebih rendah pada kelompok probiotik).

Pemberian probiotik selama 8 minggu setelah pemberian diet HFHFr selama 12 minggu mampu menurunkan kadar IL-6, NLR, TLR4, TGF- $\beta$ , dan TNF- $\alpha$  secara signifikan. Tidak didapatkan perbedaan signifikan pada parameter imunologi antara kelompok yang mendapat diet HFHFr saja selama 16 minggu dengan yang mendapat HFHFr 16 minggu ditambah probiotik selama 8 minggu.

Kelompok yang diberikan HFHFr selama 24 minggu beserta dengan kelompok yang diberikan HFHFr selama 24 minggu, kemudian pada minggu ke 25 diberikan probiotik selama 8 minggu. Hasilnya didapatkan bahwa perbedaan bermakna kadar imunologi pada kedua kelompok didapatkan pada IL-6 (lebih tinggi pada kelompok probiotik) dan TNF- $\alpha$  (lebih rendah pada kelompok probiotik)

Penelitian yang kami lakukan ini didapatkan inkonsistensi dari variabel Hasil yang konsisten terlihat pada kelompok yang diberikan HFHFr selama 12 minggu dan pada minggu ke-12 diberikan probiotik selama 8 minggu. Sedangkan pada kelompok lain didapatkan hasil yang bervariasi. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian probiotik pada saat yang tepat dapat menurunkan kadar sitokin proinflamasi.

Sebuah penelitian metaanalisis oleh Xio dkk. didapatkan hasil yang sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Zarrati dkk. yang menyatakan bahwa ekspresi TNF- $\alpha$  tidak berubah dengan pemberian probiotik. Tetapi penelitian oleh Sepideh dkk. memberikan hasil

yang bermakna. Metaanalisis oleh Gao dkk. mengindikasikan bahwa probiotik memberikan dampak positif dengan menurunkan kadar TNF- $\alpha$  pada pasien NAFLD. Sehingga Xio dkk. menyatakan bahwa tidak cukup bukti untuk mengkonfirmasi efek probiotik pada faktor-faktor inflamasi.

Lama pemberian probiotik juga dapat menjadi faktor penentu penurunan kadar faktor inflamasi. Pada penelitian oleh Duseja dkk. didapatkan bahwa penurunan kadar sitokin inflamasi menurun setelah pemberian probiotik selama 12 bulan, sedangkan pada penelitian kami probiotik hanya diberikan selama 8 minggu.

### **Pengaruh Pemberian Probiotik pada Derajat Fibrosis**

Derajat steatosis pada penelitian ini didapatkan perbedaan bermakna pada kelompok pemberian HFHFr selama 8 minggu dengan kelompok yang diberikan HFHFr selama 8 minggu dan kemudian diberikan probiotik selama 8 minggu. Perbedaan bermakna juga didapatkan pada kelompok pemberian HFHFr selama 12 minggu dengan kelompok yang diberikan HFHFr selama 12 minggu dan kemudian diberikan probiotik selama 8 minggu. Sedangkan pada kelompok pemberian HFHFr selama 16 minggu dan 24 minggu tanpa probiotik dengan kelompok yang diberikan probiotik tidak didapatkan perbedaan bermakna untuk derajat steatosis. Kondisi steatosis yang belum berlangsung lama akan memberikan perbaikan bermakna bila diberikan intervensi menggunakan probiotik, sedangkan bila steatosis sudah berlangsung lama maka pemberian probiotik tidak menunjukkan perbaikan bermakna.

Penelitian oleh Duseja dkk. disampaikan bahwa pengaruh positif dari probiotik ini dapat terjadi karena histopatologi liver subjek penelitian yang masih baik. Penelitian ini juga menyatakan bahwa strain probiotik yang digunakan dapat memberikan pengaruh pada hasil. Demikian juga dengan jumlah koloni, tipe strain dan rasio antar strain serta produk probiotik yang digunakan. Hasil ini sesuai dengan penelitian kami dimana pada steatosis yang terjadi awal (pemberian HFHFr 8 minggu dan 12 minggu) memberikan hasil yang baik dengan pemberian probiotik, sedangkan pada kondisi yang lanjut, pemberian HFHFr tidak memberikan perbaikan yang bermakna untuk kondisi steatosis hati. Dilihat dari derajat fibrosis hepar pada penelitian kami didapatkan hasil yang tidak bermakna antara kelompok yang diberikan

probiotik maupun yang tidak diberikan probiotik pada semua rentang waktu pemberian diet HFHFr.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Eslamparast T dkk. disampaikan bahwa efek positif pemberian suplementasi sinbiotik (probiotik dan prebiotik) pada fibrosis hati mulai terlihat setelah minggu ke-14 pemberian suplementasi. Hasil dari penelitian yang kami lakukan didapatkan waktu pemberian intervensi yang relatif singkat (8 minggu) mungkin memberikan pengaruh pada hasil yang tidak bermakna.

### **Simpulan**

- Suplementasi probiotik pada saat awal NASH dapat menurunkan *NAS-score*
- Suplementasi probiotik tidak berpengaruh pada derajat fibrosis
- Peningkatan *NAS-score* paling dipengaruhi oleh kadar TGF- $\beta$ , sedangkan peningkatan derajat fibrosis paling dipengaruhi oleh kadar IL-1 $\beta$  dan kadar TGF- $\beta$ .
- Pemberian HFHFr selama 12 minggu dan pemberian probiotik mulai minggu ke 13 merupakan model yang paling sesuai untuk penelitian suplementasi probiotik pada hewan coba yang diinduksi diet HFHFr
- Suplementasi probiotik *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, dan *Lactobacillus* selama 12 minggu pada tikus Sprague-Dawley jantan dewasa yang diinduksi diet *high-fat high-fructose*:
  1. Pemberian probiotik menurunkan kadar TLR4 secara bermakna
  2. Pemberian probiotik menurunkan kadar IL-1 $\beta$  tetapi tidak bermakna
  3. Pemberian probiotik menurunkan kadar IL-6 secara bermakna
  4. Pemberian probiotik menurunkan kadar TNF- $\alpha$  secara bermakna
  5. Pemberian probiotik menurunkan kadar TGF- $\beta$  secara bermakna
  6. Pemberian probiotik menurunkan kadar NLRP3 secara bermakna

## SUMMARY

### Background

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most important comorbidities of obesity in children and adolescents. The spectrum of NAFLD ranges from histopathological findings of fatty liver (steatosis) to fatty with inflammation (steatohepatitis) to liver cirrhosis and end-stage liver disease. Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) can quickly progress to liver fibrosis. It is now known that dysbiosis (microbiota imbalance) in the gut plays a role in the development of NAFLD. The microbiota influences NAFLD through several mechanisms, through the process of nutrient digestion and absorption, through its role in intestinal permeability, the immune system, and host inflammation, through choline metabolism, through bile acid metabolism, and endogenous ethanol production. Impaired intestinal permeability can lead to the entry of lipopolysaccharide (LPS) and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) which in turn will activate pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12. LPS will then bind to lipopolysaccharide-binding protein (LBP), LBP then binds to CD14. This complex will activate TLR4 in Kupffer cells. TLR4 plays an important role in the development of NASH and fat deposition. TLR4 triggers fibrosis through increased signaling of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ).

The inflammasome is another component that plays a role in NAFLD. The inflammasome itself is a multi-protein cytoplasmic complex composed of leucine-rich-repeat containing proteins and nucleotide-binding domains (NLRPs), which are sensors of PAMPs and damage-associated molecular patterns (DAMPs). It is now known that the expression of NLRP3 and its components is significantly increased in studies using rats and humans with non-alcoholic steatohepatitis as subjects. In patients with NASH, the expression of the inflammasome-related proteins (NLRP3, pro-IL-1 $\beta$ , and pro-IL-18) was significantly higher than in patients without NASH. Experiments using NLRP3 knock-out mice and experiments with pharmacological agents that inhibit NLRP3 gave improved results in hepatic Steathosis, liver inflammation, and liver fibrosis. These results suggest that NLRP3 has an important role in the incidence of NASH and may play a role in the development of targeted therapies for NASH. As with TLR4, changes in the gastrointestinal microbiota may affect the levels of NLRP3 inflammasomes. In an attempt

to determine the role of probiotics in the pathogenicity of NAFLD and to find out whether probiotics are beneficial in preventing NAFLD, this study was conducted with experimental animals with the focus being to determine the effect of probiotics on pro-inflammatory cytokine levels in experimental animals experiencing NAFLD.

### **Aim**

Proving whether probiotic supplementation improves Non-Alcoholic Fatty Liver Disease by improving inflammatory parameters and fibrogenesis in Sprague-Dawley rats induced by high-fat high-fructose (HFHFr) diet.

- Did probiotic supplementation reduce levels of TLR4, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , and NLRP3 in Sprague-Dawley rats induced by high-fat high-fructose diet.
- Does probiotic supplementation affect Non-Alcoholic Steatohepatitis (NAS) score in Sprague-Dawley rats induced by high-fat high-fructose diet.
- Whether probiotic supplementation affects the degree of fibrosis in Sprague-Dawley rats induced by the high-fat high-fructose diet

### **Methods**

This study is an in vivo experimental study with a post-test-only design approach. The subjects of this study were 63 male white rats (*Rattus norvegicus*) Sprague-Dawley strain aged 7-8 weeks with a body weight of about 110-200 grams obtained from the Experimental Animal Research Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University Surabaya. Subjects were acclimatized for 1 week. After acclimatization for 1 week the rats were randomly divided into 9 groups as follows:

- Group K- : the control group was given a standard diet for 8 weeks
- Group P.1.1 : given high-fat high-fructose (HFHFr) diet for 8 weeks
- Group P.1.2 : given HFHFr diet for 8 weeks, starting at week 9, additional probiotics were given for 8 weeks
- Group P.2.1 : given HFHFr diet for 12 weeks
- Group P.2.2 : given HFHFr diet for 12 weeks, starting at week 13 given additional probiotics for 8 weeks

- Group P.3.1 : given HFHF<sub>r</sub> diet for 16 weeks
- Group P.3.2 : given HFHF<sub>r</sub> diet for 16 weeks, starting at week 17, additional probiotics were given for 8 weeks
- Group P.4.1 : given HFHF<sub>r</sub> diet for 24 weeks
- Group P.4.2 : given HFHF<sub>r</sub> diet for 24 weeks, starting at week 25, additional probiotics were given for 8 weeks

Decapitation was carried out at the end of the dietary period in each group and then liver histopathological examination, laboratory tests of liver function, TLR4 levels, NLRP3 levels, IL-1 $\beta$  levels, IL-6 levels, TNF- $\alpha$  levels, and TGF levels were carried out. Liver tissue taken from subjects implanted in paraffin was cut at 4  $\mu$ m and stained with hematoxylin-eosin. Masson's stain was used to determine liver fibrosis. Then a score was performed to see the severity of liver steatosis, inflammation, and fibrosis. The examination of TLR4 levels, NLRP3 levels, IL-1 $\beta$  levels, IL-6 levels, TNF- $\alpha$  levels, and TGF $\beta$  levels was carried out at the Biology Unit, Faculty of Science and Technology, Airlangga University. ELISA Examination: using ELISA kit for TLR4, NLRP3, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and TGF- $\beta$ . In testing the hypothesis to see the effect of giving probiotics on the level of fibrosis, TLR4 levels, NLRP3 levels, IL-1 $\beta$  levels, IL-6 levels, TNF- $\alpha$  levels, and TGF levels were used independent t-test if the distribution was normal or using the Mann-Whitney test if not normal.

## Results

Of the 63 rats, 6 rats lost weight and 57 rats gained weight. After treatment, 20 rats had obesity, which is having body weight above 208 grams. The Mann-Whitney test in the probiotic and non-probiotic groups showed there is no significant differences. The levels of IL-6 and IL-1 $\beta$  in the K group and the P.1.1 group were not significantly different, but there were significant differences, especially in the levels of NLRP3, TLR4, TGF- $\beta$ , and TNF- $\alpha$ . Significant differences between the immunological parameters in P.1.1 and P.1.2 groups were only found in the levels of IL-1 $\beta$  (higher P.1.2 levels) and NLRP3 levels (lower P.1.2 levels). Almost all immunological parameters showed significant differences between the P.2.1 group and the P.2.2 group where the levels in the P.2.2 group were lower than P.2.1, but there was no significant difference in the levels of IL-1 $\beta$ . In P.3.1 and P.3.2 groups, no significant difference



was found in the immunological parameter variables. Immunological parameters in P.4.1 and P.4.2 groups were almost entirely increased, except for the levels of NLRP3, TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$ . Only the levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  showed a significant difference in the two groups.

Fisher's Exact test for NAS-score in each group found a significant difference in the P.1.1 group with P.1.2 and the P.2.1 group with P.2.2. Where in the group given probiotics, fewer rats experienced NASH. In the degree of fibrosis, there was no significant difference in all groups.

Multivariate test was conducted to find the most influential factor for NAS-score and degree of fibrosis. It was found that the increase in NAS-Score was most influenced by TGF- $\beta$  levels, while the increase in fibrosis degree was most influenced by IL-1 $\beta$  levels and TGF- $\beta$  levels.

## **Discussion**

### **Effect of Probiotics on Pro-Inflammatory Factor Levels in General**

From our study, the probiotics group had lower levels of IL-1 $\beta$ , NLR, TGF- $\beta$ , TLR4, and TNF- $\alpha$  levels compared to the group not given probiotics, but this difference was not statistically significant. For IL-6 levels, the results obtained were higher in the probiotic group than in the group not given probiotics, with no significant difference between the two groups.

Significant differences in immunological levels between the group given HFHF<sub>r</sub> for 8 weeks and the group given HFHF<sub>r</sub> for 8 weeks and then given probiotics for 8 weeks were only found in IL-1 $\beta$  levels (higher in the probiotic group) and NLR levels (lower in the probiotic group) Administration of probiotics for 8 weeks after HFHF<sub>r</sub> diet for 12 weeks was able to significantly reduce levels of IL-6, NLR, TLR4, TGF- $\beta$ , and TNF- $\alpha$ .

There were no significant differences in immunological parameters between the groups receiving HFHF<sub>r</sub> alone for 16 weeks and those receiving 16 weeks HFHF<sub>r</sub> plus probiotics for 8 weeks.

In the group given HFHF<sub>r</sub> for 24 weeks and in the group given HFHF<sub>r</sub> for 24 weeks and then at week 25 given probiotics for 8 weeks, it was found that a significant difference in immunological levels in the two groups was found in IL-6 (higher in the probiotic group) and TNF- $\alpha$  (lower in the probiotic group)

In our study, there were inconsistencies in the variables. Consistent results were seen in the group given HFHF<sub>r</sub> for 12 weeks and at week 12 given probiotics for 8 weeks. Meanwhile, in other groups, the results were varied. This shows that giving probiotics at the right time can reduce levels of pro-inflammatory cytokines.

In a meta-analysis by Xio et al. it was found that a study by Zarrati et al. stated that TNF-expression did not change with the administration of probiotics. However, the study by Sepideh et al. gave significant results. A meta-analysis by Gao et al. indicated that probiotics had a positive effect by reducing TNF- $\alpha$  levels in NAFLD patients. Thus Xio et al. stated that there was insufficient evidence to confirm the effect of probiotics on inflammatory factors.

The duration of probiotic administration can also be a determining factor in reducing levels of inflammatory factors. In the study by Duseja et al. it was found that the decrease in inflammatory cytokine levels decreased after 12 months of probiotic administration, whereas in our study probiotics were only given for 8 weeks.

### **The Effect of Probiotics on the Degree of Fibrosis**

The degree of steatosis in this study was found to be significantly different in the group given HFHF<sub>r</sub> for 8 weeks with the group given HFHF<sub>r</sub> for 8 weeks and then given probiotics for 8 weeks. Significant differences were also found in the group given HFHF<sub>r</sub> for 12 weeks with the group given HFHF<sub>r</sub> for 12 weeks and then given probiotics for 8 weeks. Meanwhile, in the group given HFHF<sub>r</sub> for 16 weeks and 24 weeks without probiotics with the group given probiotics, there was no significant difference in the degree of steatosis. In the condition of steatosis that has not lasted for a long time, it will provide significant improvement if an intervention using probiotics is given, whereas if the steatosis has lasted for a longtime then the administration of probiotics does not show significant improvement

In the study by Duseja et al. it was stated that the positive effect of probiotic could occur because the liver histopathology of the research subjects was still in a favorable condition. In this study, it was also stated that the probiotic strain used could influence the results. Likewise, with the number of colonies, type of strain, and the ratio between strains, probiotic products were used. These results are consistent with our study where the early onset of Steatosis (8 weeks and 12 weeks of HFHF<sub>r</sub> administration) gave good results with probiotic administration,

whereas in advanced conditions, HFHF<sub>r</sub> administration did not provide significant improvement for liver steatosis conditions. For the degree of liver fibrosis in our study, the results were not significant between the groups that were given probiotics and those who were not given probiotics in all-time spans of the HFHF<sub>r</sub> diet.

In a study by Eslamparast T et al. it was stated that the positive effect of synbiotic supplementation (probiotics and prebiotics) on liver fibrosis began to be seen after the 14th week of supplementation. In our study, the relatively short duration of administration (8 weeks) may have had a negligible effect on the results.

### **Conclusion**

- Probiotic supplementation at the beginning of NASH can lower the NAS-score
- Probiotic supplementation has no effect on the degree of fibrosis
- The increase in NAS-score was most influenced by the levels of TGF- $\alpha$ , while the increase in the degree of fibrosis was most influenced by the levels of IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$  levels.
- Administration of HFHF<sub>r</sub> for 12 weeks and administration of probiotics starting at week 13 is the most suitable model for research on probiotic supplementation in experimental animals induced by HFHF<sub>r</sub> diet.
- Supplementation of probiotics Streptococcus, Bifidobacterium, and Lactobacillus for 12 weeks in adult male Sprague-Dawley rats induced by high-fat high-fructose diet:
  1. Giving probiotics significantly reduces TLR4 levels
  2. Administration of probiotics reduced IL-1 $\beta$  levels but not significant
  3. Giving probiotics significantly reduces IL-6 levels
  4. Giving probiotics significantly reduced TNF- levels
  5. Giving probiotics significantly reduces TGF- $\beta$  levels
  6. Giving probiotics significantly reduces NLRP3 levels

## DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Halaman Persetujuan.....	ii
Halaman Pengesahan.....	iii
Lembar Persembahan.....	iv
Pernyataan Orisinalitas.....	v
Kata Pengantar.....	vi
Abstrak.....	xiii
Abstract.....	xiv
Ringkasan Penelitian.....	xv
Summary.....	xxii
Daftar Isi .....	xxviii
Daftar Tabel.....	xxxii
Daftar Gambar.....	xxxiii
Daftar Lampiran.....	xxxiii
Daftar Singkatan.....	xxxiv
Glosari.....	xxxvi
Bab I Pendahuluan.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	5
C. Orisinalitas Penelitian.....	7

D. Tujuan Penelitian.....	10
E. Manfaat penelitian.....	11
Bab II Tinjauan Pustaka.....	13
A. <i>Non Alcoholic Fatty Liver Disease</i> .....	13
B. Mikrobiota Usus.....	24
C. <i>Toll Like Receptor (TLR)</i> .....	32
D. <i>Inflammasome Nucleotide Binding Domain Like Receptors P3</i> .....	37
E. Fibrosis Hati.....	41
F. Intervensi Mikrobiota pada terapi NAFLD/NASH .....	42
G. Tikus Sprague Dawley.....	44
Bab III Kerangka Teori, Kerangka Konsep dan Hipotesis .....	47
A. Kerangka Teori.....	47
B. Kerangka Konsep .....	49
C. Hipotesis Penelitian.....	49
Bab IV Metode Penelitian.....	51
A. Desain Penelitian.....	51
B. Populasi dan Sampel.....	51
C. Variabel Penelitian .....	53
D. Teknik Pengumpulan Data.....	56
E. Alur Penelitian .....	61
F. Pengolahan dan Analisis Data.....	62
G. Tempat dan Waktu Penelitian.....	62

H. <i>Ethical Clearance</i> .....	62
Bab V Hasil Penelitian dan Pembahasan.....	63
A. Hasil Penelitian .....	63
B. Bahasan.....	81
Bab VI Simpulan dan Saran .....	102
A. Simpulan.....	102
B. Saran.....	103
Daftar Pustaka .....	104

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 1.</b>	Orisinalitas Penelitian .....	7
<b>Tabel 2.</b>	Definisi spektrum histopatologi klinis NAFLD .....	14
<b>Tabel 3.</b>	Definisi Operasional .....	54
<b>Tabel 4.</b>	Definisi Gambaran Mean Berat Badan Tikus Sebelum dan Sesudah Intervensi.	65
<b>Tabel 5.</b>	Gambaran Jumlah Tikus yang Mengalami Penurunan dan Kenaikan Berat .....	66
<b>Tabel 6.</b>	Gambaran Selisih BB pada Sampel .....	67
<b>Tabel 7.</b>	Karakteristik Laboratorium Pemeriksaan Imunologi .....	67
<b>Tabel 8.</b>	Perbedaan Parameter Imunologi antara kelompok yang diberi probiotik dan tidak diberi probiotik .....	70
<b>Tabel 9.</b>	Perbedaan Parameter Imunologi antara kelompok Kontrol dengan P.1.1 .....	71
<b>Tabel 10.</b>	Perbedaan Parameter (Imunologi) pada Kelompok P.1.1-P.1.2. ....	71
<b>Tabel 11.</b>	Perbedaan parameter (Imunologi) pada Kelompok P.2.1-P.2.2. ....	72
<b>Tabel 12.</b>	Perbedaan Parameter (Imunologi) pada Kelompok P.3.1-P.3.2. ....	73
<b>Tabel 13.</b>	Perbedaan Parameter (Imunologi) pada Kelompok P.4.1-P.4.2. ....	73
<b>Tabel 14.</b>	Hasil Uji Kappa dari Dua Pemeriksa .....	76
<b>Tabel 15.</b>	Perbedaan NAS Score antar kelompok .....	78
<b>Tabel 16.</b>	Gambaran Derajat Fibrosis dan Uji Beda Antara Kelompok Non-Probiotik dan Probiotik .....	79
<b>Tabel 17.</b>	Hasil Analisis Multivariat Parameter Imunologi dengan NAS-Score .....	79

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 1.</b>	A. <i>Fatty Liver</i> B. NASH C. NASH dengan Fibrosis D. Sirosis .....	15
<b>Gambar 2.</b>	Mekanisme akumulasi lemak dalam hati .....	17
<b>Gambar 3.</b>	<i>Second hit hypothesis</i> .....	18
<b>Gambar 4.</b>	Modifikasi <i>second hit hypothesis</i> .....	19
<b>Gambar 5.</b>	<i>Third hit hypothesis</i> .....	19
<b>Gambar 6.</b>	Patogenesis NAFLD .....	22
<b>Gambar 7.</b>	Mekanisme molekular yang terlibat dalam pembentukan dan progresifitas NAFLD .....	30
<b>Gambar 8.</b>	Aktivasi TLR4 pada <i>Liver Injury</i> .....	35
<b>Gambar 9.</b>	A. Histopatologi Liver Normal. B. Histopatologi Liver Fibrosis Pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak .....	46
<b>Gambar 10.</b>	Kerangka Teori .....	47
<b>Gambar 11.</b>	Kerangka Konsep .....	49
<b>Gambar 12.</b>	Alur Penelitian .....	61
<b>Gambar 13.</b>	<i>Consort Diagram</i> .....	64
<b>Gambar 14A.</b>	Sebaran nilai median Parameter Imunologi (IL-6, IL-1 $\beta$ ,NLRP3) .....	68
<b>Gambar 14B.</b>	Sebaran nilai median Parameter Imunologi (TLR4, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) .....	69
<b>Gambar 15.</b>	Hasil Pengamatan Histopatologis Hati pada Kelompok Kontrol .....	74
<b>Gambar 16.</b>	Hasil Pengamatan Histopatologis Hati pada Kelompok P.1.1 – P.1.2. ....	74
<b>Gambar 17.</b>	Hasil Pengamatan Histopatologis Hati pada Kelompok P.2.1 – P.2.2. ....	75
<b>Gambar 18.</b>	Hasil Pengamatan Histopatologis Hati pada Kelompok P.3.1 – P.3.2. ....	75
<b>Gambar 19.</b>	Hasil Pengamatan Histopatologis Hati pada Kelompok P.4.1 – P.4.2. ....	76
<b>Gambar 20.</b>	Derajat Steatosis antara Kelompok Non-Probiotik (A) dan Probitotik (B)....	77



## DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran I : *Ethical clearance*, informasi penelitian  
Lampiran II : Hasil penelitian laboratorium  
Lampiran III : Hasil pengolahan data dengan SPSS

## DAFTAR SINGKATAN

ASH	<i>Alcoholic Steatohepatitis</i>
AMPs	<i>Antimicrobial Peptides</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
BAL	Bakteri Asam Laktat
CDAAs	<i>Choline-Deficient Amino Acid-Defined</i>
DAMPs	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DNL	<i>De Novo Lipogenesis</i>
ECM	<i>Ekstra Cellular Matriks</i>
ER	<i>Endoplasmic Retikulum</i>
FFA	<i>Free Fatty Acid</i>
FXR	<i>Farnesoid X Receptor</i>
GALT	<i>Gut associated lymphoid tissue</i>
HFD	<i>High Fat Diet</i>
HFHF <sub>r</sub>	<i>High Fat High Fruktosa</i>
HFSD	<i>High Fat High Sucrose Diet</i>
HNE	<i>Hydroxynonenal</i>
HSC	<i>Hepatic Stellate Cells</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IR	<i>Insulin Resistance</i>
LBP	<i>Lipopolysaccharide-binding protein</i>
LPS	<i>Lipopolisakarida</i>
MALT	<i>Mucosa-Associated Lymphoid Tissue</i>

MDA	<i>Malondialdehyde</i>
MAMP	<i>Microbe Associated Molecular Patterns</i>
MCD	<i>Methionine Choline Deficient</i>
NAFLD	<i>Non-Alcoholic Fatty Liver Disease</i>
NASH	<i>Non-Alcoholic Steatohepatitis</i>
NKT	<i>Natural Killer T</i>
NLRP	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain like receptor and pyrin domain-containing</i>
OFR	<i>Oxygen Free Radicals</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SCFA	<i>Short Chain Fatty Acid</i>
SIBO	<i>Small Intestinal Bowel Overgrowth</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Science</i>
TCF	<i>Total Cellular Fluid</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll like receptors</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
UPR	<i>Unfolded Protein</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

## GLOSARI

Ad libitum	Sesuai kebutuhan, dalam penelitian ini diartikan diberikan suplai makan dan minum untuk subyek dan subyek dapat mengatur sendiri jumlah makanan dan minuman mereka.
Aklimatisasi	Upaya penyesuaian atau adaptasi hewan coba terhadap lingkungan baru yang akan ditempati.
<i>Biomarker</i>	Respon biologis dari suatu organisme terhadap bahan aktif yang disekresikan atau tekanan lingkungan dan merupakan penanda yang dapat dideteksi keberadaannya.
Biopsi	Suatu prosedur untuk mengambil sebagian kecil jaringan dari suatu organ di dalam tubuh, untuk kemudian diamati di bawah mikroskop.
Dekapitasi	Prosedur untuk mematahkan leher dari hewan coba dengan tujuan agar hewan coba mati dengan rasa sakit yang seminimal mungkin.
Fibrosis	Produksi jaringan ikat yang berlebihan pada suatu jaringan. Kondisi ini biasanya dikaitkan dengan suatu proses peradangan yang berlangsung lama.
Hepatosit	Sel-sel hepar (hati).
Hemolisis	Pecahnya sel-sel darah merah.
Histopatologi	Ilmu yang mempelajari proses terjadinya suatu penyakit melalui gambaran mikroskopis jaringan dari suatu organ.
Imunosupresif	Memiliki sifat menekan respon imun.
Inflamasi	Respon jaringan terhadap adanya benda asing yang memicu sistem imun dan ditandai dengan kemerahan, peningkatan suhu, pembengkakan, dan kadangkala rasa nyeri.
Inflamasom	Sebuah protein yang dihasilkan oleh sel-sel sistem imun alami yang dapat mengaktivasi proses inflamasi.
Insiden	Jumlah kasus baru (baru terdiagnosis) dari satu penyakit dalam satu periode waktu tertentu.

Insulin	Suatu hormon yang dihasilkan oleh pankreas yang berfungsi untuk menurunkan kadar gula darah dengan cara membantu transpor gula ke dalam sel.
Kaskade	Deretan proses yang bekerja berurutan satu setelah yang lain.
Kupffer	Sel-sel turunan makrofag yang berada di hati dan bertugas untuk melindungi hepar dari infeksi.
Mikrobiota	Kumpulan dari populasi berbagai spesies bakteri yang hidup dan berinteraksi di suatu tempat tertentu.
NAFLD	<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i> . Suatu spektrum penyakit perlemakan pada hati yang tidak disebabkan oleh konsumsi alkohol.
Permeabilitas	Kemampuan suatu membran / dinding untuk menahan transpor zat yang melewatinya; semakin rendah permeabilitas suatu membran maka semakin sulit terjadi perpindahan zat melalui membran tersebut.
Probiotik	Mikroorganisme tertentu yang bila diberikan dalam jumlah yang cukup dapat memberikan keuntungan bagi inangnya.
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> ; suatu senyawa kimia oksida yang reaktif dan dapat memicu terjadinya oksidasi senyawa lain.
Sentrifugasi	Pemusingan yang dilakukan terhadap suatu sampel cairan (pada umumnya darah) dengan kecepatan tertentu selama waktu tertentu dengan tujuan untuk mengendapkan komponen padat pada cairan tersebut.
Sitokin	Senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh sel yang berperan dalam komunikasi sel.
Steatosis	Penumpukan / deposisi lemak intrasel yang abnormal.
Trigliserida	Molekul lemak yang terdiri dari tiga rantai asam lemak yang berikatan pada gugus gliserol.
USG	Singkatan dari Ultrasonografi; suatu metode pencitraan dengan memanfaatkan pantulan gelombang ultrasonik.

Vena Porta      Pembuluh darah balik yang berasal dari saluran cerna menuju ke hati, yang nantinya akan bergabung dengan pembuluh darah balik besar.