

## BAB VI

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Asupan Pakan Hewan Coba

Tingkat konsumsi adalah jumlah makanan yang terkonsumsi atau termakan oleh hewan bila makanan tersebut diberikan secara *ad libitum* (secara bebas dan terus menerus hingga hewan coba berhenti sendiri sesuai keinginan) (Abidah *et al.*, 2014). Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara asupan kelompok aterogenik modifikasi AIN-93M dengan asupan kelompok normal standar AIN-93M. Jumlah rata-rata asupan pada tikus diet aterogenik modifikasi AIN-93M sebesar 8,73 gram per hari dan rata-rata asupan pada tikus diet normal standar AIN-93M sebesar 10,41 gram per hari. Menurut *Nebendahl* (2000), tingkat konsumsi pakan normal pada tikus sebesar 8-20 gram per hari (*growing rat*) dan 15-20 gram per hari (*fully grown rat*). Tikus akan mengalami *fully grown rat* (tikus dewasa) sekitar usia 10-12 minggu (2½ - 3 bulan). Berdasarkan usia tikus penelitian, tikus penelitian termasuk dalam kategori *fully grown rats* ( $\pm$  3 bulan), hal ini menunjukkan bahwa tingkat konsumsi pakan tikus penelitian lebih rendah pada kedua kelompok perlakuan (aterogenik dan normal) dibandingkan dengan tingkat konsumsi pakan normal *fully growing rat*.

Pada penelitian lain juga menyatakan bahwa tingkat konsumsi normal pada tikus berkisar antara 12-30 gram per hari dengan bentuk *dry food* (Canadian Council on Animal Care, 2006). Menurut penelitian yang menggunakan diet AIN-93M, rata-rata tingkat konsumsi pada tikus sebesar

9,96 gram per hari (Sulchan dan Endang, 2007). Pada penelitian Fassini *et al.* (2011), rata-rata asupan pakan tikus yang diberi diet normal AIN-93M sebesar 15,47 gram dan diet aterogenik dengan penambahan kolesterol dan asam kolat sebesar 16,74 gram. Hal ini menunjukkan bahwa rata-rata tingkat konsumsi tikus penelitian yang dilakukan lebih rendah dibandingkan dengan tingkat konsumsi normal tikus dewasa.

Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara asupan kelompok diet aterogenik modifikasi standar AIN-93M dengan asupan kelompok diet normal standar AIN-93M dengan nilai  $p=0.012$  ( $\alpha=0.05$ ) dengan rata-rata asupan pakan pada kelompok normal standar AIN-93M lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok aterogenik modifikasi standar AIN-93M. Tingkat konsumsi pada setiap perlakuan hewan coba mengalami perubahan pada setiap minggunya. Perubahan tingkat konsumsi pada tikus itu sendiri dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti cita rasa, tekstur, ukuran dan konsistensi pakan (Abidah *et al.*, 2014).

Secara segi organoleptik, bentuk makanan dari diet normal lebih keras dibandingkan dengan diet aterogenik dan aroma yang ditimbulkan dari diet aterogenik lebih tengik dibandingkan diet normal. Ketengikan bisa terjadi pada diet aterogenik karena adanya penambahan bahan yang mengandung lemak tak jenuh seperti kolesterol sehingga mudah mengalami oksidasi dan menjadi tengik (Winarno, 2002) sehingga tikus menolak untuk makan (Siagian, 2002). Selain itu, faktor kondisi lingkungan juga bisa mempengaruhi tingkat asupan, dimana suhu ruang yang tinggi dapat menurunkan asupan pada tikus, dan faktor lain seperti kelembaban

(Nebendahl, 2000). Pada penelitian ini suhu ruangan berkisar 26-40°C, sedangkan suhu ruangan yang normal yaitu 20-24°C. Pengaruh lain yaitu faktor stress akibat tempat tinggal yang tidak nyaman dan/atau kejenuhan saat diberikan diet (Abidah *et al.*, 2014). Pada penelitian ini, pemberian perlakuan pakan secara *ad libitum* mampu memberikan respon tingkat kesukaan pada setiap hewan coba berbeda sehingga terjadi perbedaan pada tingkat konsumsi setiap hewan coba.

Pada penelitian ini, masing-masing pakan yang diberikan memiliki kandungan energi sebesar 438,06 kkal per 100 gram untuk diet aterogenik modifikasi standar AIN-93M dan 335,18 kkal per 100 gram untuk diet normal standar AIN-93M. Kandungan energi yang diberikan setiap kali makan yaitu 131,42 kkal per 30 gram untuk diet aterogenik modifikasi standar AIN-93M dan 100,55 kkal per 30 gram untuk diet normal standar AIN-93M. Zat gizi pada diet aterogenik modifikasi standar AIN-93M memiliki energi lebih besar dibandingkan dengan diet normal standar AIN-93M yang diberikan pada kelompok perlakuan. Densitas energi pada diet aterogenik modifikasi standar AIN-93M sebesar 4,179 kkal/gram dan diet normal standar AIN-93M sebesar 3,202 kkal/gram. Berdasarkan penelitian Sulchan dan Endang (2007), menyatakan bahwa asupan makan menurun karena semakin meningkatnya densitas energi diet yang diberikan. Hal ini terjadi berkaitan dengan daya tampung maksimum dari lambung hewan untuk mengkonsumsi pakan (Sulchan dan Endang, 2007).

Perbedaan asupan makan pada tikus dipengaruhi juga oleh komposisi zat gizi. Asupan lemak pada diet aterogenik modifikasi standar AIN-93M lebih tinggi dibandingkan dengan diet normal standar AIN-93M

yaitu 1,43 gram/hari dan 0,43 gram/hari, hal ini disebabkan karena kandungan lemak pada diet aterogenik modifikasi standar AIN-93M lebih tinggi daripada diet normal standar AIN-93M yaitu 33,72% dari total energi dan 11,21% dari total energi. Komposisi lemak yang tinggi pada makanan mengakibatkan sekresi leptin meningkat sehingga leptin yang disekresi oleh jaringan adipose dan hepar menstimulasi peningkatan deposit lemak tubuh dan kemudian leptin mengirim sinyal pada otak untuk menurunkan asupan makanan dan meningkatkan pengeluaran energi. Hal ini menyebabkan kelompok dengan asupan tinggi lemak cenderung mengkonsumsi pakan lebih rendah (Ma'aruf, 2005). Berdasarkan *Bayless* dan *Diehl* (2005), saluran pencernaan membutuhkan waktu yang lebih lama untuk mencerna lemak sehingga pengosongan lambung akan lebih lambat sehingga menimbulkan rasa kenyang dan menghentikan asupan pakan.

## 6.2 Berat badan Hewan Coba

Pertumbuhan dan perkembangan yang baik dari makhluk hidup ditandai dengan terjadinya kenaikan berat badan yang mengikuti bentuk kurva pertumbuhan yang sigmoid. Pertumbuhan dan perkembangan berat badan sangat dipengaruhi oleh nutrisi makanan terutama protein, kandungan energi, aktivitas metabolisme, dan aktivitas fisik hewan coba (Sulchan dan Endang, 2007).

Berdasarkan uji independent t-test pada berat badan tikus sebelum dan sesudah perlakuan tidak berbeda secara signifikan pada semua kelompok perlakuan yaitu hasil  $p=0.337$  ( $\alpha=0.05$ ) dan  $p=0.190$  ( $\alpha=0.05$ ). Penurunan berat badan pada kelompok aterogenik modifikasi standar AIN-

93M sebesar 57,63 gram sedangkan kelompok normal standar AIN-93M sebesar 71,88 gram dengan rata-rata berat badan kelompok aterogenik modifikasi standar AIN-93M dari  $203.75 \pm 17.3$  gram menjadi  $146.12 \pm 13.5$  gram dan kelompok normal standar AIN-93M dengan rata-rata berat badan dari  $210.19 \pm 19.96$  gram menjadi  $138.31 \pm 18.97$  gram. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan pada tikus yang diberi diet normal dan diet hiperkolesterolemia (Hashimoto *et al.*, 1998). Penurunan berat badan yang dialami tikus pada penelitian ini, salah satunya disebabkan karena penurunan asupan pada tikus setiap minggunya, dimana asupan makan yang turun dapat menyebabkan kebutuhan gizi yang diperlukan tikus untuk pertumbuhan dan aktifitas fisik mengalami defisiensi. Adanya penurunan jumlah pakan yang diberikan menyebabkan tikus kekurangan energi dan pertumbuhan tidak terjadi. Hal ini terjadi karena konsumsi energi yang kurang, sehingga tubuh mengalami perombakan zat gizi dalam tubuh, dimana menyebabkan penurunan berat badan (Rita, 2001).

Namun pada penelitian El-Shatanovi *et al.* (2012), terdapat perbedaan yang signifikan peningkatan berat badan tikus percobaan pada kelompok normal (25,47 gram) dan aterogenik (48,30 gram) selama 10 minggu. Begitu pula dengan penelitian Abidah *et al.* (2014), mengalami peningkatan berat badan pada tikus yang diberi diet standar AIN normal dan aterogenik sebesar 1,77% dan 5,34%. Hal ini diduga karena terdapat perbedaan komposisi yang terdapat dalam pakan.

Ketidakseimbangan zat gizi dalam pakan dapat menyebabkan gangguan metabolisme didalam tubuh. Pada penelitian zat gizi pada diet

aterogenik modifikasi standar AIN-93M memiliki kandungan energi lebih besar dibandingkan dengan diet normal standar AIN-93M yang diberikan kepada masing-masing kelompok perlakuan. Hal ini juga dipengaruhi oleh kandungan lemak yang menyumbang kandungan energi lebih besar pada kelompok aterogenik. Lemak memiliki peran besar dalam pemenuhan energi yang mengandung 9 kalori/gram sehingga semakin banyak lemak yang dikonsumsi semakin besar pula energinya (Mahan *et al.*, 2012). Maka dari itu, meskipun asupan diet aterogenik lebih rendah tetapi penurunan berat badan pada tikus kelompok aterogenik lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok normal.

Kondisi kekurangan energi akan menyebabkan pengambilan energi untuk aktivitas tubuh dari perombakan zat gizi dalam tubuh yaitu cadangan lemak tubuh yang didegradasi untuk memenuhi kebutuhan energi sehingga terjadi penurunan berat badan dan sulit untuk mengalami keadaan obesitas (Rita, 2001). Jika kebutuhan energi tidak dapat terpenuhi dengan baik maka akan terus mengalami perombakan pada zat gizi lain yaitu cadangan protein, dimana bila terlalu banyak protein yang digunakan makan sel-sel tubuh tidak lagi berfungsi dengan baik sebagaimana mestinya untuk mempertahankan hidup dan akhirnya hewan akan mati (Rita, 2001).

Selain itu menurut Abidah *et al* (2014), kecepatan pertumbuhan hewan coba dipengaruhi beberapa faktor yaitu lingkungan dan zat gizi dalam pakan. Berdasarkan hasil penelitian dan uraian tersebut yaitu asupan yang rendah, lingkungan dan aktivitas fisik pada hewan coba mengakibatkan terjadinya penurunan berat badan.

### 6.3 Kadar Leptin pada Hewan Coba

Leptin diproduksi oleh sel adiposit yang menunjukkan total sel lemak dalam tubuh. Dalam jangka yang panjang kelebihan asupan energi akan menyebabkan peningkatan sel adiposit lemak yang merangsang peningkatan sekresi leptin (Sulastri, 2010). Asupan kronis diet tinggi lemak merupakan salah satu faktor leptin resisten. Selain itu, semakin besar energi yang disimpan semakin besar pula jumlah leptin yang dikeluarkan (Galland, 2011). Apabila asupan tikus lebih besar dibandingkan dengan *energy expenditure* yang dikeluarkan maka akan terjadi peningkatan jaringan adipose dan simpanan lemak sehingga konsentrasi leptin serum akan meningkat, kemudian hipotalamus akan menekan nafsu makan dimana menyebabkan asupan menurun dan *metabolic rate* meningkat (Widmiaier *et al*, 2006), sedangkan pada penelitian ini, asupan tikus mengalami penurunan jumlah asupan setiap minggunya sehingga pembentukan jaringan adiposit dan simpanan lemak rendah.

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna kadar leptin pada kelompok aterogenik modifikasi standar AIN-93M dan kelompok normal standar AIN-93M dengan nilai  $p=0.084$  ( $\alpha=0.05$ ). Didapatkan hasil bahwa rata-rata kadar leptin serum pada kelompok diet aterogenik modifikasi standar AIN-93M sebesar  $5.91 \pm 1.21$  ng/mL dan kelompok diet normal standar AIN-93M sebesar  $4.87 \pm 0.49$  ng/mL. Pada sirkulasi serum normal leptin pada tikus masih dalam batas normal (1-75 ng/mL). Pada penelitian Leibowitz *et al.* (2006), rata-rata kadar leptin tinggi setelah diberikan HFM sebesar 6-9

ng/mL dengan asupan diet tinggi lemak kronis dengan 50% lemak yang diberikan selama 5 minggu.

Menurunnya ekspresi leptin terjadi ketika keadaan lapar dan adanya testosterone, hormon tiroid dan suhu rendah (Limanan, 2013). Kadar leptin menurun dalam 12 jam setelah kelaparan atau selama puasa dan meningkat setelah beberapa hari mengkonsumsi makanan berlebih (Klein dan Romijn, 2008). Puasa menyebabkan penurunan serum leptin yang dipengaruhi juga oleh penurunan insulin dan kemampuan katekolamin untuk mengurangi ekspresi leptin (Fried *et al.*, 2000). Pada penelitian Kolacynski *et al.* (1996), melaporkan bahwa hasil *overfeeding* yang berlebihan menyebabkan peningkatan kadar leptin memuncak antara 5 dan 10 jam setelah memulai *overfeeding* (Dallongeville *et al.*, 1998). Puasa menurunkan kadar leptin sehingga meningkatkan rasa lapar dan menurunkan termogenesis. Puasa terus menerus menyebabkan pemisahan leptin dari jaringan lemak yang menggambarkan efek permesif insulin pada sekresi leptin (Weigle *et al.*, 1997). Pada penelitian ini, tikus dipuaskan selama 12 jam yaitu jam 21.00 WIB hingga 08.00 WIB, dimana kadar leptin akan cenderung menurun dalam 12 jam selama puasa.

Pada penelitian Anggraeni *et al.* (2012), kadar leptin pada tikus *Sprague Dawley* jantan yang diberi pakan tinggi lemak dan diberi pakan normal selama 8 minggu menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan secara signifikan, kadar leptin tikus yang diberi pakan lemak tinggi ( $5.94 \pm 4.96$  ng/mL) cenderung lebih tinggi dibandingkan kadar leptin tikus yang diberi pakan normal ( $4.33 \pm 3.10$  ng/mL). Penelitian lain yang menggunakan tikus putih *Rattus norvegicus* galur *Wistar* yang diberi diet

tinggi lemak dan diet normal selama 12 minggu juga menyatakan bahwa konsentrasi leptin serum lebih tinggi secara signifikan pada kelompok diet tinggi lemak ( $5.462 \pm 3.854$  ng/mL) dibandingkan kelompok diet normal ( $1.513 \pm 0.514$  ng/mL) (Rosita *et al.*, 2009).

Menurut penelitian Hidayat, (2013) menggunakan standar pakan PARS diet aterogenik dengan penambahan kolesterol 2% dan asam kolat 0,2% menyatakan bahwa rata-rata kadar leptin pada serum pada diet aterogenik (918.500  $\mu$ g/ml) lebih tinggi dibandingkan dengan diet normal (699.500  $\mu$ g/ml). Hal ini menyatakan bahwa pemberian aterogenik mampu menimbulkan kenaikan kadar serum leptin (Dubey dan Hesong, 2006). Dari hasil yang diperoleh, rendahnya kadar leptin ini terjadi diduga akibat penurunan berat badan yang mengalami perubahan adipokine dimana produksi *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP 1) mengalami penurunan sehingga kadar leptin dan *free fatty acid* mengalami penurunan dan produksi adiponektin mengalami peningkatan sehingga inflamasi yang terjadi menurun (Luvizotto *et al.*, 2012). Kadar leptin dalam sirkulasi darah dapat meningkat jika ada stimulasi infeksi dan inflamasi (Faggioni *et al.*, 2001).

Pada kelompok tinggi lemak terdapat peningkatan konsentrasi leptin serum karena memiliki berat badan yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok diet normal. Peningkatan berat badan diketahui meningkatkan kadar serum leptin yang mana berperan dalam regulasi berat badan dan intake makanan. Pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak akan mengalami peningkatan jumlah dan ukuran jaringan adiposit (Rosita *et al.*, 2009). Jaringan adipose dapat berperan sebagai organ endokrin yang

menghasil adipokin, salah satunya leptin dan molekul pro inflamasi seperti TNF $\alpha$ , IL-6, TGF  $\beta$ -1, CRP. Terdapat hubungan erat antara derajat serum leptin dan jumlah lemak tubuh dengan mRNA leptin sel lemak sehingga dapat dinyatakan bahwa sekresi leptin adalah refleksi dari perbesaran dan peningkatan jumlah sel lemak (Mountage *et al.*, 1997). Melalui kerja leptin, status nutrisi dapat mempengaruhi sistem imun. Pada keadaan kelaparan atau gizi buruk, dimana kadar leptin menurun terjadi penurunan daya tahan terhadap infeksi akibat kurangnya jumlah aktivitas limfosit (Rosita *et al.*, 2009).

Berdasarkan hasil penelitian Leibowitz *et al.*, (2005), menyatakan bahwa kadar leptin basal berkorelasi positif dengan lemak tubuh pada diet tinggi lemak. Namun, ada kondisi lain dimana kadar leptin bukan dari lemak tubuh tetapi dari sekresi peningkatan adiposit. Pada penelitian pada hewan coba yang diberikan diet kaya lemak dan/atau sukrosa selama 5 minggu, menunjukkan bahwa diet kaya sukrosa dan/atau lemak meningkatkan konsentrasi pusat kenyang serum leptin dan menurunkan pusat lapar ghrelin, Peningkatan adiposit baik peningkatan leptin maupun tekanan ghrelin mampu menahan makanan yang berlebih dikaitkan dengan makanan gurih (Lindqvist *et al.*, 2005). Hal ini menunjukkan bahwa lemak makanan merupakan faktor penting yang berhubungan dengan leptin.

Pada penelitian yang dilakukan kelompok Flyer yang memberikan makanan tikus normal dengan diet *Western type* yang mengandung 40% kalori sebagai lemak selama 12 minggu dan tikus kontrol menerima makanan tikus standar yang mengandung 17,3 lemak menunjukkan bahwa tikus dengan diet tinggi lemak mengalami peningkatan masa lemak tubuh

dari 2,3 menjadi 6,1 gram dan kadar leptin plasma meningkat 2,6 kali (Wardle, 1996). Penelitian lain menyebutkan bahwa tikus yang diberikan diet tinggi lemak (45% sampai 60% kalori dari lemak) akan menyebabkan obesitas dan mengalami hiperleptinemia selama rentang 4 sampai 6 bulan, dengan paparan jangka panjang untuk diet tinggi lemak maka tikus akan menjadi resisten terhadap leptin (Knight *et al.*, 2010). Pada penelitian ini, komposisi dari *atherogenic diet* yang diberikan memiliki kandungan lemak sebesar 33% lebih rendah dari diet tinggi lemak yang mampu menyebabkan hipeleptinemia. Komposisi aterogenik tersebut juga tidak sesuai dengan persentase lemak pada penelitian Handayani *et al.* (2011) yang mencapai 50% dari total kalori untuk membuat diet aterogenik. Komposisi lemak yang tidak sesuai dengan yang diharapkan terjadi akibat terdapat sisa minyak yang tertinggal pada wadah pembuatan pakan yang tidak bisa tercampur. Selain itu, perbedaan perhitungan zat gizi yang dilakukan dalam penelitian Handayani *et al.* (2011) yaitu perhitungan zat gizi pakan didasari pada bahan kering atau mentah sebelum diolah sedangkan pada penelitian ini perhitungan zat gizi pakan dilakukan setelah diolah sehingga proses pengolahan menjadi faktor mempengaruhi komposisi lemak. Selain itu, terdapat perbedaan metode penentuan zat gizi pakan yang digunakan yaitu pada penelitian Handayani *et al.* (2011) menggunakan *nutrisurvey* sedangkan penelitian ini menggunakan uji proksimat, dimana analisis proksimat mampu menilai dan menguji kualitas suatu bahan pakan.

Pada penelitian ini hasil analisa tidak sesuai dengan harapan kemungkinan juga dapat disebabkan oleh beberapa faktor yaitu terjadinya

penurunan berat badan, asupan pakan yang rendah dan faktor stress (tekanan) pada tikus. Stres sendiri juga dapat dialami pada hewan tak terkecuali pada tikus. Selain itu, faktor lingkungan pun merupakan salah satu faktor yang mendukung tikus mengalami stres, misalnya tempat tinggal yang tidak nyaman (Tahani, 2013). Hubungan yang signifikan pada perubahan parameter *physiologic* dengan stres (seperti konsentrasi plasma/serum kortikosteron, glukosa, hormon pertumbuhan dan prolaktin, denyut jantung, tekanan darah dan perilaku) (Balcombe *et al*, 2004).

#### 6.4 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini mempunyai keterbatasan yaitu penelitian menggunakan subjek tikus yang harus lebih teliti dan cermat terutama dalam melakukan penimbangan berat tikus setiap minggunya dan penimbangan banyaknya jumlah sisa pakan yang berada dalam kandang. Terjadi pergantian formulasi pada diet AIN-93M dikarenakan tikus mengalami diare saat penelitian berlangsung yang menyebabkan berat badan tikus menurun. Dalam penelitian ini, tidak dilakukannya uji proksimat pakan pada awal penelitian sehingga tidak sesuai dengan tujuan diet normal AIN-93M dan diet aterogenik modifikasi standar AIN-93M. selain itu, pemeriksaan kadar leptin dilakukan 12 jam setelah tikus dipuaskan sehingga cenderung kadar leptin mengalami penurunan.