

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh ALA terhadap Tingkat Survival

Tingkat survival berdasarkan analisis dengan Kaplan-Meier menunjukkan tingkat survival paling rendah pada kelompok DA500 yang hanya bertahan hingga minggu kedua. Tingkat survival paling tinggi terjadi pada kelompok NTA, sedangkan kelompok DTA, DA80, dan DA200 terus-menerus menunjukkan penurunan tingkat survival setelah minggu pertama. Perbedaan tingkat survival terlihat pada kelompok DA500 dengan NTA dan DA500 dengan kelompok DTA, DA80, dan DA200. Hasil uji beda dua sampel independen menunjukkan perbedaan signifikan tingkat survival antara kelompok NTA dengan DA80, DA200, dan DA500, tetapi tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok NTA dengan DTA. Pada kelompok yang mendapatkan perlakuan diabetes, tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok DTA dengan DA80 maupun DA200 dan terjadi perbedaan signifikan antara kelompok DTA dengan DA500. Pada kelompok ALA, tingkat survival kelompok DA80 dan DA200 menunjukkan persamaan dan terdapat perbedaan signifikan tingkat survival kedua kelompok tersebut terhadap DA500. Hubungan perlakuan dengan tingkat survival merupakan hubungan kuat, negatif, dan signifikan yang menunjukkan kelompok perlakuan ALA dengan dosis paling tinggi justru menunjukkan tingkat mortalitas paling tinggi.

Tingkat mortalitas yang tinggi pada dosis 500 mg/kg berat badan bukan disebabkan toksisitas pada dosis tersebut karena LD₅₀ terjadi pada dosis lebih dari 2000 mg/kg berat badan. Pada dosis 2000 mg/kg berat badan, tikus menunjukkan tanda-tanda sedasi, piloereksi, lesu, membungkuk, dan mata

tertutup (Shay, 2009). Namun, pada penelitian ini tikus dengan dosis 500 mg/kg berat badan tidak menunjukkan tanda-tanda tersebut. Selain itu, kematian juga terjadi pada kelompok DTA, DA80, dan DA200 yang terus-menerus terjadi setelah minggu pertama meskipun berdasarkan analisis Kaplan-Meier tingkat mortalitas tidak setinggi DA500. Hal ini menunjukkan tingginya kematian yang terjadi pada tikus bukan karena efek toksik ALA.

Kematian yang terjadi pada kelompok DTA kemungkinan disebabkan oleh peningkatan stres oksidatif akibat hiperglikemia yang merusak jaringan jantung dan diikuti kondisi iskemia. Mortalitas yang terjadi pada DA80, DA200, dan DA500 kemungkinan disebabkan efek ALA mengaktifasi MAPK p38 (*Mitogen Activated Protein Kinase*) yang merupakan salah satu mekanisme ALA dalam meningkatkan ambilan glukosa ke dalam sel. Penelitian Konrad dkk. (2001) menunjukkan aktivitas ALA meningkatkan pengangkutan glukosa ke dalam sel melalui aktivasi *phosphoinositide-3-kinase* (PI3K) dan MAPK p38 yang bersama-sama meningkatkan ambilan glukosa ke dalam sel. Namun, MAPK p38 memiliki efek yang tidak baik pada kondisi iskemia. Pada kondisi iskemia, MAPK menstimulasi glikolisis dan oksidasi asam lemak yang memperburuk penyembuhan setelah kondisi iskemia. Hal ini disebabkan peningkatan oksidasi asam lemak menekan oksidasi glukosa dan proses glikolisis tetap berlanjut sehingga terjadi ketidakseimbangan antara glikolisis dan oksidasi glukosa yang menyebabkan produksi proton sitosolik dan asidosis intraselular (Tian dan Balsch, 2006). Selain itu, aktivasi MAPK p38 menyebabkan peningkatan sintesis kolagen yang menimbulkan produksi matriks ekstraselular yang berlebihan dan berdampak pada peningkatan kekakuan jantung (Chun-jun Li dkk., 2012)

Tingkat mortalitas kelompok DA80 dan DA200 berbeda signifikan dengan kelompok DA500. Hal ini menunjukkan aktivasi MAPK p38 tidak sebesar pada dosis 500 mg/kg berat badan sehingga efek penurunan fungsi jantung pada

kedua kelompok tersebut tidak sebesar pada kelompok DA500. Tingkat survival kelompok DTA dan NTA secara statistik tidak menunjukkan perbedaan signifikan. Hal ini disebabkan aktivasi jalur yang melindungi sel jantung dari apoptosis akibat paparan radikal bebas. Penelitian Ma G dkk. (2006) menunjukkan dua minggu setelah induksi streptozotocin yang diinduksi infark miokard ukuran infark dan aktivasi caspase-3 lebih rendah dibandingkan tikus normal. Lalu, kepadatan kapiler, VEGF, protein eNOS, dan AKT meningkat pada tikus tersebut. Hal tersebut menunjukkan mekanisme perlindungan jantung pada kondisi awal diabetes. Pada penelitian ini, mekanisme perlindungan sel-sel jantung berperan dalam menurunkan tingkat mortalitas pada kelompok DTA.

6.2 Pengaruh ALA terhadap Berat Badan

Berat badan kelompok DTA lebih rendah dibandingkan kelompok NTA pada minggu pertama. Diabetes menyebabkan penurunan berat badan yang disebabkan oleh gangguan pemasukan glukosa ke dalam sel sehingga lemak dan protein dimetabolisme menjadi asam lemak dan asam amino sebagai sumber energi (Kimble, 2009). Kelompok perlakuan ALA pada ketiga dosis tidak menunjukkan perbedaan. Hal ini berhubungan dengan gula darah yang belum terkontrol pada minggu pertama sehingga peningkatan proteolisis dan lipolisis tetap terjadi untuk sumber energi. Selain itu, penurunan berat badan kelompok perlakuan ALA pada minggu pertama kemungkinan disebabkan oleh efek samping ALA yang mempengaruhi asupan pakan. Efek samping yang ditimbulkan oleh penggunaan ALA melalui rute peroral yaitu kehilangan nafsu makan dan sensasi pahit pada tenggorokan (Porasuphatana dkk., 2012). Kemungkinan efek samping tersebut menyebabkan penurunan asupan pakan sehingga terjadi penurunan berat badan. Namun, efek samping tersebut dapat

ditoleransi oleh kelompok DA80 dan DA200 yang menunjukkan peningkatan berat badan pada minggu keempat.

Berat badan keempat kelompok pada minggu keempat tidak menunjukkan perbedaan, tetapi masing-masing kelompok menunjukkan peningkatan berat badan dari minggu pertama. Peningkatan berat badan paling tinggi terjadi pada kelompok DA80 dan DA200, sedangkan peningkatan paling kecil pada kelompok NTA. Namun, secara statistik tidak ada perbedaan yang signifikan dan tidak ada hubungan signifikan antara perlakuan dengan kenaikan berat badan. Peningkatan berat badan pada tikus normal merupakan hal yang wajar karena semakin bertambahnya usia pemberian pakan sesuai standar akan meningkatkan berat badan tikus. Kenaikan berat badan pada kelompok ALA disebabkan peningkatan ambilan glukosa ke dalam sel yang akan dimetabolisme sebagai sumber energi sehingga pemecahan lemak dan protein yang menurunkan berat badan dapat dihindari. DTA juga menunjukkan kenaikan berat badan karena peningkatan oksidan yang menstimulasi pengangkutan glukosa ke dalam sel sehingga pemecahan lemak dan protein pada otot dapat dihindari.

6.3 Pengaruh ALA terhadap Kadar Gula Darah Puasa

Kadar gula darah tikus DTA lebih tinggi dibandingkan tikus NTA pada minggu pertama karena telah terjadi kerusakan sel beta pankreas pada tikus. Dosis streptozotocin 60 mg/kg berat badan yang digunakan telah menyebabkan reaksi autoimun yang merusak sel beta pankreas dan onset diabetes mellitus terjadi tujuh hari setelah induksi. Kelompok perlakuan ALA dengan dosis 80 dan 200 menunjukkan kadar gula darah yang lebih rendah dibandingkan DTA pada minggu pertama. Hal ini disebabkan oleh aktivitas ALA sebagai antioksidan yang membantu regenerasi sel-sel beta pankreas. Hasil tersebut juga sama dengan penelitian Balkis dkk. (2008) yang menunjukkan bahwa efek penurunan kadar

gula darah puasa pada tikus diabetes induksi streptozotocin berasal dari aktivitas antioksidan ALA yang menstimulasi regenerasi sel-sel beta pankreas. Efek penurunan gula darah juga berasal dari aktivitas ALA yang menyerupai kerja insulin. ALA dapat menstimulasi ambilan glukosa pada 3T3-L1 adiposit dan L6 myotube melalui translokasi GLUT-1 dan GLUT-4 (Konrad dkk, 2001). Aktivitas tersebut tidak tergantung oleh insulin karena pada kondisi diabetes mellitus tipe 1 dengan defisiensi insulin penurunan gula darah puasa tetap terjadi.

Kelompok ALA yang mendapatkan dosis 80 mg/kg menunjukkan kadar gula darah yang lebih rendah daripada kelompok yang mendapatkan dosis lain pada minggu pertama maupun keempat. Hal ini sesuai dengan penelitian Kishi dkk. (1999) yang menggunakan empat dosis ALA yaitu 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, dan 100 mg/kg secara intraperitoneal ternyata menunjukkan ambilan glukosa paling besar terjadi pada dosis 50 mg/kg. Hal tersebut menunjukkan adanya hubungan antara dosis ALA dengan respon yang ditimbulkan dan respon ambilan glukosa tidak terjadi pada dosis yang paling tinggi.

Respon gula darah pada ALA dosis 80 mg/kg berat badan berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya. Berdasarkan penelitian Shotton dkk. (2003), ALA dosis 80 mg/kg yang diberikan pada tikus diabetes tipe 1 dalam pakan selama delapan minggu tidak menunjukkan perbedaan gula darah yang signifikan dibandingkan tikus diabetes yang tidak mendapatkan ALA. Ketiadaan respon terhadap gula darah disebabkan perbedaan cara pemberian ALA pada penelitian Shotton dengan pakan dan penelitian ini dengan penyondean. Perbedaan cara pemberian menyebabkan perbedaan bioavailabilitas ALA karena berdasarkan penelitian Shay dkk. (2009) akan terjadi interaksi antara makanan dengan ALA yang akan menyebabkan penurunan absorpsi. Oleh sebab itu, ALA yang diberikan langsung dengan penyondean lebih tinggi bioavailabilitasnya

dibandingkan pakan yang mengandung ALA sehingga aktivitasnya di dalam tubuh juga semakin besar.

Penurunan gula darah paling tinggi terjadi pada kelompok DTA dan paling rendah pada DA200. Secara statistik, tidak ada perbedaan dan hubungan yang signifikan antara perlakuan dengan penurunan gula darah puasa. Hal tersebut dapat diketahui dari hasil analisis yang menunjukkan kelompok diabetes dengan atau tanpa perlakuan ALA sama-sama menunjukkan penurunan gula darah puasa. Efek penurunan gula darah pada minggu keempat oleh ALA terkait aktivitas farmakologinya dalam menurunkan gula darah. Kelompok DTA menunjukkan penurunan gula darah paling tinggi dibanding DA80 dan DA200 hal ini disebabkan kondisi stres oksidatif yang meningkatkan ambilan glukosa. Oksidan menstimulasi ambilan glukosa melalui peningkatan ekspresi GLUT-1 pada mRNA dan protein melalui aktivasi activator-protein 1 yang berikatan dengan enhancer 1 gen GLUT-1 (Khanna dkk., 2010). Melalui mekanisme tersebut, pengangkutan glukosa ke dalam sel dapat meningkat.

6.4 Pengaruh ALA terhadap Rasio Berat Jantung/Berat Badan

Hipertrofi sel-sel jantung merupakan salah satu tanda kompensasi iskemia. Hipertrofi merupakan upaya untuk mempertahankan volume stroke yang timbul akibat peningkatan sintesis protein dan sarkomer yang disebabkan oleh gen c-jun (Kang, 2001). Pada penelitian ini, hipertrofi ditunjukkan dengan peningkatan rasio berat jantung terhadap berat badan. Kelompok diabetes DTA, DA80, dan DA200 menunjukkan rasio berat jantung hampir sama. Peningkatan berat jantung pada DTA merupakan *cardiac remodelling* yang diinduksi oleh stres oksidatif. Pada kelompok DA80 dan DA200, peningkatan berat jantung kemungkinan disebabkan oleh peningkatan kolagen yang disebabkan aktivasi MAPK p38.

Kelompok DA500 menunjukkan rasio bobot jantung lebih rendah dibandingkan kelompok DTA, DA80, dan DA200. Namun, histologi menunjukkan kerusakan jaringan telah terjadi pada kelompok tersebut dan menyebabkan kematian sehingga belum ada upaya kompensasi setelah iskemia. Penelitian Shotton dkk. (2003) dan Midaoui dan Champlan (2002) yang menjadi dasar penetapan dosis oral ALA dalam penelitian ini tidak menguji efek ALA terhadap rasio berat jantung terhadap berat badan. Namun, penelitian Eun Lee dkk. (2012) yang juga menjadi standar penetapan dosis oral ALA menguji efek terhadap rasio berat jantung terhadap berat badan yang menunjukkan penurunan signifikan rasio berat jantung pada tikus *Otsuka Long-Evans Tokushima fatty* (OLETF) diabetes dibandingkan tikus diabetes setelah perlakuan 16 minggu. Jika dibandingkan dengan hasil penelitian Eun Lee, terlalu banyak perbedaan berkaitan dengan jenis diabetes dan lama perlakuan. Hasil uji statistik tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada masing-masing kelompok. Uji korelasi juga tidak menunjukkan hubungan antara kelompok DTA, DA80, DA200, dan DA500 terhadap rasio berat jantung.

6.5 Pengaruh ALA terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Jantung

Malondialdehid (MDA) merupakan produk peroksidasi lipid yang meningkat pada kondisi diabetes mellitus. Pada penelitian ini, MDA kelompok DTA lebih tinggi dibandingkan kelompok NTA yang menunjukkan tingkat stres oksidatif yang berat pada jantung dengan kondisi diabetes mellitus. Kelompok perlakuan ALA menunjukkan kadar MDA lebih rendah dibandingkan DTA, tetapi lebih tinggi dibandingkan kelompok NTA. Secara statistik, tidak ada perbedaan signifikan pada kadar MDA masing-masing kelompok. Lalu, tidak ada hubungan yang signifikan antara perlakuan dengan kadar MDA.

Tidak ada perbedaan secara statistik antara kelompok NTA dengan DTA pada kadar MDA. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya peningkatan aktivitas antioksidan enzimatis pada jantung tikus diabetes mellitus tipe 1. Penelitian Rodriguez dkk. (2011) menunjukkan peningkatan signifikan dari aktivitas enzim katalase pada jantung tikus diabetes mellitus induksi streptozotocin dibandingkan tikus normal sehingga mampu menurunkan proses peroksidasi lipid. ALA dosis 80 mg/kg berat badan dan 200 mg/kg berat badan menurunkan kadar MDA melalui aktivitas menangkap radikal bebas sehingga peroksidasi lipid dapat menurun. Pada kelompok DA500, MDA tidak diukur karena jarak kematian dan pembedahan tikus tergolong lama. Pengukuran MDA pada sampel organ harus dalam kondisi segar untuk menghindari positif palsu. Logam besi pada organ maupun reagen dapat mempercepat dekomposisi lipid peroksida yang menyebabkan peningkatan kadar MDA (Sochor, 2012). Oleh sebab itu, darah yang kaya zat besi pada serambi jantung harus dihilangkan untuk menghindari kondisi tersebut.

6.6 Pengaruh ALA terhadap Struktur Jantung

Struktur jantung tikus DTA menunjukkan pelebaran sel-sel jantung pada bagian ventrikel kiri dan septum ketika dibandingkan dengan NTA. Kondisi ini menandakan telah terjadi kompensasi setelah peningkatan apoptosis yang disebabkan oleh stres oksidatif. Pelebaran sel-sel jantung disebabkan oleh aktivasi gen *c-jun* sebagai respon terhadap peningkatan beban jantung yang diakibatkan penurunan kontraktilitas jantung (Kang, 2001). Selain hipertrofi sel jantung dan dilatasi ventrikel, perubahan jantung yang disebabkan apoptosis ditandai dengan akumulasi kolagen (Rodriguez dkk., 2011). Namun, penelitian ini tidak mengamati dilatasi ventrikel dan kolagen yang terdeposisi pada jaringan jantung.

Pelebaran serabut otot ventrikel dan septum tidak terjadi pada kelompok DA80. Namun, pencegahan pelebaran otot tersebut bukan disebabkan penurunan stres oksidatif karena kadar MDA tidak menunjukkan perbedaan antara masing-masing perlakuan dan hipertrofi sel-sel jantung tetap terlihat pada kelompok DTA. Hal ini disebabkan aktivitas ALA yang mencegah pelebaran sel-sel jantung bukan dari aktivitas sebagai antioksidan. ALA memiliki aktivitas penghambatan aktivasi NF- κ B (Golbidi, 2011). Aktivasi NF- κ B menyebabkan peningkatan TNF- α , IL-1, dan IL-2 yang berefek menurunkan regulasi protein retikulum sarkoplasmik, menghambat kontraksi, dan menginduksi apoptosis pada sel-sel jantung (Blum, 2009). Melalui aktivitas tersebut, peningkatan apoptosis dan pelebaran sel-sel jantung dapat dicegah.

Kelompok DA200 tidak menunjukkan pelebaran sel-sel jantung pada ventrikel, tetapi pelebaran justru terlihat di bagian septum. Hal ini menunjukkan efek pencegahan aktivasi NF- κ B tergantung pada dosis yang digunakan. Kelompok DA500 menunjukkan pelebaran sel jantung pada ventrikel kiri dan septum. Bagian serabut otot ventrikel meregang dan kerusakan sel jantung terjadi pada bagian septum. Pada dosis 500 mg/kg berat badan, respon ALA terhadap aktivasi MAPK p38 lebih besar dibandingkan dosis lainnya sehingga terjadi kerusakan jaringan jantung.

Infiltrasi sel-sel penginflamasi terlihat pada jaringan otot ventrikel dan septum pada semua kelompok. Infiltrasi sel-sel penginflamasi pada kondisi normal merupakan respon dari vaskular terhadap patogen atau iritan sebagai upaya menghilangkan stimulus berbahaya, melindungi jaringan di sekitarnya, dan mengawali proses penyembuhan (Shay, 2009). Oleh sebab itu, serabut otot jantung ventrikel dan septum kelompok NTA menunjukkan infiltrasi sel-sel penginflamasi. Namun, pada kondisi diabetes peningkatan stres oksidatif akan meningkatkan jumlah sel-sel penginflamasi pada jaringan (Rodriguez dkk., 2011).

Hal tersebut terlihat pada jaringan ventrikel dan septum kelompok DTA yang menunjukkan jumlah sel-sel penginflamasi lebih banyak dibandingkan NTA. Peningkatan infiltrasi sel-sel tersebut disebabkan oleh stres oksidatif yang mengaktivasi NF- κ B dan aktivasi faktor transkripsi tersebut menginduksi ekspresi gen-gen yang terlibat dalam inflamasi (Shay, 2009). Selain itu, stres oksidatif juga mengaktivasi *nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase-1* (PARP-1) yang juga meningkatkan ekspresi mediator-mediator inflamasi.

Infiltrasi sel-sel penginflamasi pada kelompok DA80 di bagian septum dan ventrikel sama dengan NTA. Hal ini disebabkan oleh ALA yang menghambat aktivasi NF- κ B sehingga infiltrasi sel-sel penginflamasi dalam jumlah besar dapat dihambat. Pada kelompok DA200, infiltrasi sel-sel penginflamasi ventrikel kiri hampir sama dengan NTA. Namun, infiltrasi sel-sel tersebut lebih banyak pada bagian septum. Hal tersebut sesuai dengan kondisi sel-sel jantung septum DA200 yang melebar akibat aktivasi NF- κ B sehingga dapat disimpulkan efek ALA menghambat aktivasi NF- κ B tergantung dosis yang digunakan. Pada dosis 500 mg/kg berat badan, infiltrasi sel-sel penginflamasi lebih banyak dibandingkan kelompok NTA, DTA, DA80, dan DA200 baik pada bagian septum maupun ventrikel karena aktivasi MAPK p38 yang menyebabkan kerusakan jaringan dan memicu respon fagositosis oleh sel-sel penginflamasi.