

## BAB VI

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Pembahasan

Obesitas terjadi akibat tingginya simpanan TG di jaringan adiposa (Guyton dan Hall, 2015). Perkembangan jaringan di adiposa zebrafish mengikuti dasar yang sama dengan mamalia (Holtta-Vuori *et al.*, 2010). TG yang masuk ke hepar akan diproses menjadi lipoprotein, yakni HDL, LDL, dan VLDL (Guyton dan Hall, 2015). Lipoprotein yang dominan di zebrafish adalah HDL, dan jumlah TG terbanyak terdapat di LDL (Stoletov *et al.*, 2009; Hotta-Vuori *et al.*, 2010).

Perlakuan terhadap zebrafish berupa pemaparan ekstrak daun kelor terhadap zebrafish yang dipapar DIO dengan tiga dosis berbeda, yakni dosis A (0,56 ppm), dosis B (1,12 ppm), dan dosis C (2,24 ppm) yang dibandingkan dengan kontrol positif (DIO) dan kontrol negatif (non-DIO) dilakukan selama 40 hari. Pada hari ke-41, dilakukan pembedahan dan pengambilan lemak visceral zebrafish untuk dilakukan pengukuran kadar total kolesterol, HDL, dan LDL/VLDL.

Kolesterol adalah substansi yang dihasilkan oleh liver, dan dapat memiliki efek yang baik (dalam bentuk HDL) dan buruk (dalam bentuk VLDL) (Ma dan Shieh, 2006). Kolesterol total tubuh mencerminkan keseimbangan antara sintesis *de novo*, asupan makanan, efisiensi penyerapan, metabolisme, resirkulasi enterohepatik dan ekskresi (baik sebagai asam kolesterol maupun asam empedu). Salah satu efek tingginya kolesterol adalah penyakit kardiovaskular (Griffin dan Lichtenstein, 2013)

Pengamatan pada konsentrasi total kolesterol menunjukkan adanya perbedaan antara kontrol negatif (non-DIO), kontrol positif (DIO), dosis A (0,56

ppm), B (1,12 ppm), dan C (2,24 ppm). Dari kontrol negatif (non-DIO) ke kontrol positif (DIO) terjadi peningkatan total kolesterol yang signifikan ( $p=0,00$ ). Peningkatan secara signifikan dari kontrol negatif (non-DIO) ke kontrol positif (DIO) juga terlihat pada konsentrasi HDL ( $p=0,001$ ) dan konsentrasi LDL/VLDL ( $p=0,046$ ). Peningkatan ini diduga terjadi akibat pemberian dosis artemia yang berbeda, yang merupakan diet yang dapat menginduksi obesitas.

Dalam penelitian ini menggunakan artemia sebagai satu-satunya asupan makanan, di mana artemia memiliki kandungan lemak. 22% lemak, 16% karbohidrat dan 44% protein pada berat keringnya (Oka *et. al.*, 2010). Berdasarkan uji proksimat dari FTP UB, 2017 (Data terlampir) artemia memiliki protein 43,88%, lemak 12,31%, air 7,60%, abu 3,40%, dan karbohidrat 32,81%. Dalam menginduksi obesitas, dilakukan pemberian *Artemia nauplii* sebagai *Diet Induced Obesity* (DIO) sebanyak 60 mg/ekor/hari yang setara dengan 300 kalori, di mana pemberian dosis dapat meningkatkan jumlah lemak yang dikonsumsi oleh zebrafish (Oka *et. al.*, 2010). Pada kelompok kontrol Non DIO zebrafish diberi artemia sebanyak 5 mg/hari/ekor (Oka *et. al.*, 2010).

Dalam artemia terdapat kandungan yang tertinggi yakni protein (Oka *et. al.*, 2010; FTP, 2017). Protein akan diubah menjadi asam amino dan kemudian dikonversi menjadi *acetyl-CoA*, yang dapat membentuk asam lemak (Guyton dan Hall, 2015). Asam lemak kemudian akan membentuk TG yang disimpan di jaringan adiposa (Guyton dan Hall, 2015). Kandungan karbohidrat mengalami metabolisme yang menghasilkan  *$\alpha$ -glycerolphosphatase* yang dapat membentuk gliserol sebagai salah satu bahan dasar pembentuk TG (Guyton dan Hall, 2015). Peningkatan jumlah dan ukuran jaringan adiposa dapat meningkatkan berat badan dan kadar kolesterol sehingga mengalami kegemukan (Tchernof dan Despres, 2013).

Adapun kandungan artemia lainnya, yakni lemak, akan disimpan dalam bentuk trigliserida (TG) di hepar dan jaringan adiposa yang tersebar dalam berbagai depot sebagai *white adipocyte tissue* (WAT) (Imrie dan Sadler, 2010; Guyton dan Hall, 2015). TG dapat dipecah menjadi asam lemak atau *fatty acid* (FA) apabila diperlukan untuk energi (Guyton dan Hall, 2015). Asam lemak ditransport di pembuluh darah dalam bentuk lipoprotein berupa VLDL, LDL, dan HDL (Guyton dan Hall, 2015).

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan secara signifikan konsentrasi kolesterol total dari kontrol positif (DIO) ke dosis A (0,056 ppm) ( $p=0,002$ ). Demikian juga terdapat perbedaan yang signifikan pada kadar HDL ( $p=0,001$ ) dan LDL/VLDL ( $p=0,00$ ) dari kontrol positif (DIO) ke dosis A (0,05 ppm). Namun dari kontrol negatif (non-DIO) ke dosis A (0,56 ppm) tampak tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan baik pada kadar kolesterol total ( $p=0,174$ ), konsentrasi HDL ( $p=0,083$ ), maupun pada konsentrasi LDL/VLDL ( $p=0,382$ ). Hal ini menunjukkan bahwa pada dosis 0,56 ppm ekstrak daun kelor dapat memberi efek menurunkan kadar kolesterol pada *zebrafish* yang diinduksi DIO sehingga profil lipidnya menjadi seperti non-DIO.

Kelor (*Moringa oleifera*) merupakan tanaman yang tumbuh dan dibudidayakan di daerah tropis yang memiliki banyak manfaat, salah satunya sebagai antiobesitas dan agen hipolipidemik pada tikus (Roloff *et al.*, 2009; Al-Asmari *et al.*, 2015; Rajanandh *et al.*, 2010; Bais *et al.*, 2014; Leone *et al.*, 2015). Daun kelor memiliki beberapa komponen seperti  $\beta$ -sitosterol sebanyak 90 mg/g, komponen fenol sebanyak 8 $\mu$ g/mL dan komponen flavonoid total sebanyak 27  $\mu$ g/mL. Komponen fenol yang terdapat pada daun kelor bekerja dengan menghambat kerja enzim Pancreatic Lipase (PL) (Sergent *et al.*, 2012).

Lipase merupakan enzim yang mencerna lemak, termasuk TG dan fosfolipid. Enzim lipase pada manusia terdapat dua macam, yakni pre-duodenal

(*lingual* dan *gastric*) dan extra-duodenal (pancreatic, hepatic, lipoprotein dan endothelial) lipase. PL (*triacylglycerol acyl hydrolase*) merupakan enzim lipolitik yang disekresi oleh pankreas dan memiliki peranan penting dalam digesti TG secara efisien (Birari dan Bhutani, 2007).

Komponen lain yang terdapat pada daun kelor adalah kaempferol dan quercetin yang juga memiliki beberapa jalur untuk mencegah obesitas (Aguirre *et al.*, 2011).  $\beta$ -sitosterol yang juga terdapat pada daun kelor merupakan fitosterol yang dapat menghambat penyerapan kolesterol di usus (Wahli *et al.*, 2014; Saeidnia *et al.*, 2014).

Salah satu penelitian terkait kolesterol di *zebrafish* adalah penelitian efek ezetimibe pada *zebrafish* (Baek *et al.*, 2012). Ezetimibe dan  $\beta$ -sitosterol sama-sama memiliki efek yang berhubungan dengan penyerapan kolesterol melalui NPC1L1 (Turley, 2008; Baek *et al.*, 2012). Pada *zebrafish* terdapat NP111 yang homolog terhadap protein *Nieman-Pick C1-like protein 1* (NPC1L1), yang berhubungan dengan absorpsi usus dan transfer kolesterol, serta merupakan target dari ezetimibe, obat yang berfungsi untuk menurunkan kolesterol (Fang *et al.*, 2014). Asam lemak dari makanan akan mempromosikan absorpsi kolesterol intestinal melalui relokasi cepat Npc111 ke intestinal brush border untuk diabsorpsi (Fang *et al.*, 2014). Pemberian ezetimibe dapat mengurangi kadar kolesterol di *zebrafish* (Baek *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2014). Cara kerja ezetimibe pada *zebrafish* sama dengan cara kerja  $\beta$ -sitosterol dalam menghambat absorpsi lemak.

Pada penghitungan konsentrasi LDL/VLDL, dosis A (0,56 ppm) tampak memiliki standar deviasi yang besar, namun masih signifikan terhadap kontrol negatif (non-DIO). Besarnya standar deviasi kemungkinan bisa terjadi karena pengaruh individu *zebrafish* sehingga sebaran data luas. Dalam akuarium dapat terjadi berbagai faktor seperti kompetisi makanan, perbedaan genetik individual,

dan faktor lain yang menimbulkan perbedaan pertumbuhan sel adiposit (Gut, 2017).

Bila dibandingkan dengan dosis A (0,56 ppm) dosis B (1,12 ppm) dan C (2,24 ppm) tampak menunjukkan hasil yang tidak begitu baik terhadap kolesterol. Dosis B (1,12 ppm) tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan terhadap kontrol positif (DIO) baik pada konsentrasi kolesterol total ( $p=0,822$ ), maupun pada konsentrasi LDL/VLDL ( $p=0,762$ ). Sementara pada dosis C (2,24 ppm) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kontrol positif (DIO) pada konsentrasi HDL ( $p=0,195$ ), dan pada konsentrasi LDL/VLDL ( $p=0,089$ ). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian dengan dosis 1,12 ppm dan 2,24 ppm tidak menunjukkan perbaikan profil lipid yang bermakna. Sehingga meskipun total kolesterol pada dosis C (2,24 ppm) tampak mengalami penurunan, perbaikan profil lipid tidak sebagus apabila diberikan dosis A (0,56 ppm).

Pada dosis B (1,12 ppm) menunjukkan peningkatan secara tidak signifikan pada kolesterol total dan LDL/VLDL. Kenaikan kolesterol pada dosis B (1,12 ppm) dapat diduga karena dosis kelor yang semakin besar tidak memiliki pengaruh terhadap perbaikan profil lipid yang lebih baik. Pada percobaan oleh Zvinorova *et al.* bahwa pemberian serbuk daun *Moringa oleifera* pada 20% massa tubuh tidak meningkatkan maupun menurunkan performa pertumbuhan pada hewan, namun pemberian pada 14% massa tubuh menghambat pertumbuhan secara linear (Zvinorova *et al.*, 2015). Salah satu massa tubuh yang diukur adalah lemak visceral (Zvinorova *et al.*, 2015). Hal ini menambah kemungkinan bahwa kelor tidak menurunkan kolesterol secara *dose dependant*.

Fitosterol memiliki efek sebagai *endocrine* dan *metabolic disruptor*. Penelitian oleh Nieminen *et al* menunjukkan adanya karakteristik hasil berbentuk kurva U terbalik pada pemberian fitosterol (Nieminen *et al.*, 2002).  $\beta$ -sitosterol meningkatkan LDL pada dosis tertingginya (5 mg/kg/hari) walaupun pada dosis

sebelumnya (0 mg/kg/hari, 1 mg/kg/hari, 5 mg/kg/hari) tampak terjadi penurunan berturut-turut (Nieminen *et al.*, 2002). Pada HDL, pola serupa juga tampak terjadi secara signifikan (Nieminen *et al.*, 2002). Pada penelitian terhadap total kolesterol yang dilakukan terdapat penurunan dan peningkatan yang tidak *dose dependent* (Nieminen *et al.*, 2002). *Endocrine disruptor* yang dapat menginduksi obesitas dengan mengganggu jalurnya disebut Obesogen (Grun, 2010). Fitoestrogen dapat berupa komponen fenol maupun  $\beta$ -sitosterol (Patissaul dan Jefferson, 2010, Brown *et al.*, 2011).

Faktor-faktor asupan diet seperti fitoestrogen dapat memodulasi *signaling* reseptor estrogen (Grun dan Blumberg, 2009). Fitoestrogen memiliki struktur yang mirip seperti estrogen pada mamalia dan dapat berikatan dengan reseptor estrogen (Patissaul dan Jefferson, 2010). Hormon steroid seperti estrogen memiliki efek mobilisasi penyimpanan lipid dan memiliki efek yang berlawanan terhadap insulin dan kortisol pada akumulasi lipid. Tingginya hormon ini akan menimbulkan efek berupa dislipidemia dan obesitas (Grun dan Blumberg, 2009).

Fungsi utama sel lipid adalah untuk menyimpan energi dan mengeluarkan saat dibutuhkan. Pembentukan sel lemak dapat dengan cara mengaktivasi sel PPAR $\gamma$  di preadiposit menjadi adiposit. Banyak *endocrine disruptor* menunjukkan kurva berbentuk U inversi pada response terkait dosis. Beberapa *endocrine disruptor* lebih memberi dampak pada dosis rendah dibandingkan dosis tinggi karena ada efek *down regulation* dari reseptor (Holtcamp, 2012).

Dengan dosis terendah (0,56 ppm) dari kelor mampu menurunkan kolesterol dan paling signifikan meningkatkan HDL dan menurunkan kadar LDL/VLDL. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian kelor mampu memberikan efek menurunkan kolesterol.

## 6.2 Implikasi pada Bidang Kedokteran

Dari penelitian, tampak bahwa ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) memiliki dampak secara signifikan untuk menurunkan kadar kolesterol total dan secara signifikan meningkatkan kadar HDL dan menurunkan kadar LDL/VLDL pada dosis 0,56 ppm. Hal ini diakibatkan kandungan kelor, yakni fenol, quercetin, kaempferol, dan  $\beta$ -sitosterol yang memiliki berbagai cara menurunkan kadar kolesterol. Salah satu kandungan kelor, yakni  $\beta$ -sitosterol memiliki cara kerja yang mirip dengan simvastatin.

Efek kelor ketika dosis ditingkatkan terjadi kenaikan dan penurunan kolesterol total yang terjadi tidak secara signifikan, dikarenakan kemungkinan efek fitosterol dalam kandungan ekstrak daun kelor memiliki efek sebagai *endocrine disruptor* atau akibat dosis kelor yang menimbulkan efek toksik.

## 6.3 Keterbatasan Penelitian

Dalam penelitian ini belum dapat ditentukan dosis kelor yang bersifat *endocrine disruptor* ataupun bersifat toksik. Oleh sebab itu perlu penelitian lebih lanjut dengan rentang dosis yang lebih besar untuk mengobservasi efek kelor tersebut.

Pada penelitian hanya dilakukan pengukuran profil lipid terhadap ikan betina saja, namun pada jantan tidak dilakukan sehingga profil lipid pada ikan jantan dan betina belum dapat dibandingkan.