

PENGARUH PEMBERIAN ASAM LEMAK TRANS TERHADAP PENYAKIT PERLEMAKAN HATI NON ALKOHOL TIKUS SPRAGUE DAWLEY

Medina sianturi¹, Andew Johan², Kusmiyati Tjahjono³

¹STIKES St. Elisabeth Semarang, Jl. Kawi 11 Semarang

²Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

³Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

ABSTRAK

Konsumsi asam lemak trans (ALT) dosis tinggi telah diketahui dapat menyebabkan penyakit perlemakan hati non alkohol. Kerusakan hati akibat ALT dosis 5 % dan 10 % pada tikus Sprague Dawley belum pernah diteliti. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh pemberian ALT dosis 5 % dan 10 % terhadap penyakit perlemakan hati non alkohol tikus Sprague Dawley. Desain penelitian adalah eksperimen dengan sampel 18 ekor tikus jantan Sprague Dawley dibagi secara random menjadi 3 kelompok: K (pakan standar), P1 (asam lemak trans 5 %) dan P2 (asam lemak trans 10 %) selama 8 minggu. Jaringan diwarnai dengan HE dan diperiksa steatosis hepatosit, inflamasi lobuler dan degenerasi *ballooning* menggunakan skoring metode NAFLD activity score (NAS), analisis statistik dengan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis* dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Hasil penelitian menunjukkan perlemakan hati terjadi pada kelompok P1 dan P2. Terdapat perbedaan bermakna steatosis, inflamasi dan degenerasi *ballooning* kedua kelompok yang diberi asam lemak trans (P1, P2) dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p < 0,001$). Kelompok asam lemak trans 10 % mengalami steatosis dan inflamasi derajat sedang ke berat dan jumlah degenerasi *ballooning* yang sedikit, sedangkan kelompok asam lemak trans 5 % mengalami steatosis dan inflamasi ringan ke sedang dan tidak ada degenerasi *ballooning*. Simpulan penelitian adalah pemberian asam lemak trans dosis 5 % dan 10 % dapat menyebabkan penyakit perlemakan hati non alkohol.

Kata kunci: Penyakit perlemakan hati non alkohol, asam lemak trans, steatosis, inflamasi lobuler dan degenerasi *ballooning*

ABSTRACT

Consumption of high doses of trans fatty acids (TFA) have been known to cause non alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Liver damage caused by TFA dose of 5% and 10% in Sprague Dawley rats has not been done. The aim of this study is to determine the effect of doses 5% and 10% of TFA on NAFLD. An experimental animal study with randomized post test only control group design. Sample of 18 male Sprague Dawley rats were divided 3 groups, K : standard feed, P1 : treatment with TFA 5% and P2 : treatment with TFA 10% for 8 weeks. Tissue stained with HE and examined hepatic steatosis, ballooning degeneration and inflammatory lobuler used the scoring method of NAFLD activity score (NAS), statistics by *Kruskal-Wallis* nonparametric test followed by *Mann-Whitney* test. Fatty liver was found in group P1 and P2. There was significant differences between steatosis, inflammation and ballooning degeneration of both groups were given a dose of TFA 5% (P1) and 10% (P2) compared with the control group ($p < 0.001$). TFA 5% group had mild steatosis, inflammation mild to moderate and no ballooning degeneration, while the TFA 10% group had steatosis and

moderate to severe inflammation and degeneration ballooning a small amount. TFA dose of 5% and 10% can induce NAFLD

Key word: Non alcoholic Fatty liver disease (NAFLD), trans fatty acids (TFA), steatosis, ballooning degeneration and inflammatory lobuler

Pendahuluan

Penyakit perlemakan hati non alkohol atau *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) merupakan gangguan pada hati yang biasa terjadi di dunia, insiden yang paling banyak ditemukan pada penderita DM tipe 2, obesitas, dan penyakit metabolik lainnya sebanyak 70 – 90 % . Prevalensi penyakit perlemakan hati non alkohol semakin meningkat, abad 21 ini lebih dari 30 % penduduk Amerika Serikat mengalami obesitas dan 75 % dari mereka mengalami perlemakan hati non alkohol, usia tertinggi adalah 40–49 tahun (Sey AV, 2003). Penelitian Hasan, Lesmana, dkk, tahun 2007) mengatakan prevalensi perlemakan hati non alkohol di Indonesia sebesar 30.6 % . Penyakit perlemakan hati non alkohol akan berlanjut menjadi fibrosis (10-15% atau sirosis hepatis (15-25 %), gagal hati (9 %) dan karsinoma hati (1 %).

Penyakit perlemakan hati non alkohol dapat diukur dengan analisis histologikal dengan melihat steatosis, inflamasi lobular atau portal, degenerasi *ballooning* dan fibrosis. Steatosis hepatosit adalah akumulasi lemak yang terdiri dari trigliserida di sel hati, merupakan kriteria minimum dari diagnosis penyakit perlemakan hati. Inflamasi lobuler biasanya derajat sedang yang terdiri dari limfosit, eosinofil dan sedikit neutrofil. Degenerasi *ballooning* adalah pembengkakan hepatosit akibat gangguan membran hepatosit (Brunt dan Tiniakos, 2010).

Penyakit perlemakan hati dapat disebabkan konsumsi asam lemak *trans*. Konsumsi asam lemak *trans* terus meningkat, penduduk Amerika Serikat mengkonsumsi sekitar 5,3

gram asam lemak *trans* per hari (2,6 % dari total asupan energi dan 7,4% energi lemak) dan rekomendasi WHO menyarankan asupan lemak *trans* harus lebih rendah dari 1% total energi per hari (Martinez, 2010). Laporan dinas kesehatan Jogja tahun 2011, pola konsumsi makanan mengalami perubahan dari makanan tradisional menjadi makanan moderen seperti makanan siap saji serta penggunaan margarin yang tinggi kandungan lemak tidak jenuh dan melebihi rekomendasi pedoman gizi seimbang.

Pengaruh negatif asam lemak *trans* lebih buruk dibandingkan dengan asam lemak jenuh, asupan asam lemak *trans* yang tinggi di atas 6 % dari energi total secara terus menerus bisa berakibat buruk pada banyak hal seperti penyakit jantung, diabetes mellitus, inflamasi endotel dan sitemik (Sartika, 2008). Penelitian tentang efek asam lemak tinggi sudah pernah dilakukan dengan jumlah 57 % dari total energi dapat menyebabkan steatosis hepatic dan kerusakan hati (Safwat GM, 2009). Penelitian Dorfman tahun 2009 tentang efek asam lemak *trans* terhadap metabolisme lemak hati yang menyebabkan penyakit perlemakan hati masih jarang dilakukan, penelitian yang sudah dilakukan menggunakan dosis tinggi (20%, 17 %, 14 % dari total energi) menyebabkan hepatomegali dan *non alcoholic steatosis hepatic* (NASH) dengan gambaran histopatologi hepar derajat berat, efek pemberian asam lemak *trans* dengan dosis 5 % dan 10 % terhadap penyakit perlemakan hati belum pernah dilakukan pada hewan coba, dosis 5 % masih dianggap kontroversi terhadap timbulnya kerusakan hati. Dosis asam lemak

trans yang telah terbukti dapat memberikan efek samping (toksik) menggunakan dosis diatas 6 %. Penelitian terdahulu menggunakan asam lemak *trans* dosis 20 % selama 8 minggu menunjukkan adanya steatosis derajat berat.

Penelitian terhadap tikus dengan efek samping asam lemak *trans* dosis 5 % dan 10 % perlu dilakukan untuk melihat apakah dosis tersebut sudah memberikan efek samping terhadap perubahan jaringan hati tikus, dan tikus model tersebut dapat digunakan sebagai hewan percobaan pemberian terapi-terapi baru atau herbal baru pada penelitian selanjutnya sebelum dilakukan percobaan kepada manusia.

Mengingat latar belakang tersebut penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh asam lemak *trans* dosis 5 dan 10% terhadap penyakit perlemakan hati non alkohol tikus *Sprague Dawley*. Penelitian dilakukan selama 8 minggu, dengan melihat histopatologi sel hati dengan pewarnaan H&E dengan menilai 3 gambaran patologik : steatosis, inflamasi lobuler dan degenerasi *ballooning*, menggunakan sistem skor yang dapat memberikan gambaran tingkat keparahan dari penyakit perlemakan hati.

Pemilihan tikus ini karena dari beberapa penelitian yang berhubungan dengan metabolisme banyak menggunakan jenis ini, tikus jantan tidak berpengaruh terhadap hormonal steroid seperti tikus betina yang dapat membuat tikus mengalami peningkatan metabolisme lemak yang berakibat terhadap proses perlemakan hati .

1. Metode Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik (true experiment designs) dengan rancangan *randomized post-test control group design*,²⁰ dengan rancangan acak lengkap (*completely randomized design*). Subyek penelitian adalah tikus *Sprague Dawley* jantan, umur 9 minggu dan berat badan 200-250 gr dengan jumlah 18 ekor

sesuai dengan ketentuan WHO, tikus diperoleh dari LPPT FKH UGM.

Ransum pakan untuk hewan coba selama masa adaptasi dan untuk kelompok kontrol selama penelitian dibuat oleh UPHP UGM, makanan untuk kelompok perlakuan berasal dari produk *research diet* Amerika dengan asam lemak *trans* dosis 5 % dan 10 % Asam lemak *trans* dibuat dalam bentuk pellet tikus diberikan selama 8 minggu.. Hewan percobaan di pelihara dengan kandang individual, dibersihkan setiap hari. Temperatur suhu 28-32⁰C dan ada sirkulasi udara serta cahaya yang memadai (12 jam siklus gelap / terang) dan dilakukan aklimatisasi yang menyesuaikan terhadap iklim dan lingkungan.

Penelitian diawali dengan mempersiapkan tikus jantan (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) usia 9 minggu, sejumlah 18 ekor yang diadaptasi selama 7 hari dengan pemberian pakan standar PAR-G AD II. Berat badan di timbang, dikelompokkan secara acak menjadi 3 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 6 ekor. Pakan standar untuk kelompok kontrol dan tinggi asam lemak *trans* dengan dosis 5 % dan 10 % untuk kelompok perlakuan diberikan selama 8 minggu . Akhir perlakuan sejumlah 18 ekor tikus diterminasi diambil organ hati untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi hati dengan pewarnaan H&E dan diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x dengan 5 lapang pandang dan 20 hepatosit., diperiksa derajat steatosis, inflamasi lobuler dan degenerasi *ballooning*.

Data penelitian diuji normalitas menggunakan *Saphiro Wilk* dan uji statistic menggunakan one way anova dengan post hock tukey untuk data normal dan Kruskal wallis dan post hock *Mann Withney* untuk data yang tidak normal dengan nilai p bermakna apabila $p < \alpha$ (0,05), Penelitian ini dilakukan setelah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatandan Kedokteran (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

2. Hasil Penelitian dan pembahasan

a. Karakteristik berat badan, berat hati dan konsumsi tikus.

Berat badan tikus ditimbang setiap minggu menggunakan timbangan elektrik dengan ukuran gram. Pertambahan berat badan tikus dan hati lebih tinggi pada kelompok P2.

Jumlah makanan yang diberikan pada semua kelompok setiap hari adalah 20 gr, dan dilakukan penimbangan sisa makan setiap hari. Konsumsi makan tikus lebih banyak pada kelompok kontrol dengan rata-rata sebesar 14,72 gr/hari, namun uji efisiensi makanan didapat hasil paling banyak pada kelompok P1 dan P2 .(tabel 1)

Tabel 1. Rerata berat badan, berat hati, konsumsi makan dan efisiensi makan tikus

Pertambahan berat badan dan status nutrisi tikus				
Kelp	Berat badan (gr)	berat hati (gr)	makan (gr/hari)	Efisiensi makanan (BB/ makan)
K	34,18 ± 10,04	7,80 ± 0,79	14,72 ± 1,31	2,32
P1	77,47 ± 21,55	10,68 ± 1,18	11,32 ± 0,73	6,84
P2	100,95 ± 16,17	11,52 ± 2,44	12,62 ± 0,56	8,00

Tabel diatas menunjukkan kenaikan berat badan dan berat hati lebih tinggi pada tikus yang diberi lemak trans, meskipun jumlah makan yang dikonsumsi lebih sedikit, semakin tinggi dosis semakin tinggi berat hati dan berat badan.

b. Histopatologi Sel Hepar Tikus

Skoring Histopatologi hati dihitung dengan tehnik NAFLD *activity score*. penyakit perlemakan hati pada tikus dengan diit standar tidak ada gangguan, namun pada tikus yang diberi asam lemak trans mengalami perubahan pada sel hati tikus.

Tabel.2. Rerata Steatosis, inflamasi lobuler, degenerasi ballooning dan NAS semua tikus

Kelp	Rerata ± SD			
	Steatosis	Inflamasi Lobuler	Degenerasi Ballooning	NAS
K	0	0	0	0
P1	1,17 ± 0,41	1,50 ± 0,55	0,17 ± 0,41	2,83 ± 1,17
P2	2,67 ± 0,52	3,00 ± 3,00	1,17 ± 0,41	6,80 ± 0,75

$p^* < 0,001$

Ket : $p^* = \text{Kruskal-Wallis } p < 0,05$

Tabel diatas menunjukkan bahwa kelompok tikus yang diberi asam lemak trans mengalami proses inflamasi dengan adanya perlemakan hati (steatosis), inflamasi lobuler dan adanya degenerasi *ballooning* pada dosis 10 %, hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis semakin besar tingkat kerusakan sel hati tikus. Tabel 3. Ringkasan nilai signifikansi (p) hasil uji *post Hoc test Mann-Whitney* antar kelompok

Kelp	Nilai-p			
	Steatosis	Inflamasi Lobuler	Degenerasi Ballooning	NAS
K dan P1	0,01	0,002	0,32	0,002
K dan P2	0,002	0,001	0,001	0,002
P1 dan P2	0,004	0,002	0,006	0,003

Hasil uji *Kruskal-Wallis* derajat steatosis, inflamasi lobuler dan degenerasi ballooning dan menunjukkan perbedaan bermakna diantara kelompok penelitian dengan $p < 0,05$ ($p < 0,001$), selanjutnya uji *post Hoc* pada tabel 3 menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada semua kelompok dengan signifikansi $p < 0,05$, kecuali degenerasi ballooning kelompok K dengan P1 tidak berbeda bermakna $p > 0,05$.

Pemberian asam lemak *trans* dosis 5 % dan 10 % selama 8 minggu dapat menyebabkan perlemakan hati non alkohol yang ditandai dengan steatosis hati, inflamasi dan degenerasi *ballooning* hepatosit dengan derajat yang berbeda. Derajat kerusakan sel hati pada tikus dengan pemberian asam lemak *trans* 5 % sudah mengalami perlemakan hati dan adanya proses peradangan yang ringan, namun dosis 10 % sudah mengarah ke degenerasi sel dengan adanya *ballooning* yang masih bersifat *reversible*.

Penyakit perlemakan hati non alkohol adalah kondisi klinik dan patologi yang memiliki keparahan dari steatosis derajat ringan sampai steatohepatitis non alkohol (NASH). Steatosis derajat ringan tidak berbahaya dan bersifat reversible, dapat membaik atau hilang apabila faktor penyebab perlemakan hati dihilangkan. Perkembangan steatosis menjadi steatohepatitis non alkohol (NASH) dipengaruhi oleh faktor penyebab NAFLD yang bersifat menetap bahkan meningkat. Steatohepatitis merupakan gabungan steatosis dan nekroinflamasi seperti *balloon* hepatosit, sel apoptosis dan badan *Mallory hyaline* atau megamitokondria dalam sitoplasma hepatosit, dan infiltrasi sel radang dan makrofag.

Tingkat respon inflamasi bervariasi dan tidak selalu berkorelasi dengan tingkat steatosis seperti yang ditemukan pada hasil penelitian. Derajat steatosis berat dapat terlihat hepatosit yang menggelembung (*ballooning*) memberi kontribusi terjadinya steatohepatitis yang terlihat pada kelompok 3 yang diberi asam lemak *trans* 10 % didapat jumlah *ballooning* yang sedikit membuktikan adanya pengaruh steatosis dengan degenerasi *ballooning*, meskipun secara statistik tidak berbeda secara bermakna.

Kerusakan hepatosit karena pemberian asam lemak *trans* dosis 20 % selama 8 minggu dan 15 % selama 16 minggu didapat adanya perlemakan hati dengan derajat berat. Hasil penelitian ini melengkapi penelitian

sebelumnya ternyata pemberian asam lemak *trans* dosis 5 % selama 8 minggu telah menyebabkan steatosis meskipun dalam derajat ringan.

Perlemakan hati akibat pemberian asam lemak *trans* bersifat multifaktoral yang dapat terjadi karena peningkatan peroksidasi lipid, penurunan efisiensi enzim antioksidan, peningkatan pembentukan toksik intermediet, akumulasi radikal O₂⁻ dan H₂O₂ yang membentuk radikal bebas dalam organel, memacu makrofag mengeluarkan sitokin pro inflamasi seperti TNF- α , IL-6, IL-1, dan CRP, peningkatan toksisitas asam lemak bebas, penurunan fungsi mitokondria dan peroximal β -oksidasi, pembentukan oksigen spesies reaktif yang dapat menyebabkan steatosis, inflamasi hati, dan kematian sel hepar (Wardlaw, 2002).

Peningkatan steatosis hepatosit pada penelitian ini bervariasi mulai dari derajat ringan sampai berat, pemberian asam lemak *trans* dengan jumlah kalori sebanyak 80 kal/hari menyebabkan obesitas dan memacu terjadinya resistensi insulin . Perlemakan hati non alkohol dihubungkan dengan resistensi insulin dengan meningkatkan PPAR- α yang memediasi sistem oksidasi asam lemak merangsang lipolisis yang menghasilkan peningkatan asam lemak bebas yang memacu oksidasi lemak atau esterifikasi menjadi trigliserid dan menimbulkan perlemakan di hati.

Jumlah konsumsi makan tikus pada kelompok perlakuan lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol, hal ini disebabkan karena metabolisme lemak lebih lama dibandingkan dengan metabolisme protein dan karbohidrat yang menyebabkan pengosongan lambung lama dan menurunkan keinginan tikus untuk mengkonsumsi makanan .

Peningkatan berat badan tikus yang diberi asam lemak *trans* lebih banyak walaupun jumlah yang dikonsumsi lebih sedikit dari

kelompok kontrol yang membuktikan bahwa efisiensi makanan kelompok tikus dengan asam lemak *trans* mempengaruhi metabolisme lemak. Studi prospektif melaporkan hubungan asupan asam lemak *trans* dan peningkatan adiposit perut, hal ini terjadi karena asam lemak *trans* dikaitkan dengan peningkatan resiko diabetes mellitus tipe 2, merusak sensitivitas insulin yang menyebabkan perubahan struktur membran sel didukung oleh peningkatan prostaglandin, TNF- α dan IL-6 yang dapat menghambat sensitivitas insulin. Hiperinsulinemia dapat mempromosikan akumulasi lipid dengan mengekspresikan aktivitas lipoprotein lipase. Penyakit perlemakan hati non alkohol berhubungan kuat dengan obesitas. Obesitas mengalami penurunan kadar adiponektin yang akan menyebabkan penurunan daya proteksi hati terhadap lemak sehingga terjadi resistensi insulin (Kavanagh, 2003).

Respon inflamasi pada penelitian ini umumnya berat, meningkat seiring dengan peningkatan dosis asam lemak *trans*, dimana derajat inflamasi pada kelompok asam lemak *trans* dosis 10 % lebih berat dibanding dosis 5 %. Sel inflamasi yang ditemukan banyak sel limfosit, dan sedikit mononuklear, polimorfonuklear dan eosinofil., sel radang banyak ditemui di daerah zona 3 hati.

Proses inflamasi dipacu oleh peningkatan ROS yang terbentuk sebagai produk peroksidasi lipid. Asam lemak *trans* memiliki ikatan rangkap yang dapat meningkatkan peroksidasi lipid (Dhibi M, 2011). Peroksidasi lipid adalah proses degradasi oksidatif dari PUFA yang terjadi di membrane fisiologis dan dapat menyebabkan gangguan fungsi membran. Peningkatan sel radang pada penelitian ini menandakan adanya inflamasi akut yang terjadi akibat asam lemak *trans* yang mengaktifkan jalur inflamasi di hati yang diperankan oleh monosit, makrofag (sel Kupffer) dan adiposit, dimana asam lemak *trans* berikatan dengan *toll like receptor* (TLR4) dan mengaktifkan faktor transkripsi (

NF- κ B) dan gen transkripsi untuk menghasilkan sitokin peradangan akut seperti TNF- α , IL-6, CRP, pengaktifan sitokin proinflamasi merangsang penarikan neutrofil dan monosit selama inflamasi akut (Abbas AK, 2006)

Resistensi insulin yang memicu stres oksidatif memiliki peranan terhadap inflamasi di hati dan merangsang sitokin proinflamasi. Stres oksidatif menyebabkan gangguan oksidasi lemak di mitokondria, menghambat β -oxidation dan respirasi yang berakibat terhadap penurunan ATP dan peningkatan pembentukan ROS yang melanjutkan *caspase* respon inflamasi. *Cascade* proinflamasi ini akan dilanjutkan oleh sekresi TNF, IL 6 dan IL 1- β oleh aktivasi makrofag.

Degenerasi *ballooning* ditemukan pada pemberian asam lemak *trans* dosis 10 % dengan jumlah yang sedikit. Degenerasi *ballooning* terjadi karena stres oksidatif dari asam lemak *trans* menyebabkan disfungsi pada sitoplasma hepatosit terutama pada mitokondria. Mitokondria hepatosit mengalami penurunan kecepatan resintesis ATP, yang menginduksi β -oxidation dan dapat membentuk *superoxide anion radical*, *hydrogen peroxide*, *hydroxyl radical* dan *peroxynitrite (ONOO-)* dengan adanya kadar *inducible nitric oxide synthase (iNOS)* tereduksi, meningkatkan pembentukan ROS mitokondria yang merusak mitokondria dan kematian sel hepar.

Peningkatan jumlah lemak, sel-sel radang maupun adanya degenerasi *ballooning* dalam penelitian ini menyebabkan hati menjadi membesar hal ini melengkapi penelitian Roberta Machado,dkk tahun 2011, dimana konsumsi asam lemak *trans* dosis 15 % dapat menyebabkan hepatomegali. Keterbatasan Penelitian ini tidak dapat melihat proses yang menyebabkan perlemakan hati non alkohol pada tikus seperti mengukur aktivitas oksidasi, resistensi insulin dan peningkatan sitokin proinflamasi TNF- α , IL-6 dan IL-1.

3. Simpulan dan saran

a. Simpulan

Konsumsi asam lemak *trans* dosis 5 % dan 10 % selama 8 minggu menyebabkan perlemakan hati non alkohol, dimana derajat 5 % dengan steatosis dan inflamasi derajat ringan dan dosis 10 % steatosis sedang ke berat, inflamasi berat dan jumlah *ballooning* yang sedikit.

b. Saran

Penelitian lanjut tentang herbal atau antioksidan untuk perbaikan perlemakan hati dapat menggunakan model hewan coba dengan efek asam lemak *trans* dosis 5 % dan 10 %.

PUSTAKA

- Abbas A.K, dan Litcman A.H. 2006. *Basic Immunology Update* 2nd Ed. Philadelphia : WB Saunders Company.
- Brunt E.M dan Tiniakos D.G. 2010. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.*, 16(42) : 5286-96
- Dhibi M, Brahmi F, Mnari A, Houas Z, Chargui I, Bchir L, at al. 2011 The intake of high fat diet with different *trans* fatty acid levels differentially induces oxidative stres and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. *Nutr Metab (Lond).*, 23;8(1):65.
- Dorfman S.E, Laurent D, Gounarindes, Li X, Mullarkey T.L, and Rocheford E.C. at.al. 2009. Metabolic implication of dietary *trans* fatty acid. *Obesity J org.*, 17 (6) ; 1200-7
- Hasan , Lesmana L.R, Gani RA, Machmud R, Akbar N, and Noer HMS. et al. 2007. Prevalance and risk factors for non alcoholic fatty liver in Indonesia. PIN XIV PPHI, Konas XIII PGI-PEGI, Surabaya .
- Kavanagh K, Jones KL, Sawyer J, Kelley K, Carr JJ, Wagner JD, Rudel LL, et al. 2007. Trans fat diet induces abdominal obesity and changes in insulin sensitivity in monkeys. *Obesity* ;15(7):1675-84.
- Laporan pelaksanaan surkesda, Dinas Kesehatan Jogja .2008. <http://www.dinkes.jogjaprov.go.id/> tanggal akses : 10 Mei 2011
- Martinez M.G. Garcia V.E, at al. 2010. Dietary *trans* fatty acids and its metabolic implications. *Gac Med Mex.*, 146(4):281-8
- Roberta MM, Jose TS, Claudia PM, Evandro SM, Fabiana DF, Valeria SN, at.al. 2011. Intake of *trans* Fatty Acids Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Reduces Adipose Tissue Fat content J. *Nutr.* ; 140: 1127–32.
- Sartika RAD. 2008. Pengaruh asam lemak jenuh, tidak Jenuh dan asam lemak *trans* terhadap kesehatan, *Jurnal Kesehatan Masyarakat nasional.*, 4 (2): 154-9
- Sey AV. 2003. Nonalcoholic fatty liver disease: Epidemiology and diagnosis *HepatoJ*; 37: 917-23.
- Wardlaw GM & Kessel MW. 2002. *Perspectives in Nutrition*. 5 th edn. ydney. p. 226-7