

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Karakteristik Sampel

Pemilihan hewan coba pada awal penelitian dilakukan sesuai dengan kriteria inklusi untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Karakteristik sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan jenis *Rattus norvegicus* Strain Wistar dengan berat awal berkisar antara 180-250 gram, umur rata-rata 2-3 bulan, dan dalam keadaan sehat. Penelitian ini menggunakan 30 ekor tikus sebagai sampel yang dibagi dalam 5 kelompok perlakuan yakni kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3. Pengelompokan tikus dalam kelompok perlakuan dilakukan dengan teknik randomisasi agar setiap tikus memiliki peluang yang sama untuk menjadi sampel pada tiap kelompok perlakuan.

Hasil uji statistik normalitas dan homogenitas berat badan awal tikus diperoleh nilai yang signifikan $p > 0,05$ ($p=0,168$). Dengan homogenitas ini maka diharapkan dapat mengurangi terjadinya bias pada penelitian, sehingga segala perubahan yang terjadi pada tikus hanya disebabkan oleh perlakuan yang diberikan selama penelitian. Penelitian Galuh (2008) juga menyatakan bahwa kondisi tikus yang homogen sangat membantu dalam mengurangi bias, sehingga segala perubahan yang terjadi hanya karena perlakuan selama penelitian.

6.2 Perubahan Berat Badan dan Asupan Pakan Tikus Selama Penelitian

Berdasarkan hasil dari pengukuran berat badan tikus tiap minggu didapatkan rata-rata berat badan akhir tikus tertinggi adalah kelompok kontrol negatif yaitu sebesar 351,67 gram, sedangkan rata-rata berat badan akhir tikus terendah adalah kelompok P3 yaitu sebesar 264 gram. Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (P0) yaitu 351,67 gram, kelompok diabetes (kelompok P1, P2, P3, dan P4) memiliki rata-rata berat badan akhir yang lebih rendah yakni masing-masing 285 gram, 291,67 gram, 264 gram, dan 285 gram. Hal ini menunjukkan selama penelitian, terjadi penurunan berat badan pada tikus diabetes.

Penyebab penurunan berat badan pada kelompok tikus diabetes disebabkan karena sel tidak menghasilkan energi akibat glukosa darah tidak dapat masuk ke dalam sel. Sehingga memicu terjadinya glukoneogenesis, dimana cadangan glukosa yang ada pada jaringan otot dan adiposa dipecah melalui mekanisme lipolisis dan proteolisis. Hal inilah yang menyebabkan berat badan menurun (Pratiwi, 2012 ; Puspati, 2013).

Sejalan dengan pernyataan diatas, hasil penelitian yang dilakukan oleh Nugroho (2006) juga menunjukkan bahwa rerata penambahan berat badan pada tikus kelompok diabetes lebih rendah dibandingkan dengan tikus normal. Hiperglikemia pada tikus diabetes meningkatkan stress oksidatif dimana tingkat stress yang tinggi dapat mempengaruhi nafsu makan dan berdampak pada penurunan berat badan (Nugroho, 2006).

Rerata asupan pakan tertinggi pada kelompok P4 yaitu sebesar 36,14 gr (82,74%). Sedangkan rerata asupan pakan terendah ditunjukkan oleh

kelompok P0 yakni sebesar 29,97 gr (66,84%). Hal ini menunjukkan bahwa rerata asupan pakan pada kelompok diabetes (kelompok P1, P2, P3, dan P4) lebih tinggi jika dibandingkan dengan rerata asupan pakan pada kelompok kontrol negatif (P0). Peningkatan asupan pakan pada kelompok diabetes disebabkan karena tingginya kadar glukosa darah namun tidak dapat digunakan sebagai sumber energi bagi sel. Penurunan suplai energi tersebut menyebabkan sel mengalami kelaparan dan mendeteksi adanya hipoglikemi sehingga mengirimkan sinyal kepada saraf pusat untuk meningkatkan suplai energi dengan cara meningkatkan nafsu makan. Akibatnya, individu dengan diabetes mellitus tersebut akan terus merasa lapar (polifagia) (Behrend, 2010).

6.3 Kadar Glukosa Darah Tikus Selama Penelitian

Tikus dinyatakan mengalami diabetes mellitus jika kadar glukosa darah mencapai ≥ 200 mg/dL selama dua hari berturut-turut setelah diinduksi STZ (Amirshahrokhi, 2008). Dari hasil penelitian, kadar glukosa darah puasa tikus setelah 3 hari diinduksi STZ meningkat pada kelompok P1 = 339,50 mg/dL, P2 = 422,33 mg/dL, P3 = 414,6 mg/dL, dan P4 = 350,00 mg/dL. Dengan demikian, dapat dikatakan tikus telah mengalami diabetes mellitus.

Terjadinya peningkatan glukosa darah pada tikus model diabetes mellitus tipe 2 akibat pemberian diet tinggi lemak dan induksi STZ. Pemberian diet tinggi lemak selama 4 minggu akan membuat resistensii insulin pada hewan coba melalui mekanisme fosforilasi serin pada reseptor insulin jaringan target akibat tingginya asam lemak bebas sehingga

mengurangi aktivitas *insulin signaling pathway* (GLUT-4) yang berfungsi membawa glukosa reseptor insulin ke dalam sel (Moreira, 2010).

Induksi STZ sendiri dapat menyebabkan kerusakan pada pankreas. STZ menembus sel β Langerhans melalui transporter glukosa GLUT 2 kemudian didalam intraseluler menghasilkan perubahan DNA dan merusak sel β Langerhans. Kerusakan tersebut terjadi melalui berbagai mekanisme antara lain alkilasi DNA, menghasilkan NO saat metabolisme sel, serta peningkatan oksigen reaktif. Kerusakan sel β Langerhans dapat mengaktivasi poli ADP-ribosilasi yang kemudian mengakibatkan penekanan NAD^+ seluler, selanjutnya penurunan jumlah ATP, dan akhirnya terjadi penghambatan sekresi dan sintesis insulin. Kurangnya insulin menyebabkan banyak glukosa yang tidak dapat ditransportasi ke dalam sel sehingga glukosa menumpuk dan meningkat dalam darah (hiperglikemi) (Nugroho, 2006).

Setelah diberi intervensi susu sapi bubuk, kadar glukosa darah akhir tikus mengalami penurunan yakni $\text{P2} = 262,50 \text{ mg/dL}$, $\text{P3} = 342,80 \text{ mg/dL}$, dan $\text{P4} = 334,25 \text{ mg/dL}$. Hal ini sesuai dengan penelitian Martin (2013), Candido (2013), dan Gao (2013) yang menunjukkan bahwa konsumsi produk susu dapat menurunkan gula darah puasa pada penderita diabetes melitus, dimana perannya dalam penurunan gula darah puasa tidak lepas dari kandungan vitamin D dan kalsium dalam produk susu yang berperan dalam memodulasi fungsi sel beta pankreas, resistensi insulin, dan inflamasi.

Vitamin D memiliki efek langsung terhadap kerja insulin dengan mengaktifkan enzim 1- α hidrosilase, enzim yang mengubah 25(OH)D3 menjadi bentuk aktif 1,25 dihidroksivitamin D3. 1,25 dihidroksivitamin D3 dapat berikatan dengan reseptor vitamin D pada sel β sehingga dapat meningkatkan ekspresi reseptor insulin. Selain meningkatkan ekspresi reseptor insulin, 1,25 dihidroksivitamin D3 juga meningkatkan eksositosis insulin melalui peningkatan ekspresi calbindin-D28K di sel β (Cavalier, 2011).

Vitamin D juga berperan secara tidak langsung pada aksi insulin dengan cara memfasilitasi penyerapan Ca^{2+} di usus sehingga dapat menjaga ketersediaan kalsium intrasel. Kalsium intrasel dapat meningkatkan calmodulin di IRS-1 dan menstimulasi fosforilasi tirosin. Kemudian terjadi aktivasi PI3 kinase yang dapat meningkatkan sekresi insulin (Pittas, 2007). Dengan berbagai mekanisme tersebut, vitamin D dan Ca dalam susu sapi bubuk dapat menurunkan kadar glukosa darah pada tikus.

6.4 Kadar Adiponektin Setelah Perlakuan

6.4.1 Hubungan Diabetes Mellitus dengan Kadar Adiponektin

Rerata kadar adiponektin tertinggi ditunjukkan oleh kelompok P0 yaitu sebesar 121,250 pg/ml. Sedangkan rerata kadar adiponektin terendah dialami oleh kelompok P1 yakni sebesar 97,138 pg/ml. Jika dibandingkan dengan kelompok tikus yang sehat (P0) dengan kadar adiponektin 121,250 pg/ml, rerata kadar adiponektin kelompok tikus model diabetes mellitus (P1, P2, P3, dan P4) lebih rendah yakni 97,138 pg/ml, 110,558 pg/ml, 108,280 pg/ml, 99,813 pg/ml. Hal ini sesuai dengan penelitian Abelgadir (2013) yang

menunjukkan bahwa kadar adiponektin lebih rendah pada subjek dengan diabetes mellitus tipe 2 dibandingkan dengan kontrol.

Insulin menekan ekspresi reseptor adiponektin yaitu adipoR1 di otot dan hepar. AdipoR1 merupakan reseptor adiponektin yang memiliki afinitas yang tinggi terhadap adiponektin globular yakni HMW yang berpartisipasi aktif dalam perbaikan sensitivitas insulin dalam metabolisme lipid dan glukosa serta terlibat dalam stimulasi oksidasi asam lemak bebas otot skelet. Sehingga peningkatan kadar insulin pada tikus model diabetes mellitus tipe 2 dapat menurunkan kadar adiponektin melalui resistensi adiponektin dan penurunan tersebut memperparah terjadinya resistensi insulin (Ismail, 2013).

Menurut Renaldi (2009) ekspresi reseptor adiponektin di otot pada penderita diabetes mellitus tipe 2 tidak mengalami perubahan, tetapi terjadi gangguan oksidasi asam lemak bebas yang disebabkan adanya kerusakan pada AMPK *downstream signalling* yang dapat menurunkan sensitivitas adiponektin khususnya adiponektin globular karena penurunan ekspresi AdipoR1. Selain itu, ekspresi adiponektin yang rendah juga disebabkan oleh TNF-alfa dan glukokortikotiroid yang kadarnya meningkat pada subyek obesitas dan diabetes mellitus.

Sesuai dengan 2 studi diatas, Su (2011) menjelaskan mekanisme terjadinya hipoadiponektinemia pada kondisi obesitas dan diabetes mellitus. Pada obesitas, peningkatan massa lemak menyebabkan terjadinya hipoksia jaringan adiposa dan meningkatkan stres *Endoplasmic Reticular* (ER). Stres ER ini juga terjadi pada dibates dimana stress ER merupakan elemen penting yang memediasi *downregulation* adiponektin. Penanda stress ER

yakni CHOP (*C/EBP homologous protein*) melemahkan aktivitas promotor adiponektin dan menekan ekspresi mRNA adiponektin di adiposit.

Obesitas dan diabetes juga menginduksi makrofag untuk filtrasi ke adiposit, sehingga terjadi inflamasi kronis tingkat rendah disertai dengan peningkatan produksi sitokin pro-inflamasi, seperti TNF- α , IL-6, dan IL-18. IL-18 secara selektif menekan ekspresi adiponektin melalui aktivasi ERK1/2-*dependent* NFATc4. IL-6 menghambat produksi adiponektin melalui p44/42 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Sedangkan mekanisme TNF- α terhadap hipoadiponektinemia terjadi melalui beberapa mekanisme yakni : pertama, TNF- α menekan ekspresi beberapa faktor promotor adiponektin, seperti PPAR γ , C/EBP, SREBP, DsbA-L, dan retinoid X reseptor- α . Kedua, TNF- α memproduksi faktor yang menghambat IGFBP-3 yang dapat menekan transkripsi adiponektin dan menginduksi resistensi insulin. Ketiga, TNF- α menghambat ekspresi adiponektin dengan mengaktifkan sistem JNK dan NF κ B.

Dan yang terakhir, obesitas dan resistensi insulin berkaitan dengan hormon katekolamin, glukokortikotiroid, dan β -adrenergik dimana aktivasi hormon-hormon tersebut turut menurunkan ekspresi dan sekresi adiponektin dalam adiposit *in vitro*.

6.4.2 Hubungan Asupan Susu sapi bubuk dengan Kadar Adiponektin

Kadar adiponektin pada kelompok tikus model diabetes mellitus tipe 2 namun tidak diberi perlakuan susu sapi bubuk (P1) lebih rendah jika dibandingkan kelompok tikus yang diinduksi model diabetes mellitus tipe 2

dan perlakuan susu sapi bubuk dengan dosis 0,9 gram, 1,8 gram, dan 2,7 gram (P2, P3, dan P4). Diantara kelompok tikus yang diberi perlakuan susu sapi bubuk, peningkatan kadar adiponektin tertinggi, jika dibandingkan oleh P1, ditunjukkan oleh P2. Sedangkan peningkatan kadar adiponektin terendah ditunjukkan oleh P4. Hal ini menunjukkan bahwa semakin kecil dosis susu sapi bubuk yang diberikan, kadar adiponektin tikus semakin meningkat. Walaupun terjadi peningkatan kadar adiponektin dibandingkan kelompok kontrol positif, namun hasil statistik uji beda dengan menggunakan uji *Mann Whitney* menunjukkan perbedaan kadar adiponektin tersebut tidak berbeda secara signifikan.

Martini (2009) menyebutkan bahwa konsumsi susu dapat menurunkan resiko diabetes mellitus. Mekanisme potensial yang mendasari efek susu terhadap penurunan resiko diabetes mellitus yakni melalui kandungan vitamin D dan kalsium pada susu sapi bubuk. Vitamin D dan kalsium berperan penting pada homeostatis glukosa. Selain itu, vitamin D juga berperan dalam peningkatan kadar adiponektin yang terbukti berpengaruh terhadap kejadian diabetes mellitus.

Penelitian oleh Mazloomi (2012) mendukung adanya hubungan vitamin D dengan adiponektin. Mekanisme vitamin D dalam meningkatkan kadar adiponektin adalah dengan meregulasi gen adiponektin melalui pengaturan ekspresi adipokine di lemak visceral. Selain itu, hubungan vitamin D dan adiponektin juga dimediasi oleh peran vitamin D yang mengatur gen TNF- α yang merupakan sitokin inflamasi yang dapat menghambat ekspresi dan menurunkan sekresi adiponektin. Studi yang dilakukan oleh Aoba (2013) juga menemukan bahwa mengkonsumsi produk *low-fat dairy* pada orang

dewasa sehat memiliki kadar adiponektin yang lebih tinggi. Berdasarkan uraian diatas menunjukkan bahwa konsumsi susu sapi bubuk dapat mempengaruhi kadar adiponektin.

Namun sebuah studi yang dilakukan oleh Yannakoulia (2008) tidak sesuai dengan studi-studi diatas. Dalam studi tersebut ditemukan bahwa tidak ada hubungan yang signifikan antara konsumsi *low-fat diary* dengan kadar adiponektin pada wanita sehat. Namun, pada wanita sehat yang mengkonsumsi lebih tinggi buah dan sedikit *low-fat diary* memiliki kadar adiponektin HMW tertinggi, dan secara statistik hanya konsumsi buah yang berhubungan secara signifikan dengan kadar adiponektin. Penelitian yang sama yang dilakukan oleh Yannakoulia (2008) dengan subyek yang sama yaitu wanita sehat namun memiliki karakteristik pola konsumsi yang berbeda menunjukkan bahwa wanita sehat yang mengkonsumsi *whole-grain cereals* dan *low-fat dairy* memiliki hubungan positif yang signifikan dengan konsentrasi sirkulasi adiponektin. Hal ini menunjukkan bahwa konsumsi susu sapi bubuk yang disertai dengan konsumsi serat yang cukup dapat membantu meningkatkan kadar adiponektin jika dibandingkan dengan hanya mengkonsumsi susu sapi bubuk saja.

Dalam penelitian ini, tikus hanya diberikan susu sapi bubuk rendah lemak tanpa diberikan serat. Sehingga peneliti berasumsi hal tersebut merupakan salah satu faktor penyebab mengapa secara grafik pemberian susu sapi bubuk dapat meningkatkan kadar adiponektin namun secara statistik peningkatan tersebut tidak signifikan berbeda jika dibandingkan dengan kontrol positif.

6.5 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Jumlah sampel dalam penelitian ini bervariasi disebabkan jumlah tikus yang mati setiap kelompok perlakuan yang berbeda-beda walaupun peneliti sudah mengontrol faktor konfonder dengan memberikan dosis STZ yang sama dan sesuai dengan berat badan masing-masing tikus.
2. Pada penelitian ini bahan untuk intervensi adalah susu sapi bubuk sehingga tidak dapat diketahui secara pasti komponen dalam susu yang lebih dominan berdampak pada variabel adiponektin.

