

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Karakteristik Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian vitamin A terhadap sensitivitas insulin pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar dengan menggunakan diet tinggi lemak. Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimen murni (*true experimental design*) yang dilakukan di Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya terhadap 20 ekor hewan coba kelamin jantan, dengan umur $\pm$ 6-8 minggu, yang dibagi ke dalam 5 kelompok, yaitu kelompok negatif (kontrol) diberi diet normal; kelompok positif diberi diet tinggi lemak dan diinjeksi STZ; kelompok positif diberi diet tinggi lemak dan diinjeksi STZ; kelompok perlakuan 1 diberi diet tinggi lemak, diinjeksi STZ, dan diberi dosis vitamin A 50 mg/kgBB; kelompok perlakuan 2 diberi diet tinggi lemak, diinjeksi STZ, dan diberi dosis vitamin A 100 mg/kgBB; dan kelompok perlakuan 3 diberi diet tinggi lemak, diinjeksi STZ, dan diberi dosis vitamin A 150 mg/kgBB.

Berdasarkan Tabel 5.1 dan Gambar 5.1 didapatkan bahwa berat badan semua kelompok secara konsisten meningkat pada minggu ke-2 hingga minggu ke-7 dengan pemberian diet tinggi lemak pada kelompok positif dan perlakuan, sedangkan diet normal pada kelompok negatif, sehingga berat badan pada kelompok KN lebih rendah dari kelompok lainnya. Menurut Harsa (2014), pemberian asupan diet tinggi lemak merupakan salah satu metode untuk meningkatkan lemak tubuh. Hal tersebut dibuktikan melalui hasil penelitiannya dimana kelompok yang diberi diet tinggi lemak memiliki rerata kadar kolesterol

total, kolesterol LDL, triasiglisierida (TG) yang lebih tinggi dibandingkan kelompok yang hanya diberi diet standar. Menurut Zhang *et al.* (2008) pemberian diet tinggi lemak dapat digunakan untuk memulai resistensi insulin dimana merupakan fitur penting dari DM tipe 2, atau dapat disimpulkan bahwa diet tinggi lemak dapat dijadikan sebagai agen pradiabetes.

Perubahan berat badan dipengaruhi oleh jumlah energi yang dikeluarkan terhadap jumlah energi yang dikonsumsi/digunakan. Oleh karena itu, jika pengeluaran energi masih rendah, sedangkan diet yang dikonsumsi berlebihan, maka akan terjadi peningkatan berat badan (Swift *et al.*, 2014). Pengeluaran energi dapat diartikan sebagai aktivitas fisik. Dalam penelitian yang dilakukan, aktivitas fisik pada tikus tergolong sangat rendah, karena ruang bergerak tikus yang terlalu sempit, yaitu di dalam kandang kecil tertutup dimana dalam 1 kandang berisi 1 tikus. Dengan begitu dapat disimpulkan bahwa aktivitas fisik dapat dijadikan faktor dalam peningkatan berat badan tikus.

Kemudian pada minggu ke-8 berdasarkan data berat badan tikus mengalami penurunan. Penurunan ini terjadi pada kelompok KP, VAP2, VAP3, dan sedikit pada kelompok VAP1. Penurunan berat badan ini merupakan salah satu tanda mulai terjadinya DM tipe 2, setelah dilakukan pemeriksaan glukosa darah sebelumnya untuk mengetahui apakah ada peningkatan glukosa darah (≥ 126 mg/dl) sebagai tanda terjadinya DM tipe 2 (PERKENI, 2006). Pada penderita diabetes yang tidak terkontrol dapat menyebabkan penurunan berat badan. Terjadinya penurunan berat badan disebabkan oleh adanya proses lipolisis. Lipolisis adalah dekomposisi atau pemecahan lemak, yang menghasilkan asam lemak bebas (FFA=Free Fatty Acid). Pengeluaran FFA dari jaringan adiposa/lemak dipengaruhi oleh banyak hormon yang mempengaruhi laju

esterifikasi atau laju lipolisis, salah satunya adalah hormon insulin. Insulin menghambat pembebasan asam lemak bebas dari jaringan adiposa diikuti oleh penurunan asam lemak bebas pada plasma. Peningkatan FFA di dalam plasma memperkuat terjadinya resistensi insulin dan meningkatkan glukoneogenesis di hepar, mempercepat hiperglikemia, serta oksidasi FFA dapat meningkatkan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang dapat berakibat pada kerusakan endotel pula (Murray *et al*, 2006).

Dengan tingginya glukosa darah, tubuh berusaha untuk melakukan kompensasi yaitu dengan pengeluaran glukosa darah melalui ginjal. (Diabetes UK, 2016). Ginjal akan melakukan tugasnya yaitu melakukan penyaringan. Namun karena jumlah glukosa yang tersaring melebihi kemampuan sel tubulus ginjal dalam mereabsorpsi, maka urin yang keluar akan mengandung glukosa (glukosuria). Glukosuria akan menimbulkan efek osmotik dimana terjadi penarikan H₂O (air) bersamanya, menyebabkan diuresis osmotik yang ditandai dengan meningkatnya frekuensi kencing (poliuria). Dengan banyaknya cairan yang keluar dari tubuh dapat menyebabkan dehidrasi. Dehidrasi dapat menyebabkan terjadinya gangguan hingga kegagalan sirkulasi perifer, yang mana jika tidak segera ditangani dapat menyebabkan kematian karena berhentinya aliran darah ke organ-organ vital seperti otak atau gagal ginjal sekunder. Dehidrasi ini pula dapat menyebabkan penurunan berat badan walaupun hanya kecil perannya. Gejala lain yang muncul adalah banyak minum (polidipsi), sebagai kompensasi terjadinya dehidrasi (Sheerwood, 2001). Hal ini juga menjadi faktor penambah terjadinya penurunan berat badan.

6.2 Pengaruh Diet Tinggi Lemak dan Injeksi STZ terhadap Indeks Sensitivitas Insulin pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar

Berdasarkan Tabel 5.2 dan Gambar 5.2 menunjukkan hasil rerata glukosa darah pada kelompok yang diberi diet tinggi lemak dan diinjeksi STZ (KP, VAP1, VAP2, dan VAP3) memiliki glukosa darah ≥ 126 mg/dl, sebagai tanda terjadinya DM tipe 2.

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, pada Tabel 5.4 dan Gambar 5.4 menunjukkan bahwa terdapat penurunan indeks sensitivitas insulin (ISI) yang signifikan dimana rerata terendah ada pada kelompok kontrol positif (KP) yaitu 0,276. ISI merupakan indeks yang menunjukkan bagaimana tubuh merespon terhadap insulin yang berfungsi sebagai hormon yang mengontrol glukosa dalam plasma agar dapat diserap oleh sel-sel tubuh. Rendahnya angka ISI menunjukkan pula sensitivitas tubuh terhadap insulin yang rendah atau resisten terhadap insulin. Hal tersebut merupakan mekanisme terjadinya diabetes melitus tipe 2 (Nugroho, 2006). Berdasarkan hasil penelitian pula, ISI menurun pada kelompok yang diberi diet tinggi lemak dan diinjeksi STZ.

Diet tinggi lemak menyebabkan hiperinsulinemia yang akan menyebabkan peningkatan kerja bagian dari adiposit sehingga terjadi hipertrofi pada adiposit. Kemudian terbentuk adiposit baru secara terus menerus hingga menjadi hiperplasi adiposit dan FFA (*Free Fatty Acid*) semakin meningkat. Peningkatan FFA di dalam plasma akan mempengaruhi kerja insulin, menurunkan pengambilan/*uptake* glukosa, glikolisis, dan sintesis glikogen. Berdasarkan penelitian sebelumnya, pemberian diet tinggi lemak selama ± 8 minggu dapat menyebabkan resistensi insulin oleh karena penumpukan lemak

viseral, dimana peningkatannya menyebabkan peningkatan FFA di hepar, sirkulasi trigliserida, serta produksi glukosa hepatic (Mawarti dkk., 2012) .

STZ merupakan zat yang dapat mengganggu metabolisme insulin sehingga dapat terjadi diabetes melitus dengan merusak sel-sel pankreas. Seperti halnya dalam teori bahwa terganggunya metabolisme insulin dapat disebabkan oleh salah satunya dengan agen yang bersifat diabetogenik. Cara tercepat untuk menginduksi diabetes adalah dengan menggunakan agen kimia yang bersifat diabetogenik (aloksan, streptozotocin, *dhitizone*, *monosodium glutamate*, dan lainnya), virus, dan tikus yang diabetes secara genetik. Namun yang paling umum digunakan adalah agen kimia aloksan dan streptozotocin (STZ). STZ bekerja dengan cara mencegah sintesis DNA pada mamalia dan sel-sel bakteri. STZ masuk ke dalam sel pankreas melalui GLUT2 (*Glucose Transporter 2*) dan menyebabkan alkalisasi pada DNA. Untuk dapat menginduksi terjadinya diabetes, STZ akan menginduksi aktivasi dari ribosilasi poliadenosine diphosphate dan pelepasan *nitric oxide* yang menyebabkan rusaknya sel pankreas (Tripathi and Verma, 2014; Eleazu, 2013).

Dengan begitu dapat disimpulkan bahwa dengan kombinasi antara pemberian diet tinggi lemak yang menghasilkan resistensi insulin dan injeksi STZ dosis rendah (30 mg/kgBB) dapat menyebabkan disfungsi sel β dan hiperglikemia (prediabetes) yang mewakili terjadinya DM tipe 2.

6.3 Pengaruh Pemberian Vitamin A terhadap Indeks Sensitivitas Insulin pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar

Pada Tabel 5.4 dan Gambar 5.4 menunjukkan bahwa rerata indeks sensitivitas insulin (ISI) pada kelompok perlakuan lebih tinggi daripada ISI pada kelompok positif (KP), yaitu $VAP1=0,291$, $VAP2=0,294$, dan $VAP3=0,298$. Hal ini menunjukkan bahwa terapi dengan cara pemberian vitamin A memiliki dampak positif dalam meningkatkan sensitivitas insulin yang telah diinjeksi STZ. Hal ini sesuai dengan pernyataan Iqbal dan Naseem (2015) bahwa target retinol pada diabetes melitus tipe 2 adalah radikal bebas dan gen yang terlibat dalam metabolisme insulin dan obesitas. Vitamin A merupakan antioksidan kuat yang memiliki potensi dalam mengubah ekspresi gen. Disamping itu, vitamin A mengatur pelepasan insulin dan homeostasis energi.

Seperti yang dijelaskan dalam teori sebelumnya bahwa pembentukan radikal bebas terjadi pada diabetes mellitus tipe 2 melalui proses hiperglikemi. Hiperglikemi menyebabkan glikasi protein nonenzimatik (*Advanced Glycation End Products=AGEs*), jalur poliol sorbitol (aldose reduktase), jalur protein kinase C (PKC), dan autooksidasi glukosa. Hal tersebut merupakan proses yang dapat mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif yang menyebabkan peningkatan modifikasi pada lipid, DNA, dan protein jaringan. Modifikasi tersebut mengakibatkan ketidakseimbangan antara antioksidan protektif dan peningkatan produksi radikal bebas. Hal tersebut merupakan awal dari terbentuknya kerusakan oksidatif (stres oksidatif). Selain itu, stres oksidatif memiliki kontribusi pula dalam perburukan dan perkembangan terjadinya komplikasi DM (Setiawan dan Suhartono, 2005). Vitamin A dalam bentuk *retinoic acid* (RA) dapat menghambat atau menurunkan aktivitas jalur protein kinase C (PKC). Jika

aktivitas jalur PKC dihambat menambah sensitivitas insulin (Iqbal dan Naseem, 2015; Pessin dan Saltiel, 2000).

Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan uji statistik *One Way ANOVA* didapatkan bahwa indeks sensitivitas insulin (ISI) tidak berbeda signifikan terhadap rerata ISI tikus putih tiap kelompok ($0,087 > 0,05$). Hal ini dapat disebabkan salah satunya adalah adanya variasi data yang terlalu besar akibat asupan makanan yang diberikan (diet tinggi lemak) tidak dikonsumsi secara menyeluruh sesuai dengan takarannya. Berdasarkan hasil analisis uji *Post Hoc LSD* menunjukkan bahwa terdapat beda yang signifikan pada kelompok kontrol negatif (KN) dengan kelompok perlakuan vitamin A dosis 50 mg/kgBB (VAP1), yaitu 0,043 ($p < 0,05$). Dosis vitamin A 50 mg/kgBB merupakan dosis minimal dalam penelitian ini, dimana dalam perhitungannya rata-rata berat badan tikus ± 300 gram (0,3 kg), sehingga dosis dalam kelompok VAP1 adalah 15 mg (50.000 IU) (lampiran 1). Dalam penelitian Kartha dan Krishnamurthy (1977) dengan pemberian vitamin A dengan dosis 100.000 IU (30 mg) pada hari alternatif selama lima hari pada tikus menghasilkan penurunan pada in vitro peroksidasi lipid pada jaringan, namun pemberiannya yang berlebihan dapat menyebabkan efek toksik. Dosis toksik akut vitamin A adalah 25.000 IU/kgBB, sedangkan dosis toksik kronik vitamin A adalah 4.000 IU/kgBB (Rosenbloom, 2015). Hal tersebut membuktikan bahwa dengan dosis rendah (15 mg) sudah cukup memberikan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kontrol negatif (KN).

6.4 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Tidak dilakukan pengukuran laboratorium kadar serum insulin pada awal penelitian untuk menentukan indeks sensitivitas insulin (ISI) sehingga tidak diketahui jika kadar serum insulin tinggi sebelum dilakukan perlakuan pada hewan coba.
2. Waktu yang digunakan untuk perlakuan vitamin A kurang lama sehingga tidak cukup untuk meningkatkan indeks sensitivitas insulin.

