

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Angka kejadian obesitas pada anak dan remaja dari masa ke masa semakin tinggi. Saat ini obesitas pada anak mencapai proporsi yang mengkhawatirkan di banyak negara dan merupakan tantangan masalah kesehatan yang mendesak dan serius.<sup>1</sup> Sesuai data WHO pada tahun 2014, diperkirakan 41 juta anak di bawah usia 5 tahun di dunia mengalami berat badan lebih atau obesitas.<sup>1</sup> Di Indonesia angka kejadian obesitas pada anak ada pada kisaran 11,5 %, dan angka ini diperkirakan semakin naik dari tahun ke tahun.<sup>2</sup> Peningkatan prevalensi obesitas pada anak diikuti dengan peningkatan prevalensi konsekuensi medis yang timbul karena obesitas. Salah satu komorbiditas yang penting dari obesitas pada anak dan remaja adalah *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD).<sup>3</sup> Dari penelitian Arthur didapatkan data bahwa semua anak dengan NAFLD menderita obesitas.<sup>4</sup>

*Non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) atau penyakit perlemakan hati non alkohol merupakan kumpulan gangguan yang ditandai dengan steatosis hati makrovesikuler, fibrosis, dan penyakit hati stadium akhir serta muncul pada individu tanpa adanya hubungan dengan konsumsi alkohol.<sup>5,6</sup> Spektrum kelainan NAFLD dimulai dari steatosis sederhana (tanpa inflamasi dan fibrosis), steatosis dengan inflamasi (*non-alcoholic steatohepatitis* = NASH) yang dapat disertai fibrosis maupun tanpa fibrosis dan dapat menjadi sirosis. NAFLD merupakan komponen dari suatu sindrom metabolik yang ditandai dengan obesitas, hiperinsulinemia, resistensi insulin perifer,

diabetes, hipertriglisieridemia dan hipertensi.<sup>7</sup> Faktor risiko utama NAFLD yang sudah banyak diketahui adalah berat badan lebih atau obesitas dan remaja dengan jenis kelamin laki-laki.<sup>7</sup> NAFLD merupakan salah satu penyakit hati kronis yang sering ditemukan pada populasi anak.<sup>8</sup> Pada pasien dengan NAFLD, 16% akan berkembang menjadi fibrosis dan 9,3% akan berkembang menjadi penyakit hati stadium akhir.<sup>9</sup>

Mekanisme terjadinya NAFLD sampai saat ini belum diketahui dengan pasti, meskipun beberapa bukti menunjukkan bahwa penyebab awal terjadinya NAFLD adalah keadaan abnormalitas metabolik. Pada dasarnya, NAFLD terjadi karena adanya ketidakseimbangan antara suplai dan penggunaan trigliserida dan asam lemak bebas (*free fatty acid* = FFA) di hati disertai penurunan beta-oksidasi asam lemak bebas. Keadaan ini menyebabkan peningkatan simpanan lipid dalam sitoplasma hepatosit. Faktor-faktor yang terlibat dalam proses terjadinya NAFLD diantaranya adalah obesitas, resistensi insulin, faktor genetik, dan mikrobiota saluran cerna.<sup>10</sup>

Mikrobiota saluran cerna memiliki hubungan yang erat dengan hati. Hati menerima 70% suplai darah dari usus melalui vena porta, sehingga hati merupakan organ yang paling rentan terpapar produk toksik dari bakteri usus. Adanya bukti hubungan antara terjadinya *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) dengan *overgrowth* dari bakteri dalam usus halus serta steatosis hepatic yang mengalami regresi setelah pemberian antibiotik menunjukkan hubungan kausal antara mikrobiota usus dengan NAFLD.<sup>11</sup> Mikrobiota mempengaruhi NAFLD melalui beberapa mekanisme, antara lain melalui proses digesti dan absorpsi nutrisi, melalui perannya pada permeabilitas usus, melalui sistem imunitas dan inflamasi *host*, melalui metabolisme kolin, melalui metabolisme asam empedu dan produksi etanol endogen.<sup>12</sup>

Permeabilitas usus yang terganggu dapat mengakibatkan masuknya antigen mikroba (lipopolisakarida) dan komponen membran sel mikrobiota saluran cerna (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), yang kemudian akan ditangkap oleh *toll-like receptors* (TLRs). TLRs berperan sebagai sensor imun dari *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs).<sup>13</sup> Proses selanjutnya adalah dimulainya respon imun adaptif dan sinyal kaskade yang memicu aktivasi komponen pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12. Lipopolisakarida (LPS) akan berikatan dengan *lipopolysaccharide-binding protein* (LBP), LBP kemudian berikatan dengan CD14. LPS–LBP–CD14 kompleks akan mengaktivasi TLR4, yang terdapat dalam sel Kupffer hati, dan memicu aktivasi kaskade inflamasi esensial. TLR4 berperan penting dalam terjadinya NASH dan deposisi lemak. TLR4 memicu terjadinya fibrosis hati melalui peningkatan sinyal pada *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ). Ketidakseimbangan mikrobiota dalam usus (disbiosis) berperan pada peningkatan TLR4. Pemberian probiotik diharapkan dapat memperbaiki keadaan disbiosis dan menekan TLR4, yang pada gilirannya akan menekan terjadinya fibrosis hati pada NAFLD.<sup>12</sup>

Kontributor lain pada disbiosis mikrobiota adalah inflammasom. Inflammasom adalah multiprotein sitoplasma kompleks yang disusun oleh *leucine-rich repeat-containing proteins* (LRRC) dan *nucleotide-binding domains* (NBDs), yang merupakan sensor PAMPs dan *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Aktivasi NLRP3 terjadi dalam 2 tahap. Tahap pertama adalah mediasi upregulasi komponen NLRP3, pro-interleukin-1 beta (pro-IL-1 $\beta$ ), dan pro-interleukin-18 (pro-IL-18). Tahap kedua adalah pembentukan kompleks inflammasom NLRP3. Aktivasi inflammasom NLRP3 menyebabkan maturasi caspase-1. Maturasi caspase-1 ini selanjutnya akan memecah pro-IL-1 $\beta$  dan pro-IL-18 menjadi bentuk yang matur dan berakibat sekresi bahan-bahan ini dari sel. Caspase-1 juga akan menginduksi pelepasan IL-1 $\alpha$ .<sup>14,15</sup> Saat ini

diketahui bahwa ekspresi NLRP3 dan komponennya meningkat bermakna pada penelitian yang menggunakan tikus dan manusia yang menderita NASH sebagai subyek. Percobaan dengan menggunakan NLRP3 *knock-out* tikus dan percobaan 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.<sup>14,16</sup> Pada NASH, ekspresi dari protein yang berhubungan dengan inflammasom NLRP3 (NLRP3, pro-IL-1 $\beta$ , dan pro-IL-18) secara signifikan lebih tinggi. Seperti halnya TLR4, perubahan pada mikrobiota saluran cerna dapat mempengaruhi kadar inflammasom NLRP3.<sup>17</sup>

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.<sup>18</sup> Prognosis NAFLD sangat tergantung pada tingkat keparahan hati secara histopatologi. Bukti terbaru mengatakan bahwa munculnya dan tingkat keparahan fibrosis dapat menjadi faktor penting dalam mendeteksi prognosis dan risiko progresifitas ke arah sirosis pada pasien dengan NAFLD. Biopsi hati merupakan standar dalam menentukan tingkat fibrosis hati namun demikian prosedur ini merupakan prosedur invasif yang kurang nyaman dan berisiko pada penderita, apalagi pada anak.<sup>19</sup> Oleh karena itu dalam menilai berbagai faktor yang mempengaruhi terjadinya fibrosis beberapa peneliti menggunakan hewan coba. Dari berbagai penelitian dengan hewan coba untuk NAFLD diketahui bahwa tikus Sprague-Dawley yang mendapatkan diet tinggi lemak dan tinggi fruktosa merupakan hewan coba yang ideal untuk mengetahui proses fibrosis pada NAFLD.<sup>20</sup>

Sebagai usaha untuk mengetahui peran probiotik dalam patogenitas NAFLD dan untuk selanjutnya agar dapat mengetahui apakah probiotik bermanfaat pada pencegahan progresifitas NAFLD maka dilakukan penelitian dengan hewan coba yang fokusnya adalah untuk mengetahui pengaruh probiotik pada kadar sitokin proinflamasi hewan coba yang mengalami NAFLD. Penelitian terdahulu oleh Zheng-Jie Xu, mengatakan bahwa steatosis tingkat lanjut didapatkan setelah tikus Sprague-Dawley mendapatkan diet *high-fat diet* (HFD) selama 8 minggu. Inflamasi hati lebih berat dengan inflamasi lobular yang parah disertai nekrosis fokal didapatkan setelah pemberian diet HFD selama 12 minggu. Penelitian ini juga mendapatkan bahwa pemberian HFD selama 16 minggu mengakibatkan peningkatan keparahan derajat steatosis hepatic dan inflamasi lobular disertai dengan inflamasi portal, dan pada minggu ke 24 mulai terjadi fibrosis perisinusoid pada zona 3 hati yang semakin memberat mulai minggu ke 36 dan 48.<sup>21</sup> Sedangkan penelitian terdahulu oleh Lieber dkk. mendapatkan bahwa pemberian HFD selama 3 minggu pada tikus Sprague-Dawley meningkatkan steatosis hati, inflamasi hati dan abnormalitas mitokondria.<sup>22</sup>

## **B. Perumusan Masalah**

Dalam latar belakang dijumpai masalah-masalah :

- NAFLD merupakan salah satu bentuk tersering dari penyakit hati kronis.
- Penderita NAFLD 16% akan berkembang menjadi fibrosis, dan 9,3% akan berkembang menjadi penyakit hati stadium akhir.
- Induksi diet *high-fat high-fructose* mengakibatkan NAFLD.

- Didapatkan hubungan yang kuat antara mikrobiota usus dan hati, termasuk dalam kaitannya dengan NAFLD.
- Permeabilitas usus dapat meningkat karena disbiosis dan selanjutnya dapat mengakibatkan inflamasi hati.
- Dalam proses inflamasi pada NAFLD faktor yang berperan diantaranya adalah TLR4, LPS, IL-6, TNF- $\alpha$ , dan NLRP3.
- TLR4, NLRP3, IL-1 $\beta$ , dan TGF- $\beta$  berperan pada terjadinya fibrosis pada NAFLD.
- Pemberian probiotik diharapkan dapat memperbaiki disbiosis, menekan TLR4, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  dan NLRP3 pada penderita NAFLD yang pada gilirannya dapat menekan fibrosis.

Berdasarkan permasalahan tersebut di atas disusun rumusan masalah sebagai berikut :

## **1. Umum**

Apakah suplementasi probiotik memperbaiki *non-alcoholic fatty liver disease* melalui perbaikan parameter inflamasi dan fibrogenesis pada tikus Sprague-Dawley yang diinduksi oleh diet *high-fat high-fructose*.

## **2. 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* (NASH) *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*.

### C. Orisinalitas Penelitian

Beberapa penelitian yang mendasari dilakukannya penelitian ini :

**Tabel 1. Orisinalitas Penelitian**

No.	Jurnal	Desain, subyek dan variabel-variable	Hasil
1.	Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis Yan-Yan Ma, Lin Li, Chao-Hui Yu, Zhe Shen, Li-Hua Chen, You-Ming Li World Journal Gastroenterology. 2013; 19(40):6911-18	Meta analisis, NAFLD, Probiotik, Transaminase, kolesterol, TNF- $\alpha$	Probiotic therapies can reduce liver aminotransferases, total cholesterol, TNF- $\alpha$ and improve insulin resistance in NAFLD patients. Modulation of the gut microbiota represents a new treatment for NAFLD
2.	Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial Aller R, De Luis DA, Izaola O, Conde R, Gonzalez Sagrado M, Primo D, De La Fuente B, Gonzalez J Eur Rev Med Pharmacol Sci 2011;15(9):1090-5	Double blind randomized clinical trial, NAFLD, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, gamma glutamyl transferase Subyek 30 pasien dewasa	A tablet of 500 million of Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus, with a randomized clinical design, improved liver aminotransferases levels in patients with NAFLD

No.	Jurnal	Desain, subyek dan variabel-variable	Hasil
3.	Effects of Lactobacillus rhamnosus Strain GG in Pediatric Obesity-related Liver Disease Pietro Vajro, Claudia Mandato, Maria Rosaria Licenziati, Adriana Franzese, Dino Franco Vitale, Selvaggia Lenta, Maria Caropreso, Gianfranco Vallone, Rosaria Meli. JPGN 2011;52:740-743.	Double blind randomized control trial, NAFLD, Lactobacillus GG, Alanine aminotransferase Subyek 20 anak obesitas	Shortcourse of probiotic treatment significantly improved ALT values, which in most cases became normal, and that this effect was independent of weight changes.
4.	Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharides in patients with non alcoholic steatohepatitis Malaguarnera M, Vacante M, Antic T, Giordano M, Chisari G, Acquaviva R, Mastrojeni S, Mistretta A, Li Volti G, Galvano F. Dig Dis Sci 2012; 57: 545-553	Double blind randomized control trial, NASH Bifidobacterium longum + Fos vs placebo . AST, LDL cholesterol, CRP, TNF- $\alpha$ , HOMA-IR, serum endotoxin, steatosis, NASH activity index Subyek 66 pasien dewasa	Bifidobacterium longum with FOS and lifestyle modification, when compared to lifestyle modification alone, significantly reduces TNF- $\alpha$ , CRP, serum AST levels, HOMA-IR, serum endotoxin, steatosis, and the NASH activity index.
5.	Treatment of non-alcoholic steatohepatitis with probiotics Wong VW, Won GL, Chim AM, Chu WC, Yeung DK, Li KC, Chan HL. Annals of Hepato-logy 2013;12(2):256-262	Double blind control trial, NASH, Lepicol probiotic and prebiotic formula (Lactobacillus plantarum, Lactobacillus deslbrueckii, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium bifidum), transaminase Subyek 20 pasien dewasa	The primary endpoint was change in intrahepatic triglyceride content (IHTG), as measured by proton-magnetic resonance spectroscopy, from baseline to month 6. Probiotics treatment may reduce liver fat and AST level in NASH patients.



No.	Jurnal	Desain, subyek dan variabel-variable	Hasil
6.	Lactobacillus Rhamnosus GG reduces hepatic fibrosis in a model of chronic liver disease in rats Hammes TO, Leke R, Escobar TDC, Fracasso LB, Meyer FS, Andrades ME, Silveira TR. Nutr Hosp 2017; 34(3): 702-709	Post-test only control group design. Lactobacillus rhamnosus GG, liver fibrosis, IL-6, TLR4, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , metalloproteinase-2 and -9 Subyek 29 tikus wistar	The treatment with the probiotic LGG was able to reduce liver fibrosis, ductular reaction, and hepatic gene expression of IL-6 in a model of cholestatic liver disease in rats.
7.	An Update on the Efficacy and Functionality of Probiotics for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Mingfei Yao, Lingling Q, Yanmeng Lu, Baohong Wang, Björn Berglund, Lanjuan Li Engineering 7 (2021) 679–686	Review article	Gut microbiota have been shown to be an important factor in NAFLD patho-genesis. Modulation of the gut microbiota has been reported in many studies, and the efficacy of probiotics as a therapy for NAFLD has been demonstrated. NGPs (e.g., <i>A. muciniphila</i> ) have shown great therapeutic potential for the treatment of NAFLD.

Orisinalitas penelitian ini adalah :

Belum ada penelitian yang mempelajari peran probiotik dalam memperbaiki *non-alcoholic fatty liver disease* melalui perbaikan parameter inflamasi dan fibrogenesis pada tikus Sprague-Dawley yang diinduksi oleh diet *high-fat high-fructose*. Belum ada penelitian yang mempelajari tentang peran probiotik dalam 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*. Belum ada penelitian yang mempelajari tentang peran probiotik pada *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) score pada tikus Sprague-Dawley yang diinduksi oleh diet *high-fat high-fructose*. Belum ada penelitian yang

mempelajari tentang peran probiotik pada derajat fibrosis pada tikus Sprague-Dawley yang diinduksi oleh diet *high-fat high-fructose*.

## **D. Tujuan Penelitian**

### **1. Tujuan Umum :**

- Membuktikan adanya pengaruh suplementasi probiotik terhadap *non-alcoholic fatty liver disease* melalui perbaikan parameter inflamasi dan fibrogenesis pada tikus Sprague-Dawley yang diinduksi oleh diet *high-fat high-fructose*.

### **2. Tujuan Khusus :**

1. Membuktikan pengaruh suplementasi probiotik pada penurunan 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*.
2. Membuktikan pengaruh probiotik pada *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) *score* tikus Sprague-Dawley yang diinduksi oleh diet *high-fat high-fructose*.
3. Membuktikan pengaruh probiotik pada derajat fibrosis tikus Sprague-Dawley yang diinduksi oleh diet *high-fat high-fructose*.

## **E. Manfaat Penelitian**

### **1. Manfaat bagi ilmu :**

- Memberikan tambahan pengetahuan tentang pengaruh suplementasi probiotik terhadap perbaikan parameter inflamasi dan fibrogenesis pada *non-alcoholic fatty liver disease*
- Memberikan tambahan pengetahuan tentang pengaruh suplementasi probiotik pada penurunan kadar TLR4, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , dan NLRP3
- Memberikan tambahan pengetahuan tentang pengaruh suplementasi probiotik terhadap *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) *score*
- Memberikan tambahan pengetahuan tentang pengaruh suplementasi probiotik terhadap derajat fibrosis
- Memberikan tambahan pengetahuan tentang pengaruh pemberian probiotik pada pencegahan NASH dan fibrosis penderita NAFLD
- Memberikan tambahan pengetahuan/wacana sebelum dilakukan uji klinis pada manusia tentang manfaat pemberian probiotik terhadap NASH *score* dan derajat fibrosis pada NAFLD.

### **2. Manfaat bagi penelitian :**

Bila suplementasi probiotik pada penelitian ini terbukti bermanfaat, maka selanjutnya dapat menjadi dasar penelitian untuk menentukan terapi tambahan pada penderita NAFLD.

### **3. Manfaat bagi masyarakat:**

Bila suplementasi probiotik terbukti bermanfaat mengurangi progresifitas terjadinya NASH dan fibrosis pada NAFLD, maka dapat menambah pengetahuan masyarakat tentang salah satu cara mengurangi progresifitas terjadinya NASH dan fibrosis pada NAFLD.