

PENELITIAN

Pengaruh Simvastatin Terhadap Kadar Nitric Oxide Makrofag Mencit Balb/C yang Diberi Lipopolisakarida

Taufik Eko Nugroho*, Mohamad Sofyan Harahap*, Heru Dwi Jatmiko*

*Bagian Anestesiologi dan Terapi Intensif FK Undip/ RSUP Dr. Kariadi, Semarang

ABSTRACT

Background: Nitric oxide (NO) has a potential role in pathogenesis of systemic hypotension in septic shock. Endotoxin will increase NO release which is influenced by proinflammatory cytokines. Simvastatin suppresses endotoxin-induced proinflammatory cytokine production as a result of lipopolysaccharides, so the NO production can be inhibited.

Objective: to prove the effect of simvastatin 0,03 mg; 0,06 mg and 0,12 mg peroral on intraperitoneal cause NO level on Balb/c mice with intraperitoneal injection of lipopolysaccharide become lower.

Methods: a randomized post test only controlled group laboratory experimental studied on 20 male Balb/c mice divided into 4 groups and injected intraperitoneally with lipopolysaccharide 20mg/kg and 6 hours later were given simvastatin. K1 as the control group; K2, K3, and K4 administered with simvastatin 0,03 mg; 0,06 mg; and 0,12 mg peroral. NO was taken from peritoneal macrophage culture and observed by Griess method. The results were analyzed by ANOVA and post hoc statistical assays.

Results: NO level K1 ($0,680 \pm 0,116$), K2 ($0,313 \pm 0,136$), K3 ($0,109 \pm 0,005$) and K4 ($0,091 \pm 0,011$). There was a significant decrease in NO level between K2, K3 and K4 than K1 ($p < 0,05$). There was no significant difference in NO level between K2 than K3 and K4 ($p = 0,001$), also between K3 and K4 ($p > 0,05$).

Conclusion: Simvastatin significantly lowers nitric oxide level in mice intraperitoneal macrophages.

Keywords: simvastatin, lipopolysaccharide, nitric oxide.

ABSTRAK

Latar belakang: Nitric oxide (NO) berperan dalam patogenesis terjadinya hipotensi sistemik pada syok septik. Paparan endotoksin akan menyebabkan peningkatan pelepasan NO yang dipengaruhi oleh aktivasi sitokin proinflamasi. Simvastatin diduga menekan produksi sitokin proinflamasi akibat paparan lipopolisakarida (LPS), sehingga pembentukan NO dapat dihambat.

Tujuan: Membuktikan pengaruh pemberian simvastatin dosis 0,03 mg, 0,06 mg dan 0,12 mg peroral dapat menyebabkan kadar NO mencit yang diberi lipopolisakarida intraperitoneal menjadi lebih rendah.

Metode: Penelitian eksperimental laboratorium dengan desain randomized post test

only controlled group pada 20 ekor mencit Balb/c yang disuntik lipopolisakarida intraperitoneal dan simvastatin dosis 0,03 mg; 0,06 mg dan 0,12 mg peroral. Mencit dibagi menjadi 4 kelompok secara random, yaitu K1 sebagai kontrol, K2 yang mendapat simvastatin 0,03 mg, K3 yang mendapat simvastatin 0,06 mg, dan K4 yang mendapat simvastatin 0,12 mg. Pemeriksaan NO diambil dari kultur makrofag intraperitoneal setelah 6 jam pemberian simvastatin dengan metode Griess. Uji statistik yang digunakan adalah parametrik ANOVA dan dilanjutkan uji Posteriori.

Hasil: Kadar rerata NO pada kelompok K1(0,680±0,116), K2(0,313±0,136), K3 (0,109±0,005) dan K4(0,091±0,011). Terdapat penurunan yang bermakna kadar NO pada kelompok K2, K3 dan K4 dibanding K1 dengan $p < 0,05$. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar NO kelompok K2 dengan kelompok K3 dan K4, serta kelompok K3 dibanding K4 ($p > 0,05$).

Simpulan: Simvastatin secara bermakna dapat menyebabkan kadar NO makrofag intraperitoneal mencit yang diinduksi lipopolisakarida menjadi lebih rendah.

Kata kunci: simvastatin, lipopolisakarida, nitric oxide (NO).

PENDAHULUAN

Sepsis menimbulkan angka kematian yang cukup tinggi pada manusia. Angka mortalitas yang tinggi akibat sepsis menyebabkan sepsis sebagai masalah kesehatan dunia. Sepsis merupakan penyebab utama kematian pada pasien kritis di Amerika.^{1, 2} Jumlah penderita sepsis di Amerika pada tahun 2000 mencapai 750.000 orang dan menyebabkan lebih dari 210.000 pasien meninggal tiap tahunnya.³ Angka kematian akibat sepsis antara 30% sampai 40%.² Syok septik dan kegagalan multiorgan akibat sepsis menyebabkan outcome yang buruk bagi penderita.¹ Sepsis sebagian besar disebabkan oleh bakteri gram negatif dengan persentase 60% sampai 70% kasus.^{4,5} Bakteri gram

negatif dapat melepaskan suatu substansi yang dapat menstimulasi sel imun, sehingga sel tersebut terpacu untuk melepaskan mediator inflamasi.^{2,4,5} Substansi bakteri yang berperan penting pada keadaan sepsis tersebut adalah lipopolisakarida.^{3,5} Lipopolisakarida (LPS) ialah suatu komponen utama membran terluar bakteri gram negatif yang merupakan salah satu faktor patogenik sepsis dan dikatakan sebagai penyebab sepsis terbanyak.^{2,4,5}

Respons sistemik tubuh akibat LPS menyebabkan aktivasi *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B), yang merupakan salah satu protein faktor transkripsi pada makrofag.^{2,5} Aktivasi NF- κ B akan

meningkatkan produksi mediator-mediator inflamasi atau sitokin proinflamasi seperti *tumor necrosis factor* (TNF), *interleukin* (IL) serta *interferon gamma* (IFN- γ).^{4,5} Peningkatan mediator - mediator inflamasi ini akan memacu peningkatan produksi *nitric oxide* (NO) dalam jumlah besar melalui aktivasi *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS).⁵ iNOS dapat diekspresikan oleh sejumlah tipe sel imun terutama makrofag.^{2,4,5}

Nitric oxide (NO) adalah molekul biologi yang bisa terdapat di seluruh tubuh, dihasilkan oleh sejumlah tipe sel yang berkaitan dengan proses penyakit, dan dapat menimbulkan efek di tingkat seluler dan vaskuler.⁶ NO mempunyai peran penting dalam patogenesis sepsis, dimana akibat pengaruh dari iNOS, NO akan diproduksi dalam jumlah besar oleh makrofag, sel hepar maupun pada endotel pembuluh darah.^{6,7}

Golongan statin adalah obat yang efektif dan ditoleransi dengan baik untuk mengobati dislipidemia.^{8,9} Statin juga dikenal sebagai obat yang merupakan inhibitor kuat pada proses inflamasi.^{10,11} Mekanisme statin dalam menyebabkan modulasi respon imun merupakan hal yang kompleks, akan tetapi dikatakan

tidak berkaitan dengan efeknya dalam menurunkan kolesterol LDL.^{9,11,12}

Pada penelitian ini pajanan LPS dilakukan terhadap mencit dengan penyuntikan intraperitoneal, karena pada intraperitoneal terdapat banyak makrofag yang merupakan tipe sel spesifik untuk iNOS yang dipicu oleh LPS.^{13,14} Pemeriksaan kultur makrofag untuk pemeriksaan NO pada penelitian ini dilakukan pada 6 jam pasca penyuntikan LPS karena TNF- α dan IL-1 dari mencit akan mengalami peningkatan mulai dari 2 jam dan mencapai puncaknya pada 8 jam pasca penyuntikan LPS, serta konsentrasi statin plasma mencapai puncak dalam 1 hingga 4 jam pasca pemberian simvastatin.^{9,15,16}

Penelitian tentang efek statin terhadap kadar NO belum banyak dilakukan. Statin dalam terapi mempunyai beberapa dosis bertingkat.¹⁵ Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian simvastatin terhadap kadar NO makrofag pada mencit, dengan menggunakan dosis bertingkat yaitu 10 mg, 20 mg dan 40 mg pada manusia, yang kemudian dikonversikan ke dalam dosis mencit dengan berat badan 20 g menjadi 0,03 mg, 0,06 mg dan 0,12 mg

setelah pemberian LPS.

METODE

Penelitian ini termasuk eksperimental laboratorik dengan desain *post test only controlled group* dengan tujuan mencari pengaruh pemberian simvastatin peroral pada mencit yang diberi lipopolisakarida intraperitoneal terhadap kadar NO makrofag intraperitoneal. Sampel penelitian 20 ekor mencit balb/c jantan, umur 8 – 10 minggu, berat 20 – 30 gram, sehat dan tidak tampak cacat secara anatomi. Mencit dibagi dalam 4 kelompok perlakuan, sampel yang memenuhi kriteria inklusi diadaptasikan dengan dikandangkan per kelompok dan diberi pakan standar serta minum yang sama selama 1 minggu secara *ad libitum*. Kelompok dibagi menjadi 4 yaitu kelompok kontrol (K1), Perlakuan 1 (K2), Perlakuan 2 (K3), Perlakuan 3 (K4). K1 adalah kelompok kontrol, dimana mencit disuntik LPS intraperitoneal 10 mg/KgBB dan mendapat NaCl 0,9% peroral. K2 adalah kelompok perlakuan 1, dimana mencit disuntik LPS intraperitoneal 10 mg/KgBB dan mendapat simvastatin 0,03 mg peroral. K3 adalah kelompok perlakuan 2, dimana mencit disuntik

LPS intraperitoneal 10 mg/KgBB dan mendapat simvastatin 0,06 mg peroral. K4 adalah kelompok perlakuan 3, dimana mencit disuntik LPS intraperitoneal 10 mg/KgBB dan mendapat simvastatin 0,12 mg peroral. Setelah ditunggu selama 6 jam kemudian dilakukan pengambilan dan kultur makrofag intraperitoneal. Selanjutnya dilakukan pengukuran kadar NO makrofag intraperitoneal. Masing-masing kelompok dilakukan pemeriksaan kadar NO supernatan kultur makrofag intraperitoneal. Kadar NO dari tiap-tiap kelompok perlakuan dihitung dengan menggunakan metode modifikasi *Gries* dari *Green et al* dan *Ding et al*. Kadar NO makrofag dibaca dengan alat *ELISA reader*, kemudian hasilnya dihitung menggunakan persamaan regresi linier. Kajian Etik (*Ethical clearance*) telah mendapat persetujuan Komisi Etik Penelitian Kesehatan FK Undip/RSDK dengan nomor 147/EC/FK/RSDK/2012.

HASIL

Hasil pengamatan rerata kadar NO makrofag intraperitoneal pada keempat kelompok menunjukkan kadar NO yang berbeda yaitu pada kelompok perlakuan 3 (K4) menunjukkan kadar NO yang

paling rendah dibandingkan kelompok kontrol (K1), seperti ditampilkan pada Tabel 1.

Gambar 1 menunjukkan uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk test* untuk mengetahui sebaran data. Pada penelitian didapatkan data berdistribusi normal ($p = 0,583$) sehingga uji beda dilakukan dengan *ANOVA* dilanjutkan dengan uji homogenitas varian untuk menentukan jenis uji posteriori. Hasil uji homogenitas varian dilihat dari output *Levene test*. Nilai p pada *Levene test* menunjukkan nilai $0,006$ ($p < 0,05$). Hal ini berarti varian data pada ketiga kelompok tersebut adalah tidak homogen. Untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan, maka dilakukan uji posteriori dengan uji Tamhane untuk melihat beda antara kelompok K2, K3, dan K4 dengan kelompok K1 serta antara kelompok K2, K3 dan K4. Uji dianggap bermakna apabila $P < 0,05$.

Uji beda dilakukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang bermakna kadar NO makrofag intraperitoneal pada kelompok kontrol (K1), kelompok perlakuan 1 (K2) dan kelompok perlakuan 2 (K3) dan kelompok perlakuan 3 (K4). Uji beda ini dilakukan

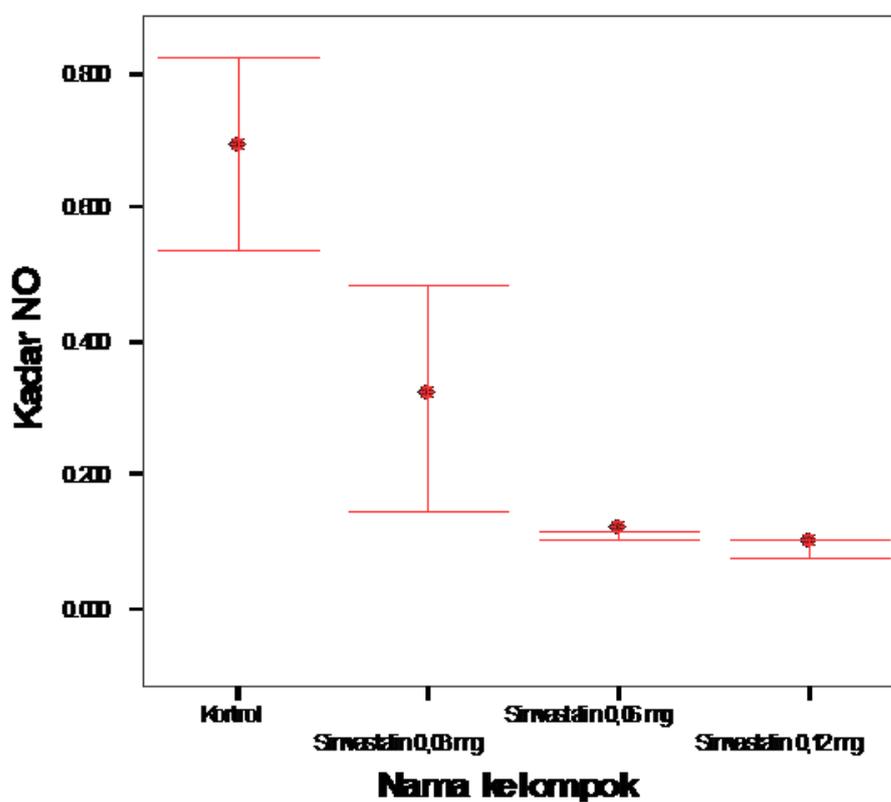
dengan menggunakan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji posteriori. Hasil uji one way-Anova menunjukkan hasil signifikan ($p = 0,001$) dengan interpretasi bahwa didapatkan perbedaan bermakna dari dua kelompok penelitian atau lebih.

Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat korelasi yang bermakna antara dosis pemberian simvastatin dengan kadar NO makrofag intraperitoneal pada kelompok penelitian. Uji ini dilakukan menggunakan uji Pearson. Dari hasil uji korelasi didapatkan korelasi yang bermakna ($p=0,001$), dengan nilai koefisien korelasi Pearson sebesar $-0,881$ yang menunjukkan bahwa arah korelasi negatif dengan koefisien korelasi kuat.

Dari hasil uji posteriori didapatkan bahwa kadar NO makrofag intraperitoneal pada kelompok K1 (kontrol) dibanding dengan masing-masing kelompok perlakuan (K2, K3, K4) terdapat perbedaan bermakna dengan nilai $p < 0,05$. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar NO makrofag intraperitoneal pada kelompok perlakuan K2 dibandingkan kelompok perlakuan K3 ($p = 0,158$),

Tabel 1. Kadar nitrit oksida pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (μM)

Kelompok	N	Mean	SD
K1	5	0,680	0,116
K2	5	0,313	0,136
K3	5	0,109	0,005
K4	5	0,091	0,011



Gambar 1. Grafik *error bar* kadar NO kelompok penelitian

kelompok perlakuan K2 dibandingkan kelompok perlakuan K4 ($p = 0,122$), serta kadar NO makrofag intraperitoneal pada kelompok perlakuan K3 dibandingkan kelompok perlakuan K4 ($p = 0,101$).

PEMBAHASAN

Hasil tersebut di atas sesuai dengan penelitian sebelumnya dimana Yasuda dkk menyatakan bahwa simvastatin menekan TNF- α mencit sepsis. Pada penelitian lain Arnaud dan Chello menyatakan bahwa simvastatin menekan IL-6 dan IL-8. TNF- α merupakan sitokin pertama yang terinduksi setelah stimulasi LPS yang kemudian juga akan menstimulasi IL-1 dan IL-6 pada makrofag, monosit, neutrofil dan sel endotel. Efek supresi simvastatin terhadap IL-6 dan IL-8 dapat secara langsung maupun melalui penghambatan pelepasan TNF- α yang diinduksi oleh LPS. Pada penelitian ini penurunan kadar NO makrofag akibat iNOS tidak teraktivasi dikarenakan efek supresi simvastatin terhadap TNF- α serta IL-6 dan IL-8.^{17,18,19}

HMG CoA reduktase mengkatalisis pembentukan mevalonat dari asetil-CoA dan mengatur biosintesis kolesterol. Metabolit mevalonat, terutama *farnesyl*

pyrofosfat, termasuk dalam modifikasi post-translational dari beberapa protein penting. Inhibisi dari HMG CoA reduktase telah menunjukkan dapat menurunkan LPS dan TNF- α yang diinduksi oleh aktivasi NF- κ B pada sel mesangial, sel otot polos vaskuler dan sel mononuclear. Lebih lanjut pada makrofag tikus, HMG CoA reduktase *inhibitor* seperti simvastatin menghambat ekspresi induksi LPS dari sitokin dan iNOS, yang dianggap dimediasi oleh aktivasi NF- κ B. Jalur mevalonat dianggap memiliki peranan penting dalam mengatur ekspresi mediasi NF- κ B dari sitokin dan iNOS. HMG CoA reduktase inhibitor menghambat peningkatan sitokin inflamasi dan kadar NO, meskipun mekanisme molekuler yang mendasari efek ini masih harus diteliti kembali.^{15,17}

Faktor transkripsi NF- κ B mempunyai peranan krusial pada proses inflamasi. NF- κ B merupakan faktor transkripsi yang akan memicu produksi sitokin. Pemberian LPS akan mengaktifkan NF- κ B yang akan meningkatkan produksi mediator inflamasi seperti IL-8, TNF- α , *intercellular adhesion molecule* (ICAM) dan *cyclooxygenase-2*. Zelvyte dkk menyatakan dalam penelitiannya bahwa simvastatin menghambat aktivasi NF-

kB, sehingga simvastatin secara signifikan akan menurunkan konsentrasi TNF- α dan IL-6.¹⁷

Pada pemberian obat seperti simvastatin akan dicari dosis sekecil mungkin yang cukup mampu memberikan efek terapi, sehingga efek samping akibat kelebihan dosis obat dapat dikurangi. Dari penelitian ini dosis 0,03 mg pada mencit yang setara dengan 10 mg sudah mampu menyebabkan penurunan kadar NO makrofag intraperitoneal dan tidak berbeda dengan dosis 0,06 mg ataupun 0,12 mg. Dosis simvastatin 0,03 mg pada mencit sudah cukup efektif untuk menurunkan kadar NO makrofag intraperitoneal.

Penelitian ini menunjukkan bahwa simvastatin, suatu HMG-CoA reduktase inhibitor, dapat mengurangi peningkatan produksi NO. Hipotesis yang sering berkembang penyebab terjadinya vasodilatasi dan hipotensi selama sepsis bahwa terdapat peningkatan produksi NO karena aktivasi iNOS dan eNOS. Pada penelitian ini ditemukan bahwa terdapat penurunan sesuai dosis dari kadar NO setelah pemberian LPS pada mencit yang diberikan simvastatin. Hasil

ini memberi kesan bahwa simvastatin menghambat produksi NO dan efek ini secara teori akibat dari penurunan aktivitas iNOS selama syok endotoksin.^{15,20}

NO yang diproduksi oleh makrofag memiliki efek menghancurkan bakteri (*killing*), sehingga apabila produksi NO berkurang maka akan terjadi penurunan aktivitas *killing* bakteri oleh makrofag.²¹ Pada sepsis pemberian terapi yang menimbulkan efek penurunan produksi NO harus diikuti oleh pemberian antibiotik yang kuat.

Severe sepsis masih menunjukkan angka mortalitas yang tinggi karena tidak ada terapi tunggal yang telah ditemukan secara sempurna efektif untuk itu. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menunjukkan efek proteksi dari statin, yang merupakan inhibitor HMG CoA reduktase.^{15, 16, 22}

SIMPULAN

Simvastatin secara bermakna dapat menyebabkan kadar NO makrofag intraperitoneal mencit yang diinduksi lipopolisakarida menjadi lebih rendah.

DAFTAR PUSTAKA

1. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-salzler M, Moldawer LL. Apoptosis in Sepsis: a New Target for Therapeutic Exploration. *The FASEB Journal* 2001;15:879-92.
2. Paterson RL, Webster NR. Sepsis and the Systemic Inflammatory Response Syndrome. *R.Coll.Surg.Edinb* 2000;178-82.
3. Hotchkiss SR, Karl EI. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. 2003;348:138-50.
4. Karl IE. Pathogenesis of Sepsis and Multiorgan Dysfunction. *J Cell Biochem* 1992;267:10931-44.
5. Hermawan AG. Sitokin yang Berperan dalam SIRS dan Sepsis. SIRS, Sepsis dan Syok Septik (Imunologi, Diagnosis, Penatalaksanaan) 1th ed. Sebelas Maret University Press. 2008; 19-30
6. Vincent JL, Zhang J, Szabo C, Preiser JC. Effect of Nitric Oxide in Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;16(1):1781-5.
7. Chandar A, Enkhbaatar P, Nakano Y, Traber DL. Sepsis: Emerging Role of Nitric Oxide and Selectin. *Clinics*.2006;61(1):71-6
8. Greenwood J, Mason JC. Statins and the Vascular Endothelial Inflammatory Response. *Trends Immunol* 2007; 28: 88–98
9. Katzung BG. Agents Used in Hyperlipidemia. In *Basic and Clinical Pharmacology* 10th Ed. Mc Graw-Hill. New York.2007. ebook
10. Greenwood J, Steinman L, Zamvil SS. Statin Therapy and Autoimmune Disease: from Protein Prenylation to Immunomodulation. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 358–70
11. Gao F, Linhartova L, Johnston A. Thickett DR. Statins and Sepsis. *Br J Anaesth* 2008; 100: 288-98
12. Almog YM, Shefer AM, Novack VM. Prior Statin Therapy is Associated with a Decreased Rate of Severe Sepsis [Article]. *Circulation* 2004; 110: 880–5
13. Fortier AH, Falk LA. Isolation of Murine Macrophage. *Curr Protoc Immunol* 2001; 14: 1411-9
14. Davies JQ, Gordon S. Isolation and Culture of Murine Macrophages. *Method in Molecular Biology Clifton NJ* 2005; 290: 91 -103
15. Ando H, Takamura T, Ota T, Nagai Y, Kobayashi K. Cerivastatin Improves Survival of Mice with Lipopolysaccharide-Induced Sepsis. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294: 1043–6
16. Mahley RW, Bersot TP. Drug Therapy for Hypercholesterolemia and Dyslipidemia. In Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* 11th Ed. McGraw-Hill. New York 2006. Ebook
17. Yasuda H, Yuen PS, Hu X, Zhou H, Star RA. Simvastatin Improves Sepsis-Induced Mortality and Acute Kidney Injury via Renal Vascular Effects. *Kidney Int* 2006; 69: 1535–42
18. Arnaud C, Burger F, Steffens S. Statins Reduce Interleukin-6-Induced C-Reactive Protein in Human Hepatocytes: New Evidence for Direct Antiinflammatory Effects of Statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1231–6

19. Chello M, Patti G, Candura D. Effects of Atorvastatin on Systemic Inflammatory Response after Coronary Bypass Surgery. *Crit Care Med* 2006; 34: 660–7
20. Merx MWM, Liehn EAM, Graf JM. Statin Treatment after Onset of Sepsis in a Murine Model Improves Survival [Article]. *Circulation* 2005; 112: 117–24
21. Abbas AK. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders Companies. 2007; p175-85.
22. Merx MWM, Liehn EAM, Janssens UM. HMG-CoA Reductase Inhibitor Simvastatin Profoundly Improves Survival in a Murine Model of Sepsis [Report]. *Circulation* 2004; 109: 2560–5