



**EFEK FLUVASTATIN TERHADAP ALKALI FOSFATASE
SERUM PADA TIKUS WISTAR YANG TERPAPAR ASAP
ROKOK**

ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

**Disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan
guna mencapai derajat sarjana strata-1 kedokteran umum**

Disusun oleh:

FITRI AMALIA

G2A007080

**PROGRAM PENDIDIKAN SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
TAHUN 2011**

EFEK FLUVASTATIN TERHADAP KADAR ALKALI FOSFATASE SERUM PADA TIKUS WISTAR YANG TERPAPAR ASAP ROKOK

Fitri Amalia¹, Andrew Johan²

ABSTRAK

Latar Belakang : Asap rokok mengandung radikal bebas yang mengakibatkan proses inflamasi yang dapat dilihat dari peningkatan marker-marker inflamasi salah satunya kadar alkali fosfatase (ALP) serum. Fluvastatin memiliki efek antiinflamasi dengan menghambat sekresi enzim *myeloperoxidase* (MPO) yang disekresikan oleh *activated* netrofil yang mensekresi kadar ALP serum serta menurunkan kadar sitokin inflamasi TNF- α , IL-1, IL-8, dan total leukosit dan netrofil pada tikus sepsis. Fluvastatin juga memiliki efek pro-inflamasi yang meningkatkan kadar sitokin *transforming growth factor-beta* (TGF- β) yang mengakibatkan aktivasi netrofil. Penelitian ini bertujuan menentukan efek kadar ALP serum.

Metode : Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan pendekatan *Pre and Post Test-Only Control Group Design*. Tikus diberi adaptasi 1 minggu dan dipilih secara *simple random* dibagi menjadi 3 kelompok masing-masing 6 ekor tikus dan diberi paparan asap rokok. K_A diberi fluvastatin 5mg/kgBB, K_B diberi fluvastatin 10mg/kgBB, dan K tanpa fluvastatin per-oral. Kadar ALP diukur dengan alat *spectrofotometry(unit/cc)* sebelum dan sesudah perlakuan dengan 2 batang rokok/hari selama 4 minggu. Data terdistribusi normal diuji dengan *One Way Annova* dan tidak normal dengan uji *Kruskal-Wallis*

Hasil : Selisih kadar ALP serum sebelum dan sesudah paparan asap rokok K:226.8; K_A:180.17; K_B:378,0 dengan $p>0,05$ antara kelompok K dan K_A dan $p<0,05$ antara K_B dan K dan K_A dan K_B.

Simpulan : Fluvastatin tidak dapat menghambat peningkatan kadar ALP serum pada tikus Wistar yang terpapar asap rokok 2 batang/hari selama 4 minggu. Fluvastatin 5mg/KgBB memiliki rerata kadar ALP serum lebih kecil dibandingkan kelompok fluvastatin 10mg/KgBB dan juga kelompok kontrol.

Kata kunci : Alkali fosfatase serum, fluvastatin, asap rokok

¹Mahasiswa program pendidikan S-1 kedokteran umum FK Undip

²Staf pengajar Bagian Biokimia FK Undip, Jl.Dr.Sutomo No.18 Semarang

***THE EFFECT OF FLUVASTATIN ON SERUM CONCENTRATION OF
ALKALINE PHOSPHATASE IN WISTAR RATS EXPOSED TO
CIGARETTE SMOKE***

Fitri Amalia¹, Andrew Johan²

ABSTRACT

Background: Cigarette smoke includes free radicals that cause inflammation process which can increase inflammation markers such as alkaline phosphatase (ALP) serum. Fluvastatin has anti-inflammatory effect by inhibiting the secretion of the enzyme myeloperoxidase (MPO) secreted by activated neutrophils which produce serum ALP serum and decreased levels of inflammatory cytokines TNF- α , IL-1, IL-8, and total leukocytes and neutrophils in sepsis rat. Fluvastatin also has a pro-inflammatory effects that increase the levels of cytokine transforming growth factor-beta (TGF- β) resulting in activation of neutrophils. This study aims to determine the effect of serum ALP levels.

Methods : This study is an experimental study with pre and post test only control group design. Rats that had undergone adaptation for 1 week were divided randomly into 3 groups each 6 rats and induced by cigarette smoke. K_A was given fluvastatin 5mg/kgBW, K_B was given fluvastatin 10mg/kgBW, and K without fluvastatin per-oral. ALP levels is checked by spectrophotometry (unit/cc) before and after exposure by 2 cigarettes/days in 4 weeks. Normal distributed data were analyzed by One Way Anova test and data that were not normally distributed were analyzed by the Kruskal Wallis test

Result: Difference in serum ALP levels before and after exposure to cigarette smoke K: 226.8; K_A: 180.17; K_B: 378.0 with $p > 0.05$ between groups C and K_A and $p < 0.05$ between K_B and K and K_A and K_B.

Conclusion: Fluvastatin can not inhibit the increase of ALP levels in wistar rats that were given exposure to 2 cigarettes/days for 4 weeks. Fluvastatin 5mg/kgBW had mean levels of serum ALP is smaller than the fluvastatin group and the control group 10mg/KgBB

Keywords: *Alkali phosphatase, statin, cigarette smoke*

* Student of Medical Faculty of Diponegoro University

**Biochemistry Department Medical Faculty of Diponegoro University

PENDAHULUAN

Rokok merupakan produk yang berbahaya dan adiktif, karena didalam rokok terdapat zat kimia yang berbahaya bagi tubuh manusia. Asap rokok yang dihasilkan oleh rokok mengandung sejumlah radikal bebas dan spesies oksigen yang diturunkan lainnya.¹ Radikal bebas yang dihasilkan asap rokok mengakibatkan berbagai reaksi salah satunya adalah proses inflamasi. Kadar netrofil dan leukosit meningkat absolut dibandingkan dengan yang tidak merokok.^{2,3} Netrofil yang bersifat *activated* mensekresi *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan enzim alkalifosfatase (ALP) pada perokok.⁴

Statin merupakan obat yang menurunkan kadar kolesterol yang memiliki efek antiinflamasi dengan cara menghambat sekresi enzim *myeloperoxidase* (MPO) yang pada netrofil yang teraktivasi.⁵ Statin dapat menurunkan kadar sitokin proinflamasi TNF- α , IL-1, IL-6 dan jumlah total leukosit dan netrofil pada tikus yang menderita sepsis⁶ selain itu statin juga dapat memiliki efek pro-inflamasi, dengan meningkatkan kadar sitokin *transforming growth factor-beta* (TGF- β).⁷ TGF- β dengan IL-6 menginduksi diferensiasi *naive T cells* menjadi limfosit Th17 yang dapat mengaktivasi netrofil.⁸

Penelitian ini bertujuan membuktikan selisih kadar ALP pada tikus Wistar sebelum dan sesudah diberi paparan asap rokok 2 batang/hari selama 4 minggu pada kielompok fluvastatin lebih kecil daripada yang tidak diberi fluvastatin

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini termasuk jenis penelitian *true eksperimental* dengan rancangan *Pre and Post test control group design*.

Tikus Wistar yang memenuhi kriteria inklusi diberikan adaptasi selama satu minggu yang dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Tikus Wistar sebanyak 18 ekor dan dibagi menjadi 3 kelompok secara *Simple Random Sampling* dengan masing-masing kelompok 6 ekor. Kelompok A diberi paparan asap rokok dengan fluvastatin 5mg/KgBB, Kelompok B diberi paparan asap rokok dan diberi fluvastatin 10mg/KgBB dan Kelompok kontrol diberi paparan asap rokok saja. Seluruh populasi diperiksa kadar ALP serum terlebih dahulu dengan menggunakan *Spectrophotometer*⁹ Cobas Mira, lalu diberi perlakuan selama 4 minggu, kemudian diperiksa kembali kadar ALP serum pada ketiga kelompok tersebut. Paparan asap rokok yang diberikan adalah 2 batang/hari.

Data pembacaan dengan *Spectrophotometer* Cobas Mira diperoleh nilai ALP pre A, ALP pre B, ALP pre kontrol, ALP post A, ALP post B, ALP post kontrol. Kemudian data tersebut diselisihkan, dibandingkan antara ketiga kelompok tersebut. Sebagai variabel bebas adalah pemberian fluvastatin, dan sebagai variabel tergantung adalah kadar ALP serum. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan grafik boxplot dan diolah menggunakan program *SPSS 17.0 for Windows*.

HASIL PENELITIAN

Selama penelitian terdapat satu tikus wistar yang mati (*drop out*) dan tidak terdapat masalah, komplikasi ataupun kesulitan yang berarti.

Berdasarkan analisis pemeriksaan kadar ALP serum sebelum pemberian asap rokok (*pre*) dan setelah pemberian asap rokok (*post*) pada K_A, K_B, dan kontrol(K) diperoleh data terdistribusi normal berdasarkan uji normalitas *Saphiro-wilk* ($p>0,05$), yaitu

Tabel 5.1 Hasil Uji Statistik Kadar ALP Serum Sebelum dan Setelah Pemberian Asap Rokok

Perlakuan		Saphiro Wilk	
		Rerata ± standart deviasi	Sig
ALP pre	K _A	317,0 ± 94,7	0,523
	K _B	424,3 ± 138,7	0,996
	Kontrol (K)	193,3 ± 39,7	0,313
ALP post	K _A	497,2 ± 82,8	0,561
	K _B	802,3 ± 185,2	0,217
	Kontrol (K)	424,4 ± 71,5	0,255

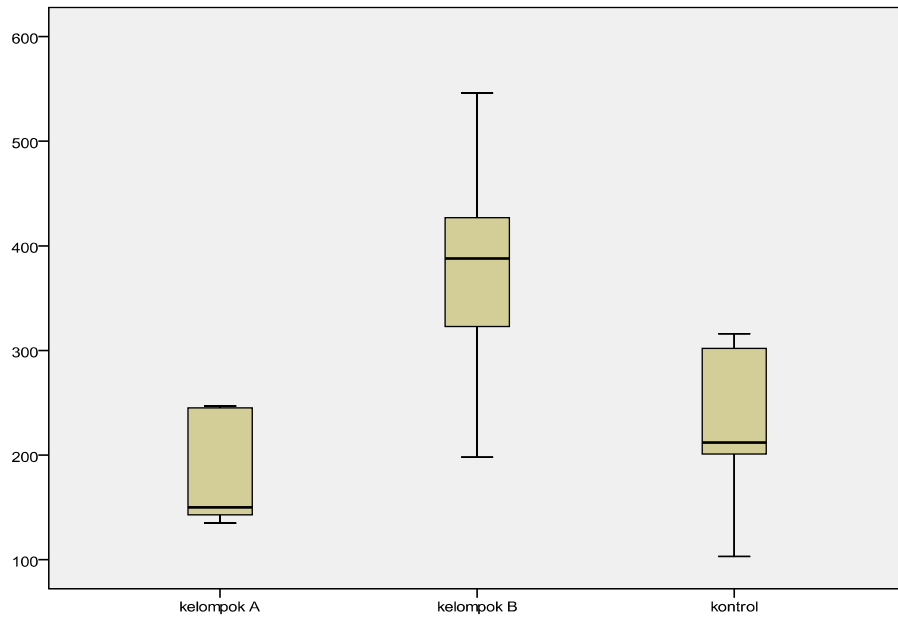
Data *pre* dan *post* test kadar ALP serum berdasarkan uji parametrik (*paired T-Test*) pada ketiga kelompok (K_A, K_B, K) diperoleh signifikansi $p<0,05$ yang mempunyai arti terdapat perbedaan kadar ALP serum yang bermakna

sebelum dan sesudah 4 minggu perlakuan yaitu, K_A didapatkan $p=0,000$, K_B dengan $p = 0,000$ dan K didapatkan $p=0,004$

Kadar ALP serum pada kelompok A, kelompok B dan kelompok kontrol mengalami peningkatan yang dapat dilihat dari selisih *pre* dan *post test* dari ketiga kelompok tersebut. Uji normalitas *Saphiro-wilk* pada selisih *pre* dan *post test* ALP ketiga kelompok diperoleh sebaran data pada K_A tidak normal ($p<0,05$) yaitu $p = 0,33$ sedangkan K_B dan K sebaran datanya normal ($p > 0,05$) yaitu $p = 0,876$ dan $p=0,552$.

Tabel 5.2 Hasil uji normalitas sebaran data delta_ALP Kelompok A, Kelompok B, dan Kontrol

Perlakuan	Saphiro-Wilk		
	Rerata ± standart deviasi		Uji normalitas (<i>Saphiro-wilk</i>)
Delta_ALP	K_A	180.2±51.7	0,33
	K_B	378.0±115.0	0,876
	Kontrol	226.8±86.3	0,552



Gambar 5.1 Grafik boxplot kadar ALP serum pada kelompok A, kelompok B, dan kontrol.

Gambar boxplot diatas menunjukkan hasil perhitungan selisih kadar ALP serum sebelum dan sesudah perlakuan pada tiap kelompok $p > 0,05$ antara kelompok kontrol dan K_A , $p < 0,05$ antara kontrol dengan K_B dan K_A dengan K_B . Hasil uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* (pada lampiran) diperoleh nilai $p=0,019$, nilai uji non-parametrik $p < 0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa hanya terdapat perbedaan kadar ALP serum selama empat minggu antara ketiga kelompok.

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini diperiksa kadar ALP serum sebagai parameter radikal bebas dalam tubuh. Pengukuran kadar ALP serum merupakan cara pengukuran radikal bebas secara tidak langsung, sebab yang diukur adalah produk dari radikal bebas bukan radikal bebas secara langsung. ALP terbentuk dari netrofil yang teraktivasi akibat inflamasi oleh karena radikal bebas yang dihasilkan dari asap rokok.^{2,4} Penelitian ini dilakukan pada 3 kelompok tikus wistar, dimana tiap kelompok terdiri dari 6 ekor dan diberikan perlakuan yang berbeda. Penelitian ini menggunakan pendekatan *Pre and Post Test Control Group Design* yaitu dengan mengukur kadar ALP serum sebelum dan sesudah perlakuan dan membandingkan hasil observasi pada kelompok kontrol dan perlakuan setelah diberi tindakan. Kelompok perlakuan yaitu kelompok A yang diberi paparan asap rokok dan fluvastatin 5mg/KgBB dan kelompok B yang diberi paparan asap rokok dan fluvastatin 10mg/KgBB, sedangkan kelompok kontrol hanya diberi paparan asap rokok. Pemberian fluvastatin 5 mg/kgBB/hari menurunkan derajat jejas aterosklerosis pada mencit yang diberi diet tinggi lemak.¹⁰ Pada penelitian di Jepang, pemberian fluvastatin 10 mg/KgBB/hari menurunkan oksidasi LDL pada kelinci yang diberi ekstrak asap rokok.¹¹

Tikus wistar sebelum diberi perlakuan diperiksa kadar ALP serum kemudian diberi perlakuan selama 4 minggu setelah itu diperiksa kembali kadar ALP serum pada ketiga kelompok tersebut. Paparan asap rokok 2 batang/hari selama 4 minggu meningkatkan kadar *malondialdehida* (MDA) yang secara tidak

langsung juga menunjukkan jumlah radikal bebas serta menurunkan kadar *Superoxide dismutase* (SOD) dan kadar *Glutathione* (GSH) pada tikus wistar.¹²

Data Uji parametrik menunjukkan pemaparan asap rokok kretek pada tikus Wistar selama 4 minggu menyebabkan rata-rata kadar ALP meningkat bermakna. Hasil penelitian tersebut membuktikan bahwa asap rokok merupakan salah satu sumber radikal bebas yang berasal dari lingkungan, disamping polusi udara, paparan bahan kimia dan radiasi sinar-x.¹³ Penelitian terdahulu oleh Shifra Sella dan kawan-kawan menunjukkan peningkatan kadar ALP pada pasien merokok yang memiliki fungsi hati yang normal tanpa penyakit tulang meskipun semua nilai jatuh dalam diterima kisaran yang normal.¹⁰

Pemberian fluvastatin dengan dosis 5mg/KgBB dan 10mg/KgBB per hari pada tikus Wistar bersamaan dengan pemaparan asap rokok kretek selama 4 minggu ternyata menunjukkan kadar ALP serum meningkat secara bermakna. Fluvastatin 5mg/kgBB tidak mampu menurunkan kadar ALP serum pada tikus wistar yang terpapar asap rokok. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain oleh karena asap rokok mengandung radikal bebas dalam jumlah yang sangat tinggi yaitu sebanyak $10^{15} - 10^{18}$ dalam satu hisapan, dan asap rokok juga mengandung suatu bahan yang dapat memicu terbentuknya radikal bebas dalam tubuh.¹⁴ Penelitian di Italy oleh Ettore Porreca dan kawan-kawan yang meneliti pravastatin pada pasien yang mengalami hyperlipidemia menunjukkan peningkatan *transforming growth factor β* (TGF- β 1) kadar plasma dan produksi monosit dengan statin adalah efek biologis senyawa ini untuk menjelaskan tindakan farmakologis mereka.⁷ Faktor pertumbuhan transformasi β (TGF- β) bersama

interleukin-6 menginduksi diferensiasi sel T naif menjadi Th17 cells yang mengakibatkan aktivasi neutrofil.⁸ Aktivasi neutrofil mensekresi radikal ROS dan ALP.¹⁰

Pemberian fluvastatin 10 mg/KgBB meningkat secara bermakna dan rerata peningkatannya lebih tinggi dari pada fluvastatin 5mg/kgBB/hari dan kelompok kontrol. Produk metabolisme dari fluvastatin oleh *cytochrome P4502C9* dapat meningkatkan sekresi enzim dari hati.¹⁵ ALP serum merupakan enzim yang banyak ditemukan di hati dan tulang, sehingga kerusakan pada hepar mengakibatkan peningkatan ALP serum.⁹

Keterbatasan dalam penelitian ini yaitu penelitian tidak disertai pemeriksaan histopatologi sehingga peningkatan ALP serum yang menyebabkan kerusakan hati tidak dapat diketahui, penelitian ini hanya menganalisa efek statin terhadap satu dosis paparan asap rokok. Dosis fluvastatin sebagai antiinflamasi dalam penentuannya setelah terpapar asap rokok belum ditentukan pada manusia.

SIMPULAN

Kadar ALP pada tikus Wistar sebelum dan sesudah paparan asap rokok 2 batang/hari selama 4 minggu meningkat. Pemberian fluvastatin 5mg/kgBB/hari dan 10mg/kgBB/hari tidak dapat menghambat kadar ALP serum. Selisih kadar ALP sebelum dan sesudah paparan asap rokok 2 batang/hari selama 4 minggu pada fluvastatin 5mg/kgBB lebih kecil daripada kelompok kontrol, namun hasil analisis statistik tidak bermakna ($p > 0,05$). Selisih kadar ALP sebelum dan sesudah paparan asap rokok 2 batang/hari selama 4 minggu pada fluvastatin 10mg/kgBB lebih besar daripada kelompok kontrol dan kelompok fluvastatin 10mg/kgBB.

SARAN

Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan disertai pemeriksaan histopatologi hati sehingga kerusakan jaringan hati akibat paparan asap rokok bisa dihubungkan dengan kadar ALP serum.

Pada penelitian selanjutnya, sebaiknya menganalisis efek statin dengan beberapa dosis paparan asap rokok dan waktu penelitian dengan jangka panjang dan dapat mengurangi risiko yang mungkin ditimbulkan asap rokok.

UCAPAN TERIMAKASIH

Dalam kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. Dr. dr. Andrew Johan, Msi. Dosen pembimbing karya tulis ilmiah yang telah membimbing, mengajari, membantu, memotivasi dan meluangkan waktu untuk menyelesaikan studi dan menyusun Karya Tulis Ilmiah ini
2. Ketua Laboratorium Klinik Universitas Brawijaya Malang yang memberikan ijin pemeliharaan tikus dan pemeriksaan laboratorium
3. Orang tua yang telah membesarkan dan mendidik penulis.
4. dr. Dodik Pramono, MsiMed. Selaku dosen wali yang membantu dalam jenjang pendidikan strata-1 kedokteran umum dan memberikan dukungan dan arahan dalam penulisan Karya Tulis Ilmiah ini.
5. Arjaty P.M dan Faramita N yang telah memotivasi, membantu, menemani dan memberikan semangat selama proses penulisan Karya Tulis Ilmiah ini.
6. Dipa Y, Endah R, Fatia D, Ade Irma S, yang telah bekerja sama selama ini sehingga penelitian ini bisa terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

1. Eiserich JP, Vliet A, Handelman GJ, Halliwell B, Cross CE. Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction. *Am J Clin Nutr.* 1995;62(suppl):1490S-500S.
2. Wannamethee G, Gordon DO, Gerald SA. Association between cigarette smoking, pipe/cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2005; 26:1765-1773.
3. Gregory AA, Taylor HJ, Decker PA. Effects of biochemically confirmed smoking cessation on white blood cell count. *Mayo Clin Proc.* 2005;80(8):1022-28.
4. Sela S, Shurtz SR, Awad J, Shapiro G, Nasser L, Shasha SM. The involvement of peripheral polymorphonuclear leukocytes in the oxidative stress and inflammation among cigarette smokers. *Isr Med Assoc J.* 2002;4:1015-9.
5. Stenvinkel P, Rodríguez-Ayala E, Massy ZA, Qureshi AR, Barany P, Fellström B, et al. Statin treatment and diabetes affect myeloperoxidase activity in maintenance hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006;1:281-7.
6. Souza-Neto JL, Araújo-Filho I, Rego AC, Dominici VA, Azevedo IM, Egito ES, et al. Effects of simvastatin in abdominal sepsis in rats. *Acta Cir Bras.* 2006;21 Suppl 4:8-12.
7. Porreca E, Febbo C, Baccante G, Nisio M, Cucurullo F. Increased transforming growth factor-beta1 circulating levels and production in human monocytes after 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme a reductase inhibition with pravastatin. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:1752-57.
8. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Mechanisms of disease: Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med.* 2009;361:888-98.
9. Rochling FA. Alkaline fosfatase plasma or serum. *Clin Cornerstone.* 2001;3(6):1-2.
10. Sata M, Nishimatsu H, Osuga J, Tanaka K, Ishizaka N, Ishibashi S, et al. Statins augment collateral growth in response to ischemia but they do not promote cancer and atherosclerosis. *Hypertension.* 2004;43:1214-20.

11. Yamaguchi Y, Matsuno S, Kagota S, Haginaka J, Kunitomo M. Fluvastatin reduces modification of low-density lipoprotein in hyperlipidemic rabbit loaded with oxidative stress. *Eur J Pharmacol.*2002;436(1-2):97-105.
12. Syamsulina R. Efek proteksi ekstrak buah merah terhadap stress oksidatif di eritrosit rattus novergicus galur wistar yang terpapar asap rokok kretek [PhD thesis]. Surabaya:Universitas Airlangga.2006.
13. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidant: how do we know that they are working. *Critical Reviews in food science and nutrition.*1995;35:21-39.
14. Pryor WA. Biological effect of cigarette smoke, wood smoke and smoke from plastic:the use of electron spin resonance. *Free Radic Biol Med.*1992;13:659-676.
15. Ramesh T, Sureka C, Bhuvana S, Hazeena BV. *Sesbania grandiflora* diminishes oxidative stress and ameliorates antioxidant capacity in liver and kidney of rats exposed to cigarette smoke. *J Physiol Pharmacol.* 2010;61:467-76.