

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Asupan Pakan Tikus Percobaan

Diet yang diberikan pada percobaan ini menggunakan dua jenis pakan, yaitu pakan normal dan pakan *High Fat Diet* (HFD). Pakan normal memiliki persentase karbohidrat yang lebih tinggi dan persentase lemak yang lebih rendah dibandingkan dengan pakan HFD. Komposisi pakan HFD, terdiri dari 58% lemak, 25% protein dan 17% karbohidrat (Srinivasan *et al.*, 2005).

Pemberian pakan HFD sebelum induksi STZ bertujuan untuk perkembangan menjadi obesitas, hiperinsulinemia dan resistensi insulin (Srinivasan *et al.*, 2005). Selain itu pakan HFD mengembangkan model insulin resisten tetapi bukan *frank hyperglycemia* atau diabetes (Zhang *et al.*, 2008). Asupan lemak yang berlebih pada tikus dengan konsumsi HFD, akan menyebabkan peningkatan trigliserida, sehingga akan menyebabkan peningkatkan asam lemak dan oksidasi, kondisi tersebut menyebabkan tumpulnya respon hormon Insulin dengan dimediasi oleh penurunan *output* glukosa oleh hati serta pengurangan pemanfaatan glukosa oleh otot rangka, untuk tahap lanjut dari kondisi tersebut akan terjadi kompensasi berupa hiperinsulinemia, yang merupakan ciri umum dari resistensi insulin (Belfiore *et al* 1998; Iwanishi *et al* 1993 **dalam** Srinivasan *et al.*, 2005).

Pemberian pakan HFD ini diberikan selama penelitian dimulai pada minggu ke 2 sampai minggu ke 11 pada kelompok KP, KP1, KP2, dan KP3. Pada grafik 5.2 dapat dilihat bahwa tikus mengalami peningkatan berat badan yang lebih tinggi

dimulai dari minggu ke 2 sampai minggu ke 7 jika dibandingkan dengan kelompok Kontrol Negatif dengan diet normal.

Grafik rerata asupan makan perkelompok selama penelitian dapat dilihat pada **gambar 5.1**. Kelompok kontrol negatif memiliki nilai asupan makan yang tinggi sebesar 13.76 gram sedangkan pada kelompok Kontrol Positif (KP) memiliki asupan terendah yaitu 9.3 gram. Pada kelompok perlakuan KP1, KP2, KP3 memiliki nilai asupan 10.83 gram, 10.59 gram dan 11.12 gram.

6.2 Berat Badan Tikus Percobaan

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya perubahan berat badan tikus tiap minggunya berupa peningkatan maupun penurunan berat badan. Perubahan berat badan ini berkaitan dengan asupan makan yang dikonsumsi dan kondisi diabetes melitus tipe 2 yang terjadi pada beberapa kelompok.

Kelompok kontrol negatif cenderung mengalami peningkatan berat badan selama 11 minggu penelitian yang dapat dilihat pada **gambar 5.2**. Jika dibandingkan dengan kelompok KP, KP1, KP2, dan KP3, yang mengalami perubahan berat badan. Peningkatan berat badan tikus cenderung terjadi pada minggu ke 2 sampai dengan minggu ke 6 sedangkan pada minggu ke 8 sampai dengan minggu ke 11, berat badan tikus cenderung mengalami penurunan.

Peningkatan berat badan pada kelompok KP, KP1, KP2, dan KP3 pada minggu ke 2 sampai dengan minggu ke 6 disebabkan oleh konsumsi makanan kaya energi dalam bentuk lemak jenuh (lemak babi) sehingga terjadi deposisi di berbagai bantalan lemak tubuh dan penurunan pengeluaran energi (Storlien *et al.*, 1986; Srinivasan *et al.*, 2004 **dalam** Srinivasan *et al.*, 2005). Sedangkan kecenderungan

penurunan berat badan pada minggu ke 8 sampai dengan minggu ke 11 disebabkan induksi STZ (*Streptozotocin*) pada minggu ke 7. Sehingga tikus berada dalam kondisi diabetes melitus tipe 2 yang dapat dilihat dari pemeriksaan gula darah puasa tikus pada **tabel 5.3**. Grafik perubahan berat badan yang dapat dilihat pada **gambar 5.2**.

Penurunan Berat Badan diakibatkan oleh perkembangan dari kondisi diabetes melitus tipe 2 pada tikus. Hal ini berkaitan dengan dosis STZ yang digunakan yaitu sebesar 30 mg/kgBB. Menurut Srinivasan *et al* (2005) penggunaan STZ dosis tinggi (dosis 45 dan 55 mg/kgBB) lebih mengembangkan penurunan berat badan yang drastis, sedangkan pada dosis rendah (35 mg/kg) mampu mengembangkan kondisi diabetes melitus sesuai dengan kondisi aslinya dengan didampingi oleh peningkatan berat badan.

Konsumsi diet yang kaya akan karbohidrat maupun lemak akan menyebabkan peningkatan jumlah lemak yang terdeposit pada jaringan adiposa terutama yang berada dibawah kulit dan di rongga perut (Faisal, 2003 **dalam** Tsalissavrina, 2006). Selain itu setiap jumlah lemak dan karbohidrat makanan yang berlebihan jika tidak langsung digunakan akan disimpan di jaringan adiposa dalam bentuk trigliserida (Tsalissavrina, 2006). Jadi meskipun tikus dalam kondisi diabetes melitus, tikus mengalami kecenderungan peningkatan asupan makan, selain itu rendahnya aktivitas tikus juga berpengaruh terdapat peningkatan berat badan yang terjadi pada kondisi tersebut.

6.3 Kadar glukosa darah Puasa tikus percobaan setelah di injeksi STZ (*Streptozotocin*)

Streptozotocin (STZ) merupakan suatu senyawa *glukosamininitrosouren*, yang bekerja dengan membentuk radikal bebas yang sangat reaktif, sehingga dapat menyebabkan kerusakan membrane sel, protein, dan *deoxyribonucleic acid* (DNA) yang berakibat pada kerusakan sel β pankreas sehingga terjadi gangguan dalam produksi insulin (Wilson dan LeDoux, 1989 **dalam** Erwin *et al* 2013). Di dalam sel *streptozotocin* diangkut oleh protein pengangkut glukosa yaitu GLUT2, tapi tidak dikenali oleh protein pengangkut glukosa lainnya (Schnedl *et al.*, 1994; Wang dan Gleichmann, 1998 **dalam** Erwin *et al* 2013). Organ lain yang mengekspresikan GLUT2 seperti ginjal dan liver akan mengalami kerusakan akibat induksi *streptozotocin* (Lenzen, 2008).

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan kadar glukosa darah puasa tikus yang diinduksi STZ pada minggu ke 7, pada kelompok KP, KP1, KP2, dan KP3. Peningkatan kadar gula darah puasa dapat dilihat pada **tabel 5.3**. Peningkatan kadar gula darah tikus ≥ 140 mg/dL atau ≥ 7.8 mmol/L menunjukkan bahwa tikus dalam kondisi diabetes (Zhang *et al.*, 2008). Pada Penelitian ini didapatkan kadar glukosa darah KN sebesar 99 ± 28.48 mg/dL, sedangkan pada kelompok perlakuan, glukosa darah tertinggi pada kelompok KP1 277.75 ± 118.48 mg/dL, mengenai grafik glukosa darah puasa tikus dapat dilihat pada **gambar 5.3**.

Proses pembuatan tikus dengan diabetes melitus tipe 2 pada penelitian ini dimulai dengan pemberian pakan HFD yang dimulai pada minggu ke 2. Pemberian pakan HFD bertujuan untuk mengembangkan tikus dengan obesitas,

hiperinsulinemia, resistensi insulin. Kemudian pada minggu ke 7 dilakukan injeksi STZ. Hal ini bertujuan untuk membuat model tikus dengan diabetes melitus tipe 2 sesuai dengan kondisi alamiah terjadinya penyakit tersebut, dimana dimulai dengan proses resistensi insulin kemudian menuju ke kerusakan sel β pankreas (Srinivasan *et al.*, 2005). Pemberian pakan HFD akan memproduksi resistensi insulin sedangkan dosis rendah STZ akan menginisiasi kerusakan sel β pankreas. Dosis STZ yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 mg/kgBB.

Menurut penelitian Zhang *et al* (2008), pemberian HFD dengan dosis rendah STZ 30 mg/kg, dapat mengembangkan kondisi diabetes melitus tipe 2 dengan *Fasting Blood Glucose (FBG)* ≥ 7.8 mmol/L atau *non fasting blood glucose* ≥ 11.1 mmol/L. Pada penelitian kami pemberian dosis 30 mg/kgBB STZ dilakukan pada minggu ke 7 dan pengecekan FBG pada minggu ke 8 mampu mengembangkan tikus dengan diabetes melitus tipe 2. Pada penelitian Srinivasan *et al* (2005) dijelaskan bahwa dengan pemberian dosis yang lebih tinggi yaitu 45 dan 55 mg/kg menyebabkan penurunan drastis dari berat badan dan beberapa tikus meninggal setelah 2 minggu pemberian STZ serta lebih menyerupai diabetes melitus tipe 1, sedangkan untuk dosis yang lebih rendah yaitu 25 mg/kgBB tidak memproduksi hiperglikemia yang signifikan.

6.4 Kadar MDA Tikus Percobaan

Hasil pengukuran kadar MDA serum dapat dilihat pada **tabel 5.4**, dimana kelompok kontrol negatif memiliki kadar rerata MDA 145.25 ± 49.51 ng/mL, sedangkan kelompok kontrol positif memiliki rerata MDA sebesar 136.50 ± 45.46 ng/mL, jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif

memiliki nilai rerata MDA yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok Negatif, didapatkan hasil tidak signifikan ($p=0.885$). Rerata MDA tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan 1 (kelompok perlakuan dengan ekstrak kulit tomat 50 mg) dengan jumlah 260.88 ± 5.54 ng/mL. Rerata kadar MDA serum terendah terdapat pada kelompok perlakuan 2 (kelompok perlakuan dengan ekstrak kulit tomat 100 mg) yaitu sebesar 184.63 ± 24.01 ng/mL.

Diabetes melitus merupakan suatu penyakit dengan karakteristik hiperglikemia dan berhubungan dengan peningkatan radikal bebas (Kalaivanam *et al.* 2006). Kondisi Hiperglikemia kronik pada diabetes melitus dapat menginduksi produksi ROS melalui beberapa jalur yaitu autoksidasi, oksidasi fosfolirilasi, glikosilasi, dan *glucosamine pathway* (Baynes., 1991; Wolff dan Dean.,1987; Hunt *et al.*,1988; Nishikawa *et al.*, 2000; Kaneto *et al.*, 2002 dalam Robertson *et al.*, 2004). Peningkatan produksi ROS dapat berkembang pada kerusakan langsung pada lipid berupa peroksidasi lipid, protein dan DNA (Kalaivanam *et al.*, 2006). Peroksidasi lipid merupakan suatu mekanisme atau reaksi berantai yang menghasilkan radikal bebas secara terus menerus dan peroksidasi lipid lebih lanjut (Murray *et al.*, 2009), sehingga MDA sebagai produk peroksidasi lipid cenderung mengalami peningkatan. Peningkatan MDA sebagai produk peroksidasi lipid menunjukkan peningkatan angka kejadian komplikasi dari diabetes melitus (Mandal *et al.*, 2010).

Peroksidasi lipid dalam kondisi normal, dapat dikontrol oleh antioksidan endogen (Slatter *et al.*, 2000). Pada kondisi fisiologis atau peroksidasi lipid tingkat rendah (*sub toxic condition*), sel akan menstimulasi suatu pertahanan dengan pemeliharaan dan kelangsungan hidup melalui pertahanan antioksidan atau aktivasi

antioksidan melalui sinyal jalur *up regulate* protein menghasilkan respon *adaptive* sedangkan pada peroksidasi medium atau peroksidasi lipid tingkat tinggi (*toxic condition*) tingkat kerusakan oksidatif akan terjadi, sel-sel akan menginduksi apoptosis dan nekrosis, proses tersebut akan semakin memperburuk kondisi dengan perkembangan kerusakan molekul sel-sel dan dapat mengakibatkan kondisi patologis lebih lanjut serta mempercepat proses penuaan (Ayala *et al.*, 2014). Pada kondisi diabetes melitus tipe 2, menurut penelitian di South Karnataka pada penderita diabetes mengalami penurunan dari *glutathione* (GSH) pada eritrosit dan terjadi sedikit peningkatan dari *oksidasi glutathione* (GST), sejalan dengan hal tersebut menurut penelitian Duman *et al* (2003) terjadi penurunan yang signifikan dari antioksidan pada populasi dengan diabetes melitus (Rani dan Mythili, 2014).

Rerata nilai MDA pada penelitian ini, didapatkan kelompok kontrol positif (KP) memiliki nilai yang lebih rendah dari pada kelompok kontrol negatif (KN) dan dari hasil analisa statistika didapatkan hasil tidak signifikan ($p=0.885$). Kemungkinan, hal ini disebabkan oleh, rerata asupan makan dari kelompok kontrol positif lebih rendah dari pada kelompok kontrol negatif, asupan makan tiap kelompok selama penelitian dapat dilihat pada **gambar 5.1**.

Kelompok kontrol negatif memiliki asupan makan tertinggi selama penelitian. Kelompok kontrol negatif mengkonsumsi diet normal dengan komposisi 68% karbohidrat, 20.3% protein, dan 3% lemak (Sasidharan *et al.*, 2013). Dikatakan dalam penelitian bahwa, diet kaya karbohidrat akan menyebabkan peningkatan jumlah lemak yang terdeposit pada jaringan adiposa terutama yang berada dibawah kulit dan di rongga perut (Faisal, 2003 *dalam* Tsalissavrina, 2006), sehingga diet

tinggi karbohidrat juga mempunyai sifat aterogenik yakni dapat menaikkan kadar trigliserida (Tsalissavrina, 2006). Oleh karena itu MDA sebagai marker peroksidasi lipid pada kelompok kontrol negatif lebih tinggi dari pada kontrol positif. Konsumsi HFD selama 10 minggu pada kontrol positif kemungkinan dapat memberikan pengaruh, sebab menurut penelitian, konsumsi HFD > 3 bulan lebih disukai, ketika bertujuan untuk mengembangkan kondisi obesitas yang benar karena terdapat peningkatan berat badan yang signifikan (Skovsø, 2014). Sehingga jika tikus dalam kondisi obesitas, rerata MDA yang merupakan suatu senyawa hasil peroksidasi lipid akibat meningkatnya radikal bebas, lebih terlihat perbedaannya, jika dibandingkan kelompok kontrol negatif dengan diet pakan normal. Selain itu, pada penelitian ini pengukuran serum MDA hanya dilakukan pada akhir penelitian sehingga tidak diketahui apakah kadar serum MDA pada kelompok kontrol negatif memang sudah tinggi sebelumnya.

Hasil analisa statistik pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan program *SPSS For Window Versi 16.0*. Hasil analisa Mann Whitney menunjukkan bahwa ada beberapa kelompok yang mempunyai hasil yang bermakna yaitu kontrol negative (KN) dengan ekstrak kulit tomat 50mg/kgBB (KP1) ($p=0.020$), Ekstrak kulit tomat 50 mg/kgBB (KP1) dengan ekstrak kulit tomat 100 mg/kgBB (KP2) ($p=0.019$), Ekstrak kulit Tomat 50mg/kgBB dengan ekstrak kulit tomat 150 mg/kgBB (KP3) ($p=0.020$), Ekstrak kulit tomat 50 mg/kgBB (KP1) dengan kontrol positif (KP) ($p=0.020$). Karena ada beda secara signifikan pada beberapa perlakuan maka dilakukan uji *Korelasi Spearman* untuk mengetahui kekuatan hubungan antara peningkatan dosis ekstrak kulit tomat dengan kadar MDA serum, didapatkan hasil

tidak signifikan ($p=0.638$) sehingga pemberian ekstrak kulit tomat belum memberikan efek bermakna pada terapi diabetes melitus tipe 2.

Dosis yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan penelitian Nyamthabad dan Umesh (2014) mengenai evaluasi aktivitas antidiabetes dari ekstrak biji tomat dosis 50-200 mg/kgBB dari hasil penelitian tersebut didapatkan bahwa ekstrak biji tomat dosis 50-200 mg/kgBB dapat menurunkan kadar glukosa darah tetapi tidak dilakukan pengujian untuk parameter yang lain seperti kadar MDA. Ekstrak kulit tomat yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak kulit tomat dosis 50mg/kgBB, 100 mg/kgBB, 150mg/kgBB.

Menurut penelitian Pasaribu *et al* (2012) peningkatan dosis tidak ikut serta meningkatkan efektivitas terapi yang diberikan. Pada penelitian tersebut dikatakan bahwa peningkatan dosis ekstrak akan menyebabkan menurunnya respon, sebab komponen ekstrak atau obat alami terdiri dari beberapa komponen senyawa yang akan bekerjasama untuk saling menimbulkan efek, sehingga menyebabkan kejenuhan dari reseptor, oleh karena itu tidak tercapai efek maksimal seiring penambahan dosis (Pasaribu *et al.*, 2012). Sejalan dengan hal tersebut, pada penelitian ini ekstrak kulit tomat yang diberikan bukanlah komponen ekstrak tunggal melainkan terdiri dari beberapa komponen antioksidan seperti *lycopene*, β -*carotene*, *quercetin*, *Vitamin C*, *Vitamin E* dan komponen mineral seperti besi, nikel, kobalt, tembaga, magnesium serta komponen asam amino baik esensial dan non esensial.

Menurut Breinholt *et al.* (2000), dosis 0.005 g (5 mg) *lycopene* merupakan dosis yang paling efektif dalam meningkatkan aktivitas dari Glutation reduktase (GR) dan glutation peroksidase (GPx), pada penelitian yang dilakukan Breinholt,

digunakan dosis 0,1 gram (1000 mg), 0,05 gram (50mg), 0,005 gram (5 mg) dan 0,001 gram (1 mg), dikatakan bahwa dosis yang lebih tinggi tidak memberikan pengaruh terhadap aktivitas Glutation reduktase (GR) dan glutation peroksidase (GPx). Glutation reduktase (GR) dan glutation peroksidase (GPx) merupakan enzim antioksidan yang berperan untuk mengatasi stress oksidatif yang terjadi (Winarsi et al 2010). Tidak menurunnya kadar serum MDA dalam penelitian ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Ekstrak kulit tomat yang diberikan bukan ekstrak murni yang mengandung lycopene saja, tetapi ekstrak kulit tomat secara keseluruhan dengan kandungan antioksidan lainnya beserta zat-zat aktif yang terkandung didalamnya. *Flavonoid, phenolic, lycopene, β -carotene* dan *asam askorbat* merupakan beberapa antioksidan dalam tomat. Selain itu dalam kulit buah tomat terdapat beberapa komponen mineral, asam amino esensial dan non esensial. Ekstrak kulit tomat memiliki komponen mineral yang cukup beragam, diantaranya adalah magnesium (Mg), besi (Fe), mangan (Mn), tembaga (Cu), nikel (Ni), cobalt (Co). Dalam 100 gram kulit buah tomat diperkirakan terdapat 149 mg magnesium, 1.50 mg besi, 1.40 mg mangan, 1.10 mg tembaga, 0.66 mg nikel, dan 0.01 cobalt (Elbadrawy, 2011). Tabel komponen kimia dan mineral dalam 100 gram kulit tomat dapat dilihat pada **tabel 2.3** sedangkan tabel komposisi asam amino esensial dan non essensial dalam 100 gram kulit buah tomat dapat dilihat pada **tabel 2.4** (Elbadrawy, 2011).

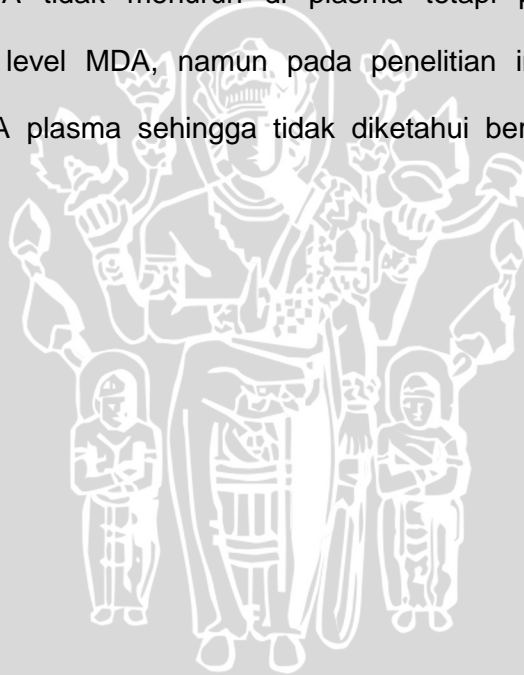
Komponen mineral dalam tomat seperti Fe, Cu, Ni, Co dapat berpengaruh terhadap pembentukan radikal hidroksil (HO•) sebab dapat bertindak sebagai katalisator. Mekanisme tersebut diperantarai oleh Reaksi Fenton dan Haber Weiss

yang dapat dilihat pada **gambar 2.3**. Radikal hidroksil ($\text{HO}\cdot$) dalam sistem biologi dapat terbentuk melalui siklus redoks oleh reaksi Fenton. Logam transisi yang tereduksi (Mn) bereaksi dengan hidrogen peroksida melalui reaksi fenton yang mengarah ke pembentukan radikal hidroksil ($\text{HO}\cdot$). Sedangkan radikal superoksida bereaksi dengan bentuk teroksidasi dari logam transisi yang mengarah ke reaksi Haber Weiss dengan produksi Mn yang dapat berpengaruh ke siklus redoks (Ayala et al. 2014). Tingginya level radikal bebas dan ROS pada kondisi diabetes melitus tipe 2 dapat menyebabkan kerusakan langsung pada Lipid. Sumber utama ROS endogen adalah mitokondria, membran plasma, retikulum endoplasma, dan peroksisom (Moldovan, L dan Moldovan N. I, 2004 **dalam** Ayala et al. 2014). ROS yang paling berperan dalam kerusakan lipid secara mendalam adalah *radikal hydroxyl* ($\text{HO}\cdot$) dan *hydroperoxyl* ($\text{HO}_2\cdot$) (Ayala et al. 2014). Radikal Hidroksil akan menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel dengan target utamanya adalah biomolekul (Halliwell dan Gutteridge, 1984 **dalam** Ayala et al. 2014), oleh karena itu MDA sebagai produk dari peroksidasi lipid semakin meningkat.

Selain faktor diatas, kandungan *quercetin* pada ekstrak kulit tomat kemungkinan dapat memberikan pengaruh terhadap meningkatnya kadar MDA. *Quercetin* merupakan family dari flavonoid yang dapat ditemukan dalam ekstrak kulit tomat. Secara in vitro *quercetin* dalam tomat dapat teroksidasi menjadi produk oksidan yang dinamakan *quercetin-quinone* (QQ). Senyawa *quinone* diyakini sebagai senyawa yang toksik jika bereaksi dengan senyawa thiol, efeknya dapat meningkatkan permeabilitas membrane, dan gangguan fungsi enzim. Selain itu secara in vitro *quercetin* diyakini mempunyai efek terhadap kerusakan

deoxyribonucleic acid (DNA) akibat paparan agen atau disebut juga sebagai efek genotoksik (Boots *et al.*, 2008).

Rendahnya absorpsi dari ekstrak kulit tomat pada hewan coba yang digunakan dapat juga berpengaruh terhadap efek dari ekstrak kulit tomat, namun pada penelitian ini tidak dilakukan perhitungan dari kadar plasma antioksidan dalam tomat sehingga tidak diketahui apakah penyerapan ekstrak kulit tomat sudah optimal atau belum. Menurut penelitian yang dilakukan Aydin dan Celik (2012) didapatkan hasil bahwa level MDA tidak menurun di plasma tetapi pada jaringan otak didapatkan penurunan level MDA, namun pada penelitian ini hanya dilakukan pengukuran kadar MDA plasma sehingga tidak diketahui berapa kadar MDA di jaringan.



6.5 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Dosis ekstrak kulit tomat yang digunakan belum optimal dalam menurunkan kadar MDA serum.
2. Tidak dilakukannya pengukuran kadar antioksidan dalam plasma, sehingga tidak diketahui efektivitas penyerapan ekstrak kulit tomat dalam tikus.
3. Tidak dilakukan pengukuran kadar MDA pada awal penelitian, sehingga tidak dapat diketahui apakah kadar MDA serum sudah tinggi atau tidak sebelum penelitian.
4. Tidak dilakukannya pemurnian ekstrak kulit tomat, sehingga terdapat berbagai macam komponen dalam ekstrak.
5. Tidak dilakukannya pengukuran kadar MDA di jaringan, sehingga tidak diketahui perbandingan antara MDA di jaringan dan serum.