

BAB 6

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, tikus percobaan yang digunakan dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok normal (N) sebagai kelompok kontrol (-), kelompok DM (Diabetes Mellitus) sebagai kelompok kontrol (+) yang diberi perlakuan DM tanpa pemberian ekstrak daun kemiri, dan kelompok perlakuan DK1, DK2, dan DK3 yaitu kelompok yang diberi perlakuan DM dan pemberian ekstrak daun kemiri dengan dosis masing-masing 100, 200, dan 400 mg/kgBB/hari. Selama 11 hari tikus diadaptasikan, kemudian kelompok tikus yang diberi perlakuan DM diinduksi dengan diet tinggi lemak dan injeksi Streptozotosin (STZ) dengan dosis 25-30 mg/kgBB untuk membuat tikus dalam kondisi DM tipe 2. Setelah tikus dinyatakan dalam keadaan DM dengan melihat dari gula darah tikus, maka keadaan itu dipertahankan selama 28 hari. Kemudian selama 28 hari berikutnya diberikan terapi ekstrak daun kemiri sesuai dosis masing-masing kelompok perlakuan. Setelah itu tikus dibedah untuk diambil organ hepar dan dibuat menjadi sediaan histopatologi dengan pewarnaan HE untuk dievaluasi gambaran histopatologi hepar tikus dan dihitung jumlah sel hepar yang mengalami perlemakan. Tujuan utama dari penelitian ini untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak daun kemiri terhadap gambaran histologi perlemakan hepar pada tikus galur Wistar model DM tipe 2.

Pemberian diet tinggi lemak pada tikus bertujuan untuk memberikan kondisi obesitas pada tikus. Hal ini disesuaikan pada manusia di mana obesitas menjadi salah satu faktor risiko terjadinya DM tipe 2 (ADA, 2011). Sementara itu, pemberian STZ dapat merusak sel β pankreas di mana pada pemberian dosis

sedang STZ dapat menginduksi hiperglikemia dengan progres lambat, mengindikasikan terjadinya DM tipe 2 karena peningkatan resistensi insulin (Deeds *et al.*, 2011). Untuk itu, pemberian diet tinggi lemak bertujuan untuk mempercepat terbentuknya kondisi DM tipe 2 di samping pemberian STZ dengan dosis 25-30 mg/kgBB.

Berdasarkan hasil penelitian jumlah perlemakan hepar pada lampiran 1, didapatkan rerata untuk kelompok N sebesar $18,83 \pm 8,10$; kelompok DM sebesar $27,20 \pm 11,10$; kelompok DK1 $35,73 \pm 7,78$; kelompok DK2 $39,10 \pm 8,56$; dan kelompok DK3 $38,65 \pm 3,28$. Hasil uji *One way ANOVA* menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antara jumlah perlemakan hepar antar kelompok ($p = 0,013$; $p < 0,05$). Sementara itu, hasil uji *Post Hoc* dengan metode LSD didapatkan kelompok yang berbeda secara bermakna ($p < 0,05$) yaitu antara kelompok N dengan kelompok DK1 ($p = 0,010$), kelompok N dengan kelompok DK2 ($p = 0,003$), dan kelompok N dengan kelompok DK3 ($p = 0,004$).

Diabetes Mellitus tipe 2 dapat menyebabkan berbagai komplikasi, salah satunya terjadinya perlemakan hati non-alkoholik (PHNA). Perlemakan Hati Non-Alkoholik (PHNA) adalah terbentuknya lemak ekstra terutama trigliserida di sel hati yang tidak disebabkan oleh alkohol (Hasan, 2006). Secara histologi, perlemakan hati berupa gambaran tetesan-tetesan kecil (*droplets*) yang terbungkus membran di dalam sitoplasma yang disebut dengan perubahan lemak mikrovesikular, atau berupa tetesan lemak di dalam sitoplasma yang bergabung membentuk globul yang semakin membesar yang disebut dengan perubahan lemak makrovesikular (Chandrasoma & Taylor, 2005). Kondisi ini berkaitan dengan faktor resiko PHNA tersering antara lain Diabetes Mellitus (DM), resistensi insulin, dan dislipidemia (Hasan, 2006).

Sampai saat ini tidak ada terapi yang spesifik terhadap PHNA. Pengobatan yang dilakukan tidak hanya untuk perbaikan fungsi hati saja namun juga terhadap resistensi insulin, mengingat faktor resistensi insulin sangat berperan dalam patogenesis PHNA (Nurman & Huang, 2007). Terapi medikamentosa terhadap kondisi DM sudah banyak dilakukan namun belum memberikan hasil yang maksimal, sehingga penggunaan tanaman herbal sebagai *Complementary and Alternative Medicine* (CAM) mulai mendapatkan perhatian, salah satunya adalah tanaman kemiri (*Aleurites moluccana*) (Samah *et al.*, 2010).

Pohon Kemiri (*Aleurites moluccana*) merupakan tanaman jenis asli Indo-Malaysia yang sudah dibudidayakan secara luas di dunia dan banyak dimanfaatkan di kehidupan sehari-hari. Secara tradisional daun kemiri bisa digunakan sebagai pengobatan bisul, sakit kepala, demam, hiperkolesterolemia, dan diare. Selain itu daun kemiri juga digunakan untuk anti-inflamasi dan anti-piretik. Daun kemiri mengandung senyawa tannin, flavonoid, saponin, sterol, asam amino, karbohidrat dan polifenol (Samah *et al.*, 2010). Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak daun kemiri memiliki efek hipolipidemia melalui penghambatan biosintesis kolesterol hepatic dan pengurangan absorpsi lipid di usus (Pedrosa *et al.*, 2002). Sementara itu, Dadheech *et al.* (2015) menyatakan senyawa flavonoid swertisin memiliki efek antidiabetes dengan menginduksi terbentuknya sel β pankreas baru. Dengan demikian, pemberian ekstrak daun kemiri diharapkan dapat menurunkan akumulasi lemak di hati melalui perbaikan aktivitas insulin dan efek hipolipidemia seperti penelitian yang telah dilakukan sebelumnya.

Berdasarkan grafik pada gambar 5.2 diketahui bahwa kelompok DM (kontrol +) memiliki rerata jumlah perlemakan hepar yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok normal (kontrol -) meskipun berdasarkan uji statistik dinyatakan tidak berbeda secara bermakna. Di samping itu, secara histologi, perlemakan hepar tampak terjadi pada kelompok DM di mana secara umum kondisi sel dalam keadaan rusak dan terlihat gambaran perlemakan mikrovesikular maupun makrovesikular. Hal ini terjadi karena keadaan DM tipe 2 yang diinduksi dengan diet tinggi lemak dan injeksi STZ menyebabkan terjadinya perlemakan hepar. Pada keadaan DM terjadi resistensi insulin yang semakin lama akan menurunkan sekresi insulin oleh sel β pankreas. Resistensi insulin merupakan gangguan respon jaringan terhadap insulin. Resistensi insulin menjadi mekanisme kunci dalam patogenesis penyakit perlemakan hati (Jung & Choi, 2014).

Di dalam jaringan adiposa, kerja utama insulin adalah menghambat aktivitas *Hormone Sensitive Lipase* (HSL) sehingga mengurangi lipolisis triasilgliserol, dengan kata lain mengurangi jumlah asam lemak bebas dan gliserol di sirkulasi. Untuk itu, penurunan aktivitas insulin akibat resistensi insulin maupun penurunan sekresi insulin oleh sel β pankreas menyebabkan peningkatan pembebasan asam lemak bebas di sirkulasi untuk didistribusi ke jaringan lain termasuk hepar (Hardjasasmita, 2006).

Resistensi insulin di hati menyebabkan kegagalan insulin untuk menstimulasi glikogenesis dan menekan glukoneogenesis. Keadaan resistensi insulin ini menyebabkan terjadinya hiperinsulinemia sehingga terjadi perlemakan (steatosis) melalui mekanisme antara lain peningkatan mobilisasi asam lemak bebas ke hati dari hasil lipolisis di jaringan adiposa yang meningkat, peningkatan

sintesis asam lemak *de novo* di hati, penurunan oksidasi asam lemak bebas di hati, dan penurunan sekresi trigliserida dalam bentuk VLDL dari hati (Jung & Choi, 2014).

Pada kelompok perlakuan DK1, DK2, dan DK3 didapatkan rerata perlemakan hepar yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok DM (kontrol +). Hasil gambaran histopatologi dari ketiga kelompok perlakuan juga menunjukkan perlemakan yang lebih parah dibandingkan dengan kelompok DM. Hal ini terjadi diduga karena adanya pengaruh *rebound hyperglycemia* yaitu *Dawn Phenomenon* dan *Somogyi Effect*. *Dawn Phenomenon* merupakan kondisi naiknya gula darah plasma di pagi hari akibat gangguan sekresi insulin dan efek sekresi nokturnal *Growth Hormone* (GH). Hal ini terjadi karena penurunan kebutuhan insulin pada tengah malam hingga pukul 3 pagi diikuti dengan peningkatan kebutuhan insulin pada pukul 5 hingga 8 pagi. Sementara itu, *Somogyi Effect* digunakan untuk mendeskripsikan meningkatnya kadar glukosa darah puasa akibat asimtomatik nokturnal hipoglikemia. Kedua mekanisme *rebound hyperglycemia* tersebut dapat terjadi pada penderita DM tipe 1 maupun DM tipe 2. Pada pasien DM tipe 2, insiden *Dawn Phenomenon* mencapai 55%. Sementara itu, menurut Cohen *et al.* insiden *Somogyi Effect* pada pasien diabetes sebesar 67%. Kondisi hiperglikemia pada kedua mekanisme ini terjadi akibat produksi hormon antagonis-insulin/*counter-regulatory hormones* diantaranya glukagon, GH, kortisol, katekolamin sebagai respon terhadap asimtomatik nokturnal hipoglikemia. Keadaan hipoglikemia pada pagi hari menyebabkan pelepasan hormon-hormon tersebut untuk mengembalikan kadar gula darah menjadi normal tetapi dapat memicu terjadinya peningkatan kadar gula darah melebihi normal. Pada orang dengan DM, produksi hormon-hormon

tersebut melebihi dari orang normal tanpa DM (Brijesh, 2015; Mitshuisi *et al.*, 2015; Rybicka *et al.*, 2011).

Selain insulin, pembebasan asam lemak bebas sebagai produk lipolisis triasilgliserol di jaringan adiposa juga dipengaruhi beberapa hormon diantaranya epinefrin, norepinefrin, glukagon, ACTH (*Adrenocorticotropic Hormone*), GH, TSH (*Tiroid Stimulating Hormone*), dan vasopresin. Hormon-hormon ini bekerja mempercepat pembebasan asam lemak bebas dari jaringan adiposa ke sirkulasi darah. Dasar kerjanya adalah hormon tersebut meningkatkan aktivitas enzim adenilat siklase, dengan kata lain meningkatkan produksi senyawa cAMP. Sedangkan cAMP bersifat mengaktifkan enzim protein kinase, yaitu enzim yang mengaktifkan HSL, yang berarti pula meningkatkan lipolisis. Untuk itu, terjadinya *Dawn Phenomenon* dan *Somogyi Effect* di mana terjadi peningkatan hormon antagonis-insulin akan meningkatkan lipolisis di jaringan adiposa dan meningkatkan distribusi asam lemak bebas dari sirkulasi ke hepar sehingga akumulasi asam lemak bebas di dalam hepar semakin bertambah. Hal inilah yang dimungkinkan dapat menyebabkan kelompok perlakuan DK1, DK2, dan DK3 memiliki rerata jumlah perlemakan hepar yang lebih tinggi dan gambaran histopatologi perlemakan hepar yang lebih parah (Hardjasasmita, 2006; Rybicka *et al.*, 2011).

Akumulasi lemak, terutama trigliserida, di hati menyebabkan terjadinya steatosis. Namun demikian, hasil penelitian ini menunjukkan terjadi penurunan kadar trigliserida serum pada kelompok yang diberi ekstrak daun kemiri dan dinyatakan terdapat perbedaan kadar trigliserida serum yang bermakna antar kelompok perlakuan ($p = 0,000$). Rerata kadar trigliserida serum pada setiap kelompok dalam penelitian ini yaitu kelompok N = $77,25 \pm 19,74$; kelompok DM =

304,00 ± 79,75; kelompok DK1 = 144,75 ± 41,39; kelompok DK2 = 102,25 ± 16,07; dan kelompok DK3 = 79,75 ± 14,91 (Maulida, dkk., tidak dipublikasikan). Hal ini diduga akibat adanya pengurangan absorpsi lemak yang berasal dari makanan di usus oleh ekstrak daun kemiri (Pedrosa, 2002). Lemak dari makanan akan diangkut dalam bentuk kilomikron ke sirkulasi dan mengalami hidrolisis di jaringan ekstrahepatik kemudian sisa kilomikron akan masuk ke hepar. Penurunan kilomikron di sirkulasi menyebabkan penurunan kadar trigliserida serum (Hardjasmita, 2006). Namun berbeda dengan di hepar, terjadinya peningkatan distribusi asam lemak bebas ke hepar akibat *rebound hyperglycemia* dan penurunan sekresi trigliserida dalam bentuk VLDL akibat resistensi insulin menyebabkan trigliserida di dalam hepar lebih tinggi dibandingkan dengan trigliserida serum (Jung & Choi, 2014; Rybicka *et al.*, 2011).

Berdasarkan grafik pada gambar 5.2, dari ketiga kelompok perlakuan, rerata jumlah perlemakan hepar paling tinggi dimiliki oleh kelompok DK2 (39,10 ± 8,56) yaitu kelompok dengan perlakuan DM dan pemberian ekstrak daun kemiri dengan dosis 200 mg/kgBB/hari. Hal ini diduga terjadi karena pemberian ekstrak daun kemiri yang lebih tinggi pada kelompok perlakuan DK3 dengan dosis ekstrak daun kemiri 400 mg/kgBB/hari menimbulkan terjadinya *rebound hyperglycemia* yang lebih parah sehingga gambaran histopatologi pada kelompok DK3 menunjukkan banyak daerah yang nekrosis dibandingkan dengan kelompok DK2 yang menyebabkan hasil perhitungan jumlah hepatosit yang mengalami perlemakan pada kelompok DK3 lebih sedikit dibandingkan kelompok DK2. Hal ini diduga sesuai dengan kondisi di mana terapi insulin yang berlebihan menyebabkan terjadinya *Somogyi Effect* (Rybicka *et al.*, 2011).

Penjelasan di atas didukung dengan hasil uji statistik korelasi *Pearson* di mana didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,087 ($p > 0,05$) yang artinya tidak ada hubungan yang signifikan antara penambahan dosis dan peningkatan jumlah perlemakan hepar tikus. Sementara itu, nilai korelasi berdasarkan uji statistik ini sebesar 0,442 sehingga dapat dikatakan bahwa korelasi antara dosis ekstrak daun kemiri terhadap jumlah perlemakan hepar tikus merupakan korelasi yang sedang.

Berdasarkan uraian di atas, maka hipotesis bahwa pemberian ekstrak daun kemiri terhadap tikus galur Wistar model Diabetes Mellitus tipe 2 dapat menurunkan perlemakan hepar tikus dinyatakan tidak terbukti.

Perlemakan hepar yang terjadi pada tikus galur Wistar model DM tipe 2 dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya lamanya perlakuan DM dan pemberian ekstrak daun kemiri, respon fisiologis tubuh tikus terhadap perlakuan, dan kondisi lingkungan perlakuan tikus. Dengan demikian, dirasa perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kadar flavonoid dan swertisin pada ekstrak daun kemiri dan diperlukan penelitian dengan waktu yang lebih lama untuk mengetahui seberapa besar senyawa aktif dalam ekstrak daun kemiri mampu menurunkan perlemakan sel hepatosit.