

## Gambaran Histologi *Intestinum Tenue* Kelinci Model Aterosklerosis

### *Histological Overview of Intestinum Tenue Rabbit Atherosclerosis Model Histological*

Vista Budiariati<sup>1\*</sup>, Ariana<sup>1</sup>, Teguh Budipitojo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,  
Yogyakarta, Indonesia, 55281

\*Email: [vista.budiariati@ugm.ac.id](mailto:vista.budiariati@ugm.ac.id)

Naskah diterima: 26 Januari 2023, direvisi: 4 Maret 2023, disetujui: 5 Juni 2023

#### Abstract

Atherosclerosis is a vascular disease that occurs as a result of a progressive inflammatory response in the blood vessels due to the buildup of fat, cholesterol and other components in the lumen and on the artery walls. This study was conducted to analyze the histology of the intestines of rabbits and to determine the profile of blood lipids after induction of atherosclerosis. The atherosclerosis induction method was carried out by modifying the high-fat diet. Twelve male New Zealand White rabbits weighing 2-3 kilograms were randomly divided into two groups: group A which was fed standard feed and group B which was given high-fat diet for 30 days. Blood samples were taken before and after treatment and analyzed for blood lipid profile, low density lipoprotein (LDL), and high-density lipoprotein (HDL). *Intestinum tenue* was processed into histological preparations with Hematoxylin-Eosin staining, then analyzed for morphometrics. The results of this study indicate that the administration of high-fat diet causes an increase in cholesterol and LDL levels in the blood after 4 weeks. The results of area morphometry in the small intestine showed that the duodenal submucosa in group B was wider than group A, while the length of jejunal villi in group B was shorter than group A. Changes in the intestine were also followed by changes in the cell population. The number of goblet cells in the duodenum was less in group B compared to group A, but the number of goblet cells in the jejunum was actually higher in group B than group A. This study showed that inducing atherosclerosis in rabbits with a high-fat diet modification could increase cholesterol and LDL in the blood but also causes changes in the cell population in the small intestine. Further research is needed to determine the mechanism that causes these changes so that it can support the modeling of atherosclerosis in rabbits according to the pathophysiology and pathogenesis of the disease that occurs in humans.

**Keywords:** atherosclerosis; high-fat diet; histology; rabbit; small intestine

#### Abstrak

Aterosklerosis adalah salah satu penyakit vaskuler yang terjadi akibat adanya respon peradangan pada pembuluh darah yang progresif akibat adanya penumpukan lemak, kolesterol, dan komponen lain di lumen dan di dinding arteri. Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis histologi *intestinum tenue* kelinci model aterosklerosis dan mengetahui profil lemak darah setelah induksi aterosklerosis. Metode induksi aterosklerosis dilakukan dengan memodifikasi pemberian pakan tinggi lemak. Dua belas ekor kelinci *New Zealand White* jantan dengan berat badan 2-3 kilogram dibagi secara acak menjadi dua kelompok yaitu kelompok A yang diberi pakan standar dan kelompok B yang diberi pakan tinggi lemak selama 30 hari. Sampel darah diambil sebelum dan sesudah perlakuan dan dianalisis profil lemak darah, *low density lipoprotein* (LDL), dan *high density lipoprotein* (HDL). *Intestinum tenue* diproses menjadi preparat histologi dengan pewarnaan *Hematoxylin-Eosin*, kemudian dianalisis morfometri. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian pakan tinggi lemak menyebabkan peningkatan kolesterol dan kadar LDL dalam darah setelah 4 minggu pemberian. Hasil morfometri area pada *intestinum tenue* menunjukkan bahwa tunika submukosa duodenum kelompok B lebih

lebar dibanding kelompok A sedangkan panjang villi jejunum kelompok B lebih pendek dibandingkan dengan kelompok A. Perubahan pada usus juga diikuti dengan perubahan populasi sel. Perhitungan jumlah sel goblet pada duodenum lebih sedikit pada kelompok B dibandingkan dengan kelompok A, akan tetapi jumlah sel goblet di jejunum justru lebih banyak di kelompok B dibanding kelompok A. Penelitian ini menunjukkan bahwa induksi aterosklerosis pada kelinci dengan modifikasi pakan tinggi lemak mampu meningkatkan kolesterol dan LDL dalam darah tetapi juga menyebabkan perubahan populasi sel pada usus halus. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui mekanisme yang menjadi penyebab perubahan ini sehingga dapat mendukung pemodelan aterosklerosis pada kelinci sesuai dengan patofisiologi dan patogenesis penyakit yang terjadi pada manusia.

**Kata kunci:** aterosklerosis; histologi; kelinci; pakan tinggi lemak; usus halus

## Pendahuluan

Aterosklerosis adalah salah satu penyakit vaskuler yang terjadi akibat adanya respon peradangan pada pembuluh darah yang progresif. Perubahan pada pembuluh darah ini melibatkan lipid, komponen dinding vaskular, sistem imun dan thrombosis. Tiga faktor utama yang menyebabkan aterosklerosis diantaranya karena stress oksidatif, hipertensi dan hiperkolesterolemia (Meidayanti, 2021).

Hiperkolesterolemia atau peningkatan kolesterol yang tidak normal dalam darah mengakibatkan akumulasi kolesterol pada dinding pembuluh darah. Akumulasi ini menginisiasi terbentuknya sumbatan berupa atheroma atau plak di tunika intima (Nordestgaard *et al.* 2013). Plak yang terbentuk di pembuluh darah dapat mengeras dan mempersempit lumen sehingga mengurangi aliran darah ke otot jantung.

Pemodelan aterosklerosis saat ini masih terus dipelajari. Salah satu hewan yang umum digunakan dalam pemodelan tersebut adalah kelinci (Yanni, 2004). Pendekatan yang telah dilakukan untuk pemodelan aterosklerosis diantaranya pada kelinci Watanabe yang genetiknya dimodifikasi sehingga secara alami mengalami hiperlipidemia hereditas dan menunjukkan gangguan pada reseptor LDL (Shiomi dan Ito, 2009). Pendekatan lain yang lebih mudah yaitu dengan menggunakan kelinci jenis *New Zealand White* yang diberi pakan tinggi kolesterol dalam jangka waktu tertentu (Lee *et al.* 2017). Metode tersebut dilaporkan merupakan salah satu metode tercepat untuk menginduksi aterosklerosis. Hal ini terkait dengan sensitivitas terhadap kelebihan kolesterol (Baumgartner *et al.* 2016).

Metode induksi aterosklerosis dengan memodifikasi pemberian pakan tinggi lemak dapat memengaruhi proses penyerapan nutrisi pada usus halus. Ramalho *et al.* (2017) melaporkan bahwa terjadi gangguan metabolik pada tikus yang tidak resisten terhadap insulin. Nutrisi yang dikonsumsi oleh hewan dapat berperan signifikan pada perkembangan dan fungsionalitas dari organ gastrointestinal. Komposisi pakan, zat tambahan, dan komponen nutrisi dapat berdampak pada sistem digesti termasuk sistem imun dan mikrobiota (Celia *et al.* 2017; Ermayanti *et al.* 2021).

Analisis histologi terhadap organ digesti pada pemodelan aterosklerosis dengan metode pemberian pakan tinggi lemak diperlukan untuk memahami perubahan lain pada organ dan sistem organ yang mungkin terjadi selain dari pembentukan plak di pembuluh darah. Penelitian terhadap organ digesti kelinci pada pemodelan aterosklerosis ini diawali dengan studi histologi *intestinum tenue* yang mendukung absorpsi makanan pada sistem digesti kelinci.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait histologi *intestinum tenue* kelinci model aterosklerosis yang diberi pakan tinggi lemak. Hasil dari penelitian ini dapat digunakan untuk mengetahui perubahan pada organ digesti dalam hal ini *intestinum tenue* kelinci yang diinduksi aterosklerosis dengan metode modifikasi pakan tinggi lemak.

## Materi dan Metode

### Perlakuan Induksi Aterosklerosis dengan Modifikasi Pemberian Pakan Tinggi Lemak

Metode Penelitian ini telah mendapat persetujuan kelayakan etik dari Komisi

Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada No.00131/EC-FKH/Int./2021. Dua belas ekor kelinci *New Zealand White (Oryctolagus cuniculus)* jantan dengan berat badan 2-3 kilogram dibagi secara acak menjadi dua kelompok yaitu kelompok perlakuan yang diberi pakan pakan standar (kelompok A) dan pakan tinggi lemak (kelompok B). Pakan tinggi lemak yang digunakan memiliki kandungan lemak kasar 12,52% (iRAtco®). Perlakuan modifikasi pakan dilakukan selama 30 hari. Kelinci ditimbang dan diaklimatisasi selama tiga sampai lima hari dengan pemberian pakan standar (pelet) dan air minum secara *ad libitum*. Pengambilan sampel darah untuk mengetahui profil lemak darah, *Low Density Lipoprotein* (LDL), dan *High Density Lipoprotein* (HDL) dilakukan sebelum dan sesudah perlakuan. Organ usus halus dikoleksi untuk dilakukan analisa kristologi.

### Koleksi Sampel Organ

Kelinci dieuthanasi dengan anestesi dosis letal (ketamin 50 mg/kg BB; xylazin 10 mg/kg BB. Organ digesti dipreparir, dibersihkan dalam NaCl fisiologis, dibilas beberapa kali dalam larutan fisiologis kemudian difiksasi dalam larutan *neutral buffered formalin* 10%.

### Histologi *Intestinum Tenue*

Bagian usus halus yang terdiri dari duodenum, jejunum, dan ileum diproses histoteknik dengan metode paraffin (Elnasharty *et al.* 2013). Jaringan yang telah difiksasi dilakukan pemrosesan yang meliputi dehidrasi, *clearing*, dan *embedding* untuk kemudian dipotong dengan ketebalan 3-7 $\mu$ m. Preparat diwarnai dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin* (HE)

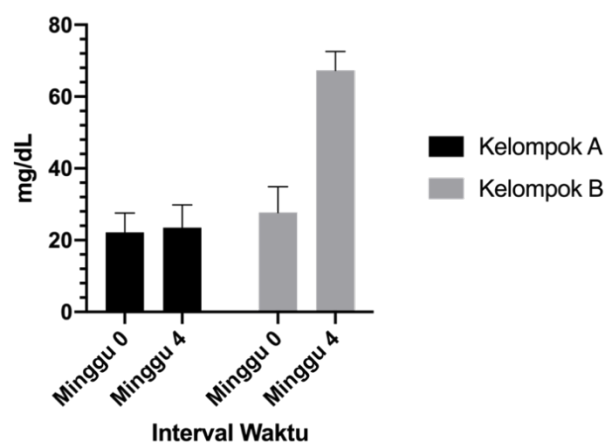
### Hasil dan Pembahasan

Aterosklerosis adalah salah satu penyakit vaskuler yang terjadi akibat adanya respon peradangan pada pembuluh darah yang progresif. Hiperkolesterolemia atau peningkatan kolesterol yang tidak normal dalam darah mengakibatkan akumulasi kolesterol pada dinding pembuluh darah. Akumulasi ini menginisiasi terbentuknya sumbatan berupa atheroma atau plak di tunika intima. Plak yang terbentuk di pembuluh darah

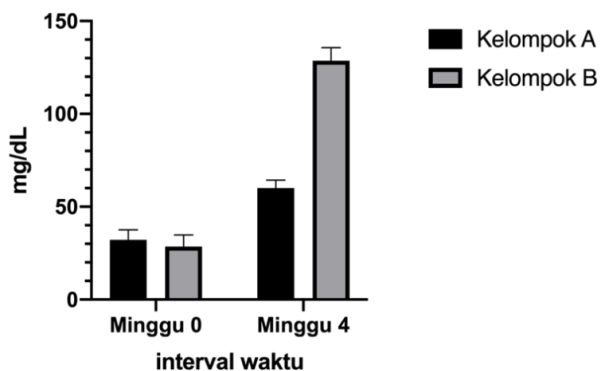
dapat mengeras dan mempersempit lumen, sehingga mengurangi aliran darah ke otot jantung.

Penelitian ini dilakukan untuk memodelkan kondisi aterosklerosis pada kelinci yang dapat digunakan untuk riset terkait dengan penyakit vaskuler. Diet aterogenik diberikan dalam kurun waktu 4 minggu. Fan *et al.* (2015), merangkum beberapa metode pemodelan aterosklerosis pada kelinci, salah satunya yaitu dengan pemberian pakan tinggi kolesterol. Metode ini dilaporkan efektif karena kelinci memiliki sensitivitas terhadap diet kolesterol dan dapat dengan cepat mengalami hiperkolesterolemia yang melanjut menjadi lesi aterosklerosis pada aorta. Hal senada dilaporkan oleh Baumgartner *et al.* (2016), yang menyatakan metode induksi melalui pemberian pakan tinggi kolesterol merupakan salah satu metode tercepat untuk menginduksi aterosklerosis terkait dengan sensitivitas kelinci terhadap kelebihan kolesterol. Pakan yang diberikan merupakan pakan dengan kandungan lemak kasar 12,52% sedangkan kandungan lemak pada pakan standar (kelompok kontrol) yaitu 5%.

Penambahan pakan pada penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan kolesterol dan kadar LDL dalam darah setelah 4 minggu pemberian pakan tinggi lemak. Kadar total kolesterol pada kelompok B meningkat secara signifikan pada minggu ke-4 ( $126,63 \pm 7,02$  mg/dL) dibandingkan dengan kelompok A yang tetap berada pada batas normal ( $60,10 \pm 4,19$  mg/dL) sebagaimana ditampilkan pada Gambar 1, dengan nilai rujukan normal total kolesterol kelinci yaitu 35,0-60,0 mg/dL (Hrapkiewicz



Gambar 1. Profil Total Kolesterol Darah pada minggu ke-0 dan minggu ke-4 perlakuan kelompok A dan kelompok B.



Gambar 2. Profil *Low Density Lipoprotein* (LDL) pada minggu ke-0 dan minggu ke-4 perlakuan kelompok A dan kelompok B.

et al. 2013). Secara spesifik, peningkatan kolesterol yaitu jenis *low density lipoprotein* (LDL) pada minggu ke-4 setelah pemberian diet aterogenik yaitu mencapai  $67,3 \pm 5,25$  mg/dL berbeda signifikan dengan kelompok A dengan kadar LDL  $23,5 \pm 6,36$  mg/dL (Gambar 2). Kolesterol jenis LDL inilah yang memiliki kecenderungan lebih mudah menempel pada pembuluh darah yang semakin lama mengeras dan membentuk plak serta menyebabkan penyumbatan pembuluh darah yang dikenal dengan aterosklerosis. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian diet aterogenik dapat menghasilkan kondisi hiperkolesterolemia yang dapat melanjut menjadi aterosklerosis.

Metode induksi aterosklerosis dengan memodifikasi pemberian pakan tinggi lemak dilaporkan dapat memengaruhi proses penyerapan nutrisi pada usus halus. Ramalho et al. (2017) melaporkan bahwa terjadi gangguan metabolik pada tikus yang tidak resisten terhadap insulin. Nutrisi yang dikonsumsi oleh hewan dapat berperan signifikan pada perkembangan dan fungsionalitas dari organ gastrointestinal. Komposisi pakan, zat tambahan, dan komponen

nutrisi dapat berdampak pada sistem digesti termasuk sistem imun dan mikrobiota (Celia et al. 2017).

Berdasarkan hasil pengamatan histologi dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin*, tidak ada perbedaan signifikan struktur histologi duodenum antara kelompok A (pemberian pakan standar) dan kelompok B (pemberian diet aterogenik). Mukosa duodenum teramati memiliki vili berbentuk daun ramping dengan epitel kolumnar berstriata. Kelenjar mukosa (*kript Lieberkuhn*) di lamina propria diantara villi berbentuk tubuler bercabang dilapisi dengan epitel kuboid-kolumnar pendek. Tunika submukosa terdiri dari serat kolagen dan retikuler, jaringan ikat dengan kelenjar *Brunner*. Tunika muskularis terdiri dari lapisan otot polos longitudinal luar yang melingkar dan tipis. Perubahan histologi yang menciri tidak ditemukan pada jejunum dan ileum, oleh karena itu kemudian dilakukan pengukuran morfometri dengan beberapa parameter terkait dengan panjang villi, tunika sub mukosa dan identifikasi keberadaan sel goblet pada tiap bagian usus halus (Tabel 1).

Hasil morfometri pada area *intestinum tenue*, panjang villi jejunum kelompok B lebih pendek dibanding dengan kelompok A, tunika submukosa duodenum kelompok B lebih lebar dibanding kelompok A (Tabel 1). Perubahan ini menunjukkan adaptasi terkait dengan daya cerna dan konsistensi diet aterogenik atau peningkatan retensi makanan di duodenum dan jejunum proksimal yang disebabkan oleh penurunan motilitas di segmen ini (Soares et al. 2015).

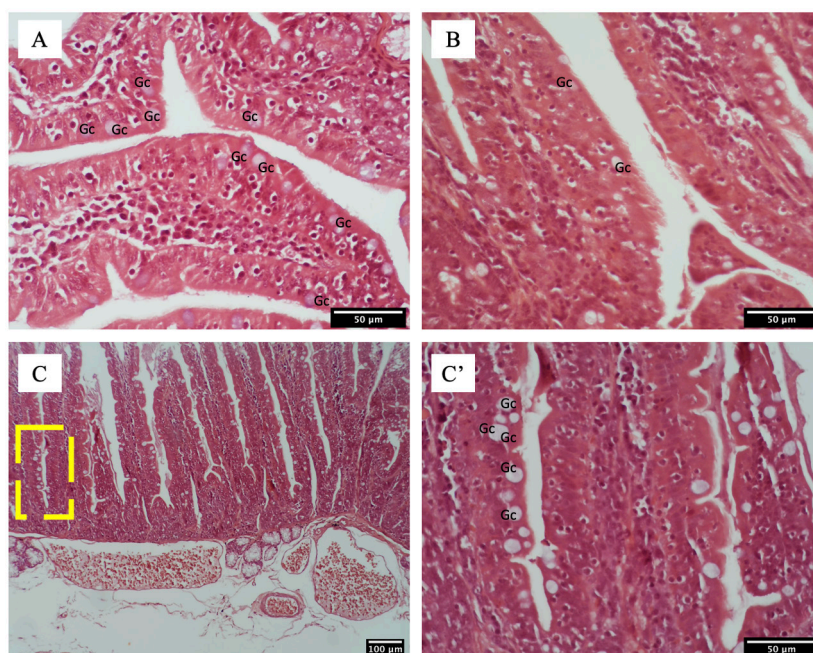
Perubahan pada usus juga diikuti dengan perubahan populasi sel. Perhitungan jumlah sel goblet pada duodenum lebih sedikit pada

Tabel 1. Morfometri Area pada *Intestinum Tenue* Kelinci kelompok A dan Kelompok B

<i>Intestinum tenue</i>	Kelompok	Panjang villi ( $\mu\text{m}$ )	Tunika sub Mukosa ( $\mu\text{m}$ )	Sel Goblet/ 10000 $\mu\text{m}^2$
				Epitelium mukosa
Duodenum	A	$610,50 \pm 14,48^a$	$150,13 \pm 18,05^a$	$6,00 \pm 0,40^a$
	B	$650,28 \pm 40,15^a$	$220,32 \pm 3,92^b$	$4,45 \pm 0,33^b$
Jejunum	A	$520,01 \pm 33,00^a$	$26,75 \pm 10,27^a$	$3,00 \pm 2,20^a$
	B	$477,55 \pm 12,00^b$	$22,16 \pm 8,05^a$	$7,25 \pm 0,24^b$
Ileum	A	$565,05 \pm 15,22^a$	$49,11 \pm 5,84^a$	$10,50 \pm 2,10^a$
	B	$544,11 \pm 32,29^a$	$38,56 \pm 3,37^b$	$11,00 \pm 1,00^a$

\*huruf superscript berbeda dalam kolom menunjukkan perbedaan signifikan,  $P < 0.05$





Gambar 3. Populasi sel goblet pada vili duodenum kelompok A lebih banyak dan dominan (Gambar A) dibanding dengan populasi sel goblet pada villi kelompok (Gambar B); Peningkatan dan dominasi jumlah sel goblet pada area villi (area bertanda kuning) jejunum kelompok B (Gambar C; Perbesaran kuat gambar C'); Gc: *Goblet cells*.

kelompok B dibandingkan dengan kelompok A, akan tetapi jumlah sel goblet di jejunum justru lebih banyak di kelompok B dibanding kelompok A (Gambar 3). Adanya perbedaan kuantitas jumlah sel goblet berkaitan dengan produksi mukus dan barrier sebagai bentuk adaptasi seluler maupun sebagai respon imunitas terhadap perubahan jenis pakan (Ranjan dan Dan, 2020). Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui mekanisme yang menjadi penyebab perubahan ini, sehingga dapat mendukung optimalitas hewan model sesuai dengan patofisiologi dan patogenesis penyakit yang terjadi pada manusia.

### Kesimpulan

Struktur histologi *intestinum tenue* dan hasil morfometri area pada kelompok kontrol yang diberi pakan standar dan kelompok perlakuan yang diberi diet aterogenik secara umum tidak menunjukkan adanya perbedaan signifikan. Perbedaan secara histologi tampak pada perubahan dominasi dan kuantitas sel goblet pada duodenum jejunum kelompok perlakuan sebagai bentuk adaptasi terhadap perubahan komposisi pakan. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui mekanisme yang menjadi penyebab perubahan ini sehingga dapat mendukung pemodelan aterosklerosis

pada kelinci sesuai dengan patofisiologi dan patogenesis penyakit yang terjadi pada manusia.

### Daftar Pustaka

- Baumgartner, C., Brandl, J., Münch, G., Ungerer, M. (2016). Rabbit models to study atherosclerosis and its complications – Transgenic vascular protein expression in vivo. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. Jul;121(2): 131-141.
- Celia, P., Cowiesonb, F., Fru-Njib, R.E., Steinertc, A.M., Kluenterb, V., Verlhacd. (2017). Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: New opportunities for sustainable animal production. *Animal Feed Science and Technology*. 234: 88–100.
- Elnasharty, M.A., Abou-Ghanema, I.I., Sayed-Ahmed, A., Abo Elnour. (2013). Mucosal- Submucosal Changes in Rabbit Duodenum during Development. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. 76: 500-508.
- Ermayanti, N.G.A.M., 1, Suarni, N.M.R., Widhyastini, I.G.A.M. (2019). Effect of Cod Liver Oil Supplementation in Feed on the Haematological Values

- and Concentration of Epididymis Spermatozoa of Local Rabbits. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 709 012057.
- Fan, J., Kitajima, S., Watanabe, T., Xu, J., Zhang, J., Liu, E., Chen, YE. (2015). Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacol Ther.* Feb;146: 104-119.
- Hrapkiewicz, K., Colby, L., dan Denison, P. (2013). *Clinical Laboratory Animal Medicine: An introduction 6th.* Hoboken: Willey-Blackwell.
- Lee, Y.T., Laxton, V., Lin, H.Y., Chan, Y.W., FitzgeraldSmith, S., To, T., Tse, G. (2017). Animal models of atherosclerosis (Review). *Biomedical Reports.* 6: 259-266.
- Meidayanti, D. (2021). Manfaat Likopen dalam Tomat sebagai Pencegahan Terhadap Timbulnya Aterosklerosis. *Jurnal Medika Hutama.* 2(3): 906-910.
- Nordestgaard, B.G., Chapman, M.J., Humphries, S.E., Ginsberg, H.N., Masana, L., Descamps, O.S., Wiklund, O., Hegele, R.A., Raal, F.J., Defesche, J.C. (2013). European Atherosclerosis Society Consensus Panel: Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J.* 34:3478–3490a.
- Ramalho, J., Antunes., Hidalgo. (2017). Metabolic disturbances due to a high-fat diet in a non-insulinresistant animal model. *Nutrition & Diabetes.* 7: e245.
- Ranjan, R. and Das P. (2020). Gross, Histological, dan Morphometrical Studies on The Small Intestine. *Haryana Vet.* 59(1): 75-79.
- Shiomi, M., and Ito, T. (2009). The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: a tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe. *Atheroscler.* 207: 1–7.
- Soares, A., Beraldi, E.J., Ferreira, P.E.B., Bazotte, R.B., Buttow, NC. (2015). Intestinal and neuronal myenteric adaptations in the small intestine induced by a high-fat diet in mice. *BMC Gastroenterol.* 15(3): 1-9.
- Yanni, A.E. (2004). The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research Laboratory Animals Ltd. *Laboratory Animals.* 38: 246–256.