

Pengaruh Berbagai Interval Pembatasan Waktu Makan pada Kadar Insulin Serum dan Jumlah Sel di Pulau Langerhans Pankreas Tikus Wistar Betina dengan Diet Atherogenik

Dimas Putri Supawesti¹, Yoyon Arif Martino¹, Rahma Triliana¹

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

E-mail : dimasputri01@gmail.com

ABSTRAK

Pendahuluan : Diet atherogenik dapat menginduksi kematian sel di pulau Langerhans dan menyebabkan resistensi insulin yang mengakibatkan perubahan sekresi insulin. Pembatasan waktu makan diketahui dapat mengatur kadar insulin serum dan memperbaiki jumlah sel di pulau Langerhans. Namun, tipe pembatasan waktu makan yang dapat mengatur efek ini belum diketahui.

Metode : Penelitian ini menggunakan tikus wistar betina (34 ekor) usia 5 minggu. Terbagi 5 kelompok perlakuan (n=6) yaitu, (KN) diberi diet standar dan (KP) diet atherogenik 10 minggu, kelompok pembatasan waktu makan setiap hari (KSH), selang sehari (KDH), dan senin-kamis (KSK) diberi diet atherogenik 6 minggu, pembatasan waktu makan 4 minggu dengan diet atherogenik. Kelompok pra-perlakuan (n=4) diberi diet atherogenik selama 6 minggu. Kadar insulin serum diukur dengan *Rat Insulin ELISA Kit* dan jumlah sel di pulau Langerhans dihitung secara manual pada preparat histologi. Hasil data dianalisa dan dikatakan signifikan jika $p < 0.05$.

Hasil : Diet atherogenik cenderung meningkatkan kadar insulin serum dan jumlah sel di pulau Langerhans. Pembatasan waktu makan pada KSK cenderung memiliki kadar insulin serum lebih rendah dibandingkan KDH dan KSH. Jumlah sel di pulau Langerhans pada semua kelompok perlakuan masing-masing adalah 187.56 ± 39.02 , 208.03 ± 32.57 , dan 179.43 ± 39.05 pada KSK, KDH, dan KSH. Namun, semua data tidak didapatkan perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$).

Kesimpulan : Pembatasan waktu makan Setiap Hari, Dua Hari dan Senin Kamis tidak berpengaruh signifikan terhadap kadar insulin serum dan jumlah sel di pulau Langerhans tikus wistar betina dengan diet atherogenik.

Kata kunci : Diet atherogenik, Pembatasan waktu makan, Insulin serum, Jumlah sel di pulau Langerhans.

The Effect of Various Time-Restricted Feeding Intervals on the Levels of Serum Insulin and Pancreatic Cells Count of the Islet of Langerhans of Female Wistar Rats Fed with Atherogenic Diet

Dimas Putri Supawesti¹, Yoyon Arif Martino¹, Rahma Triliana¹

Medical Faculty of Islamic University Malang

E-mail : dimasputri01@gmail.com

ABSTRACT

Introduction : Atherogenic diets can induced cell death in the islet of langerhans and caused insulin resistance leading to changes in insulin secretion. Time restricted feeding were known to regulate serum insulin levels and improve islet cells health. However, which type of time restricted feeding is best to regulate these effects is unknown.

Methods : Female Wistar rats (n=34) aged 5 weeks. Were divided into 5 groups treatment (n=6) KN, KP, KSH, KDH AND KSK. KN was given standard diet while KP was given atherogenic diet for 10 weeks. Group of restricted diet were daily fasted (KSH), one day interval (KDH) fasted, and Monday-Thursday (KSK) fasted with atherogenic diet for 4 weeks after 6 weeks of atherogenic diet without fasting. A pre-treatment group (KPP, n=4) was given atherogenic diet for 6 weeks to evaluated the state of pre-restricted treatment. At the end of treatment, serum insulin were measured using *Rat Insulin ELISA Kit* while the number of cell in the islet of Langerhans was manually count in histologic preparations. Result were analyzed and considered as statistically significant if $p < 0.05$.

Results : Atherogenic diet tend to increase serum insulin levels and cell count. KSK restricted Feeding tend to have lower serum insulin levels compared to KDH or KSH. However this results were not statistically significant. Number of cell in the islet of langerhans in all treatment groups were 187.56 ± 39.02 , 208.03 ± 32.57 , dan 179.43 ± 39.05 in KSK, KDH and KSH group respectively but data has no statistical significance. ($p > 0.05$).

Conclusion : Daily, alternate and Monday-Thursday time restricted feeding have no statistical significance on the levels of serum insulin and cell count on the islet of Langerhans in female wistar Rats fed with atherogenic diets.

Keyword : Atherogenic diet, Time-restricted feeding, Serum insulin, Islet of Langerhans

PENDAHULUAN

Hiperlipidemia adalah peningkatan kadar lemak atau lipid dalam darah melebihi batas normal. Menurut World Health Organization (WHO), pada tahun 2008 prevalensi global hiperlipidemia pada orang dewasa adalah 37% pada pria dan 40% pada wanita. Data di Indonesia, menentukan prevalensi hiperlipidemia pada penduduk usia ≥ 15 dengan hiperkolesterolemia adalah 35,9% dan hipertrigliserida adalah 13% serta 15,9% penduduk berusia >15 tahun ini mengalami peningkatan kadar LDL. Hal ini perlu ditangani karena hiperlipidemia adalah faktor resiko penyakit jantung dan pembuluh darah yang beresiko meningkatkan angka kematian dan kecacatan¹⁹

Peningkatan kadar kolesterol dan trigliserida dalam darah disebabkan oleh asupan makanan tinggi lemak, contohnya mengonsumsi kolesterol berlebih¹. Salah satu konsumsi makanan tinggi lemak adalah diet atherogenik yang dapat meningkatkan kadar kolesterol dan trigliserida darah. Diet atherogenik dapat menyebabkan terjadinya ateroma pada tunika intima arteri sehingga arteri mengalami degenerasi dan menebal³. Konsumsi diet atherogenik pada hewan coba terbukti mampu merubah profil lipid, meningkatkan berat badan dan perlemakan hepar, serta menginduksi terjadinya proses atheroseklerosis pada tikus¹³.

Selain itu hiperlipidemia juga dapat mengaktivasi *protein kinase-C* (PKC) yang dapat mengganggu sinyal insulin sehingga terjadi resistensi insulin dan hiperglikemia^{6,7}. Hiperglikemia yang terjadi akan menyebabkan peningkatan sintesa hormon insulin oleh sel beta pankreas untuk mempertahankan euglikemi⁸. Namun, dalam jangka panjang, hal ini dapat menyebabkan sel beta pankreas mengalami kelelahan sehingga jumlah sel beta menurun dan sekresi insulin pun menurun¹⁰.

Pembatasan waktu makan atau yang biasa disebut puasa merupakan salah satu bentuk pengaturan pola makan yang dilakukan oleh umat Islam, maupun umat agama lain¹¹. Saat pembatasan waktu makan dilakukan, tidak ada asupan makanan dalam waktu tertentu, sehingga berimplikasi pada penggunaan simpanan lemak sebagai energi¹². Hal ini akan menyebabkan penurunan kadar kolesterol dan trigliserida dalam tubuh¹. Sehingga resistensi insulin akibat dari gangguan sinyal insulin dapat dihindari.

Berdasarkan intervalnya, puasa atau pembatasan waktu makan terbagi menjadi puasa yang dilakukan setiap hari dalam jangka waktu tertentu (puasa di bulan Ramadan), puasa yang dilakukan secara intermitten (puasa Daud) dan puasa yang dilakukan pada hari-hari tertentu (puasa hari Senin-Kamis), yang manfaatnya belum banyak diteliti. Oleh sebab itu, penelitian ini ingin mengetahui pengaruh berbagai interval pembatasan waktu makan dalam mengendalikan kadar insulin

serum dan jumlah sel di pulau langerhans tikus wistar jantan dengan diet atherogenik.

METODE PENELITIAN

Kelayakan Etik

Penelitian ini telah dinyatakan lulus oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya berdasarkan penerbitan Surat Kelayakan Etik "Ethical Clearance" No. 649-KEP-UB dan disetujui tanggal 28 November 2016.

Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental laboratorium menggunakan desain penelitian *control group post only* secara *in-vivo*. Penelitian ini dimulai dari bulan Oktober 2016 sampai April 2017. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium FK UNISMA: Lab. *Animal House* untuk pemeliharaan hewan coba, Lab. Biokimia untuk pembedahan hewan coba, Lab. Histologi untuk pemeriksaan histologi pankreas dan Laboratorium FK UB: Lab. Fisiologi untuk pemeriksaan kadar insulin serum, Lab. Patologi Anatomi untuk pembuatan preparat pankreas.

Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus wistar (*Rattus norvegicus*) betina sehat yang berusia 5 minggu. Tikus berasal dari Malang Murine Farm, Malang, Jawa Timur, Indonesia. Tikus dikelompokkan menjadi 5 kelompok yaitu kontrol negatif (KN), kontrol positif (KP), kelompok senin kamis (KSK), kelompok dua hari (KDH), dan kelompok setiap hari (KSH). Selain itu, terdapat 4 ekor tikus pra perlakuan untuk melihat efek diet atherogenik selama 6 minggu. Setiap ekor tikus ditempatkan dalam satu kandang (*single cage*). Penimbangan berat badan dilakukan satu minggu sekali sedangkan pembersihan kandang dan penggantian sekam dilakukan satu minggu dua kali.

Pembuatan Diet Standar dan Diet Atherogenik

Diet standar dibuat dengan mencampur konsentrat pakan ayam (PAR-S) 20 g/ekor, tepung terigu 10 g/ekor dan ditambahkan air secukupnya. Diet standar ini diberikan pada kontrol negatif selama penelitian (10 minggu).

Diet atherogenik dibuat dengan mencampurkan komposisi diet standar ditambah dengan kolesterol 0,2 g/ekor, asam kolat 0,02 g/ekor, minyak babi 1 ml/ekor dan air secukupnya¹³. Diet atherogenik diberikan pada kontrol positif dan kelompok perlakuan (KSK, KDH, KSH) selama 10 minggu.

Perlakuan Berbagai Interval Pembatasan Waktu Makan

Tikus diberikan perlakuan berbagai interval pembatasan waktu makan pada usia 11 minggu dalam kandang tunggal (*single cage*). Waktu pembatasan makan adalah 11 jam pada malam hari karena tikus termasuk hewan nokturnal. Makanan akan diambil pada pukul 20.00 WIB dan diberi makan kembali pada pukul 07.00 WIB.

Pada perlakuan pembatasan waktu makan Senin-Kamis, makanan akan diambil pada hari senin dan kamis, selain hari tersebut tikus tetap diberi makanan. Pada perlakuan pembatasan waktu makan Dua Hari, makanan akan diambil dua hari sekali (sehari diambil sehari tidak). Sedangkan pada perlakuan pembatasan waktu makan Setiap Hari, makanan diambil setiap hari pada pukul 20.00 WIB dan diberikan makan kembali pada pukul 07.00 WIB. Perlakuan pembatasan waktu makan ini dilakukan selama 4 minggu.

Pembedahan Hewan Coba

Setelah 4 minggu perlakuan pembatasan waktu makan, dilakukan pembedahan hewan coba. Langkah pertama yang dilakukan adalah anastesi dengan injeksi Ketamin dosis 5 mg/100grBB secara intramuskular. Setelah itu, moncong tikus dimasukkan ke dalam gelas *beaker* yang berisi *cloroform* agar tikus lemas. Setelah itu, dilakukan *cervical dislocation*. Kemudian tikus dibedah secara vertikal mengikuti linea mediana abdomen menuju ke thorax dengan gunting sampai seluruh abdomen dan thorax terbuka.

Pengambilan Serum Darah Hewan Coba

Setelah seluruh abdomen dan thorax tikus terbuka, darah diambil melalui ventrikel jantung dengan menggunakan spuit disposibel sebanyak ± 2 cc, kemudian dimasukkan ke dalam tabung vakum (*vacutainer*) tanpa anti koagulan (EDTA) untuk pemeriksaan serum. Tabung *Vacutainer* tanpa EDTA tersebut didiamkan selama 30-60 menit pada suhu kamar, selanjutnya disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Setelah itu cairan supernatan serum diambil dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *eppendorf* untuk disimpan didalam *freezer* pada suhu -80°C .

Pemeriksaan Kadar Insulin Serum

Cairan serum selanjutnya diperiksa kadar insulin nya dengan menggunakan metode Kit ELISA. Diawali dengan memasukkan 100 μL serum ke dalam masing-masing sumur *microplate*, kemudian diinkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C . Selanjutnya, cairan dibersihkan kemudian ditambahkan *Biotinylated Detection Ab* sebanyak 100 μL dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C . Setelah itu, aspirasi dilanjutkan mencuci masing-masing sumur *microplate* dengan Wash Buffer (350 μL) tiga kali. Selanjutnya, menambahkan

Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate sebanyak 100 μL untuk melarutkan, lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C . Dilanjutkan aspirasi dan mencuci masing-masing sumur *microplate* dengan Wash Buffer (350 μL) lima kali. Setelah itu, menambahkan 90 μL Substrate Reagent ke masing-masing *plate* kemudian diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C . Selanjutnya, menambahkan 50 μL *Stop Solution* pada setiap *plate* sehingga ada perubahan warna menjadi kuning. Terakhir, melakukan pengukuran *Optical Density* dengan menggunakan *microplate reader* pada gelombang cahaya 450 nm¹⁴.

Pembuatan Preparat Pankreas

Organ pankreas yang sudah diambil kemudian difiksasi menggunakan formalin 10%. Setelah itu secara berturut-turut dilakukan dehidrasi dengan acetone, kemudian dimasukkan kedalam xylol hingga jernih dan diblok dengan paraffin. Sayatan histologi dibuat menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-7 mikron, dan diwarnai dengan pengecatan *Hematoxilin-Eosin* (HE).

Pemeriksaan Histologi Pankreas

Pemeriksaan dilakukan dengan menghitung jumlah sel pada satu pulau Langerhans tikus yang diwarnai dengan pewarnaan *Hematoxilin-Eosin* (HE). Penghitungan dilakukan pada 5 lapang pandang dan selanjutnya ditentukan rata-ratanya untuk mendapatkan jumlah sel per satu pulau Langerhans. Pengamatan preparat pankreas dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400 kali¹⁵.

Teknik Analisa Data

Tahap awal dilakukan memasukkan data, setelah itu dilakukan uji normalitas menggunakan metode *kolmogorof smirnov* dan homogenitas menggunakan *levене*. Dilanjutkan *independent sample t-test* untuk menguji kelompok kontrol negatif dan positif. Data terdistribusi normal dan homogen karena nilai signifikansi $p > 0.05$. Selanjutnya dilakukan uji statistik *One Way ANOVA (Analysis Of Varians)*. Data yang tidak normal dan atau tidak homogen menggunakan uji statistik *Kruskal Wallis*. Metode ini dilakukan untuk menguji kelompok positif dan kelompok perlakuan. Hasil dikatakan bermakna bila $p < 0.05$. Semua analisa data dilakukan dengan memakai perangkat software statistik SPSS.

HASIL PENELITIAN

Karakteristik Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus wistar betina sehat yang berusia 5 minggu. Adapun kelompok yang digunakan, yaitu kelompok pra perlakuan atau fase induksi untuk melihat efek diet

atherogenik selama 6 minggu dan kelompok perlakuan. Karakteristik sampel pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 1 dan 2 berikut ini:

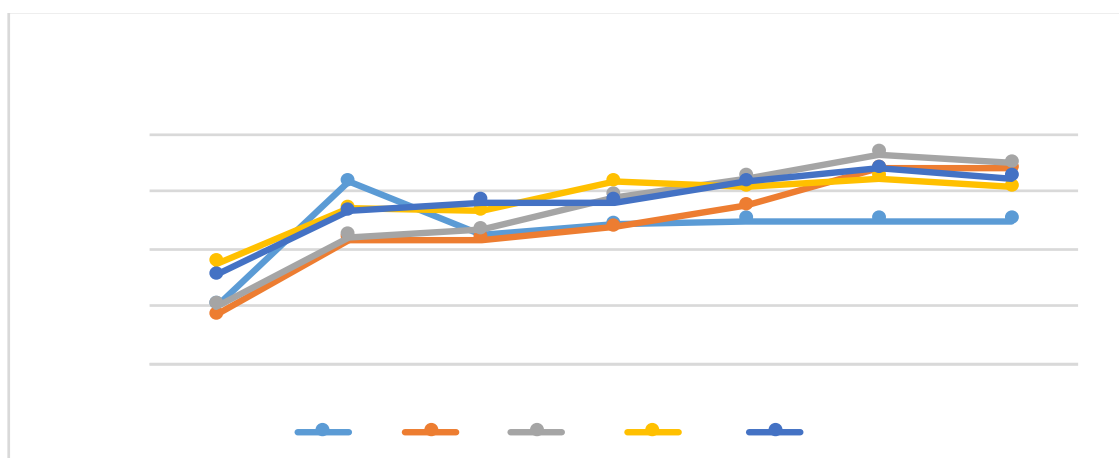
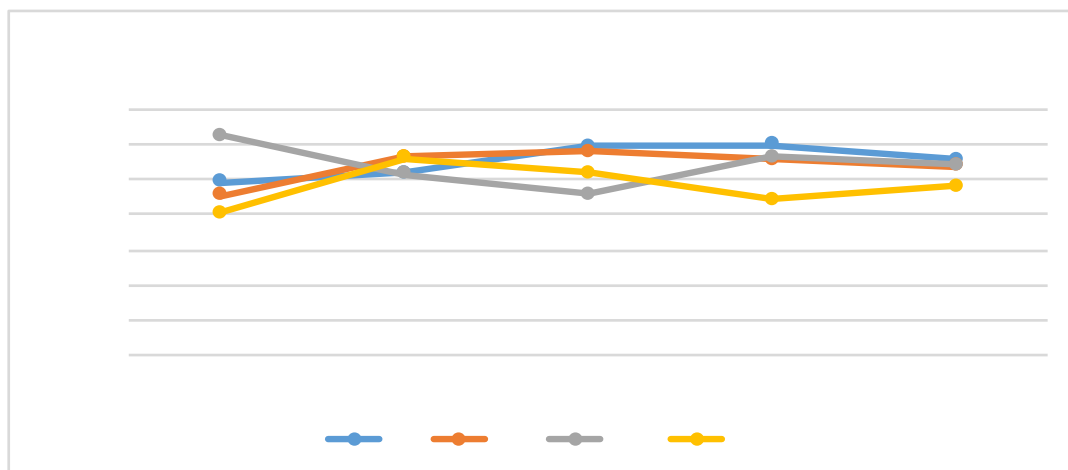
Tabel 1. Karakteristik Sampel Induksi Diet Atherogenik

Tikus Betina	Kelompok Pra Perlakuan (n=4)
Perlakuan	Induksi Diet Atherogenik
Usia Awal (minggu)	5
Lama Perlakuan (minggu)	6
Usia Akhir (minggu)	11
BB-Awal (gram)	110±8,16
BB-M 1 (gram)	120±16,32
BB-M 2 (gram)	130±25,81
BB-M 3 (gram)	140±18,25
BB-M 4 (gram)	175±19,14
BB-M 5 (gram)	201±16,52
BB-M 6 (gram)	225±10
Δ BB (gram)	+115±12,90

Keterangan: BB: Berat badan; M 1,2,3,4,5,6: Minggu ke-1,2,3,4,5,6; Δ BB: Selisih berat badan awal dan akhir. Data tidak dilakukan uji statistik.

Pada kelompok tikus pra perlakuan (Tabel 1) dengan induksi diet atherogenik selama 6 minggu, didapatkan peningkatan berat badan setiap minggunya dengan perubahan berat badan hingga dua kali lipat. Data tidak di uji statistik karena jumlah sampel hanya 4.

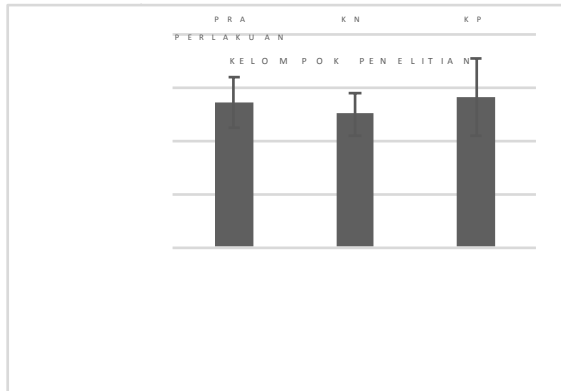
Data asupan makan dan berat badan tikus tidak normal tetapi homogen sehingga di uji statistik dengan menggunakan *One Way ANOVA*. Dari grafik 1 dibawah ini, dapat dilihat bahwa untuk asupan makan, berat badan maupun perubahan berat badan tikus selama perlakuan tidak didapatkan perbedaan yang signifikan.



Keterangan: KN: Kontrol Negatif; KP: Kontrol Positif; KSK: Kelompok Senin-Kamis; KDH: Kelompok Dua Hari; KSH: Kelompok Setiap Hari; M 1,2,3,4: Minggu ke-1,2,3,4; BB: Berat Badan; Δ BB: Selisih berat badan awal dan akhir perlakuan. Semua data di atas telah di uji statistic menggunakan *One Way ANOVA*

Kadar Insulin Serum Kelompok Pra Perlakuan dan Kontrol

Rerata kadar insulin serum pada kelompok pra perlakuan dan kelompok kontrol dapat dilihat pada gambar 1 berikut:



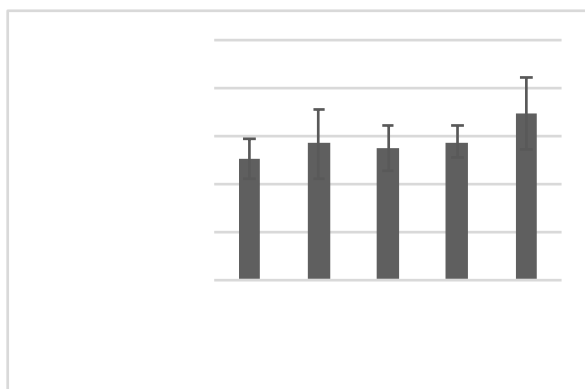
Gambar 1. Rerata Kadar Insulin Serum Kelompok Kontrol dan Pra Perlakuan

Keterangan: Rerata hasil kadar insulin serum kelompok pra perlakuan (n=4) 136.55 ± 24.28, Kontrol Negatif (KN) (n=6) 125.43 ± 20.94, Kontrol Positif (KP) (n=6) 141.30 ± 37.10.

Hasil uji statistik, data insulin serum pada KN dan KP didapatkan normal dan homogen ($P > 0.05$). Hasil *Independent Sample T-test* kadar insulin serum pada KN tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan KP. Kelompok pra perlakuan tidak dilakukan uji statistik dengan KN atau KP karena jumlah sampel hanya 4. Secara berurutan nilai tertinggi terdapat pada KP, kemudian pra perlakuan dan KN.

Kadar Insulin Serum Kelompok Perlakuan Berbagai Interval Pembatasan Waktu Makan

Rerata kadar insulin serum pada kelompok perlakuan berbagai interval pembatasan waktu makan dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 2. Rerata Kadar Insulin Serum Kelompok Perlakuan Berbagai Interval Pembatasan Waktu Makan

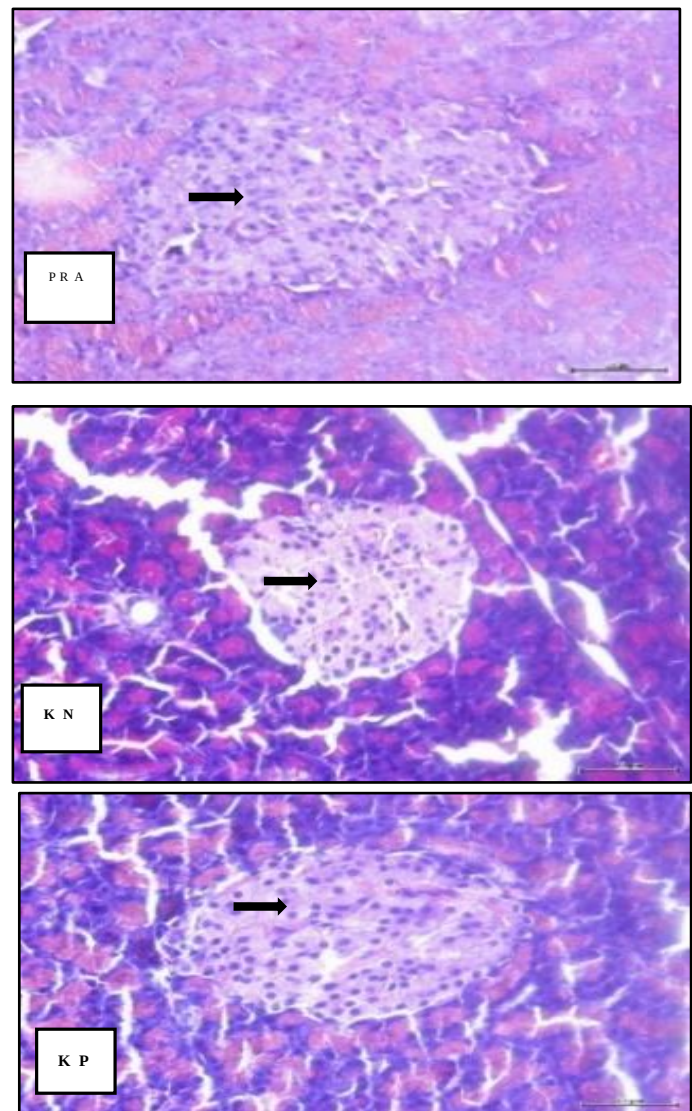
Keterangan: Rerata hasil kadar insulin serum Kontrol Negatif (KN) 125.43 ± 20.94 Kontrol Positif (KP) 141.30 ± 37.10,

Kelompok Senin Kamis (KSK) 137.40 ± 23.63, Kelompok Dua Hari (KDH) 143.33 ± 16.51, dan Kelompok Setiap Hari (KSH) 172.80 ± 38.33.

Hasil uji statistik, data kadar insulin serum didapatkan normal dan homogen ($P > 0.05$). Pada saat dilakukan uji *One Way ANOVA*, kadar insulin serum pada KSK, KDH dan KSH tidak didapatkan perbedaan yang signifikan dibandingkan KP. Nilai rerata tertinggi pada KSH, kemudian pada KDH, KP KSK dan yang terakhir KN

Jumlah Sel di Pulau Langerhans Kelompok Pra Perlakuan dan Kontrol

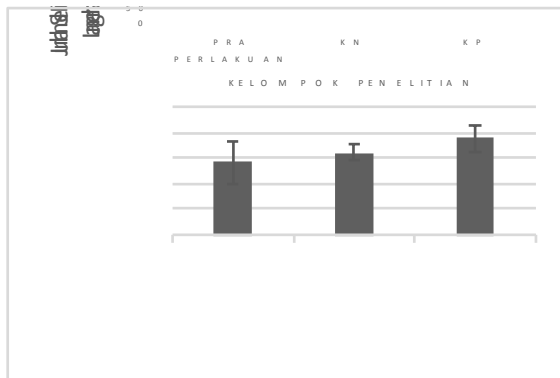
Gambaran sel di pulau langerhans pankreas tikus kelompok pra perlakuan dan kontrol dapat dilihat pada gambar berikut:



Langerhans Kelompok Pra Perlakuan dan Kontrol

Keterangan: Gambaran sel di pulau langerhans (➡) dengan pengecatan *Hematoxilin-Eosin* dan diamati dibawah mikroskop pada perbesaran 400x.

Rerata jumlah sel di pulau langerhans pada kelompok pra perlakuan dan kontrol dapat dilihat pada gambar berikut:



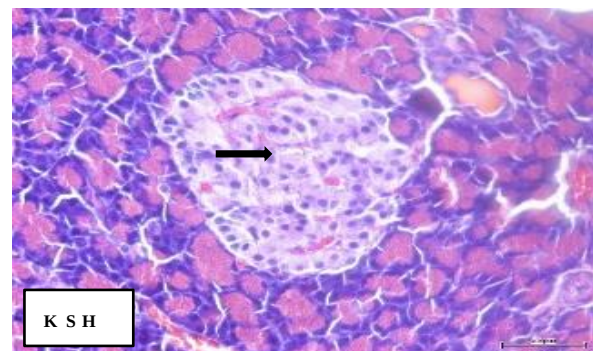
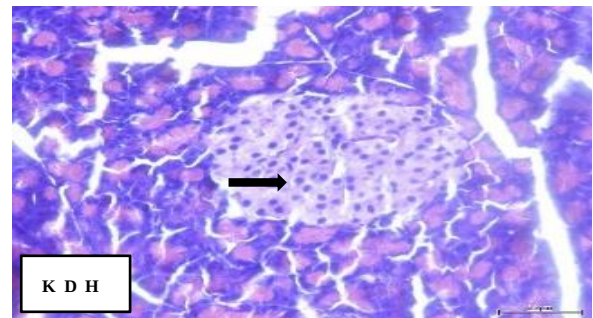
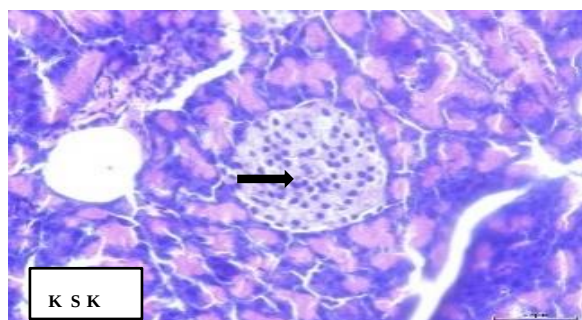
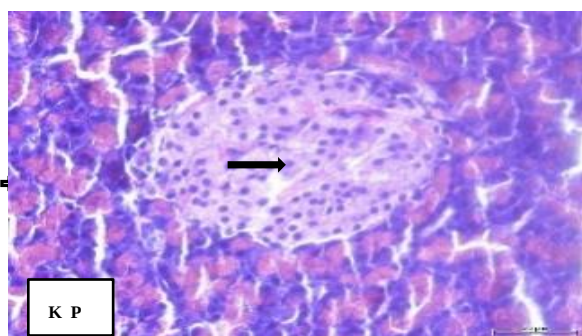
Gambar 4. Rerata Jumlah Sel Di Pulau Langerhans Kelompok Pra Perlakuan dan Kontrol

Keterangan: Rerata hasil jumlah sel di pulau langerhans kelompok pra perlakuan (n=4) 141.55±43.11, Kontrol Negatif (KN) (n=6) 160.50±13.97, Kontrol Positif (KP) (n=6) 188.90±25.72

Hasil uji statistik, data jumlah sel di pulau langerhans pada KN dan KP didapatkan normal dan homogen ($P>0.05$). Hasil *Independent Sample T-test* jumlah sel di pulau langerhans pada KN tidak berbeda signifikan dibandingkan dengan KP. Kelompok pra perlakuan tidak dilakukan uji statistik dengan KN atau KP karena jumlah sampel hanya 4. Secara berurutan nilai tertinggi terdapat pada KP, kemudian KN dan pra perlakuan.

Jumlah Sel di Pulau Langerhans Kelompok Perlakuan Berbagai Interval Pembatasan Waktu Makan

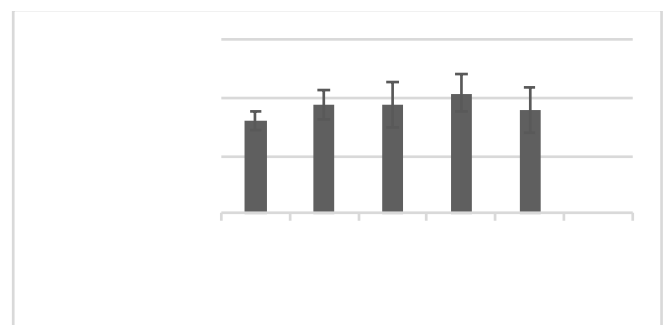
Gambaran sel di pulau langerhans pankreas tikus hasil penelitian dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 5. Gambaran Mikroskopis Sel di Pulau Langerhans Kelompok Perlakuan Berbagai Interval Pembatasan Waktu Makan

Keterangan: Gambaran sel di pulau langerhans (→) dengan pengecatan *Hematoxilin-Eosin* dan diamati dibawah mikroskop pada perbesaran 400x. Kontrol Positif (KP), Kelompok Senin Kamis (KSK), Kelompok Dua Hari (KDH), Kelompok Setiap Hari (KSH).

Rerata jumlah sel di pulau langerhans pada kelompok perlakuan berbagai interval pembatasan waktu makan dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 6. Rerata Jumlah Sel di Pulau Langerhans Kelompok Perlakuan Berbagai Interval Pembatasan Waktu Makan

Keterangan: Rerata hasil jumlah sel di pulau langerhans Kontrol Negatif (KN), Kontrol Positif (KP) 188.90±25.72, Kelompok Senin Kamis (KSK) 187.56±39.02, Kelompok Dua Hari (KDH) 208.03±32.57, dan Kelompok Setiap Hari (KSH) 179.43±39.05.

Hasil uji ststistik, data jumlah sel di pulau langerhans didapatkan normal dan homogen ($P>0.05$). Pada saat dilakukan uji *One Way ANOVA*, jumlah sel di pulau langerhans pada KSK, KDH dan KSH tidak didapatkan perbedaan yang signifikan dibandingkan KP. Nilai rerata tertinggi pada KSH, kemudian pada KP, KSK, KDH dan terakhir KN.

Hasil Uji Korelasi Kadar Insulin Serum dan Jumlah Sel di Pulau Langerhans

Setelah dilakukan uji korelasi *Pearson*, hubungan kadar insulin serum dan jumlah sel di pulau langerhans diperoleh nilai signifikansi $P=0,076$ ($>0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat hubungan yang bermakna secara statistik antara kadar insulin serum dengan jumlah sel di pulau langerhans. Nilai korelasi yang didapatkan mendekati 0 yaitu 0,329 yang menunjukkan bahwa tidak ada korelasi antara kedua variabel.

Correlations

		INSULIN	SELPULAULANGERHANS
INSULIN	Pearson	1	.329
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)		
	N		
SELPUL AULANG ERHANS	Pearson	.329	1
	Correlation		
	Sig. (2-tailed)		
	N		

PEMBAHASAN

Karakteristik Sampel

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus strain wistar berkelamin betina. Pemilihan tikus wistar sebagai hewan coba dikarenakan mudah diperoleh dan lebih tahan terhadap lingkungan laboratorium dan berbagai perlakuan¹³. Umur tikus diseragamkan 5 minggu yang dilakukan untuk memberi waktu induksi diet atherogenik selama 6 minggu dan kesempatan pemberian perlakuan berbagai interval pembatasan waktu makan selama 4 minggu tanpa resiko kehilangan hewan coba karena usia tua¹³.

Penggunaan kandang tikus secara individual (*single cage*) selain untuk mengurangi tingkat stres juga bertujuan mencegah terjadinya ketidakseimbangan jumlah asupan diet atherogenik yang diberikan serta untuk menghitung asupan makan tikus. Pembersihan kandang dan penggantian sekam dilakukan dua kali dalam seminggu. Hal ini dilakukan untuk menghindari stres yang berimplikasi pada asupan diet dan aktivitas tikus.

Penelitian ini menggunakan diet atherogenik, yaitu diet tinggi lemak yang terbukti mampu merubah profil lipid sehingga mengalami hiperlipidemia⁴. Formulasi tinggi lemak ini terdiri dari pakan standar (tepung terigu dan PARS), ditambah kolesterol, asam kolat, dan minyak babi⁵.

Diet atherogenik pada kelompok pra perlakuan dilakukan selama 6 minggu. Hal ini bertujuan untuk melihat apakah sebelum perlakuan pembatasan waktu makan sudah terjadi perubahan kadar insulin serum dan jumlah sel di pulau langerhans. Diet atherogenik untuk kelompok perlakuan dilakukan selama 10 minggu, yang terdiri atas proses induksi diet atherogenik selama 6 minggu dan perlakuan pembatasan waktu makan selama 4 minggu. Interval pembatasan waktu makan dilakukan selama 28 hari (4 minggu) karena mengacu pada lamanya berpuasa dibulan Ramadan untuk umat Islam.

Induksi diet atherogenik selama 6 minggu pada tikus kelompok pra perlakuan menunjukkan peningkatan berat badan setiap minggunya (Tabel 1). Hal ini terjadi karena diet atherogenik selama 6 minggu diketahui mampu meningkatkan profil lipid pada hewan coba¹⁶, dan meningkatkan berat badan setiap minggu.

Asupan makan tikus selama perlakuan tidak didapatkan perbedaan yang signifikan (Tabel 2). Asupan makan tertinggi terjadi pada kontrol positif, sedangkan kelompok senin kamis, kelompok dua hari dan kelompok setiap hari asupan makan bersifat fluktuatif. Hal ini terjadi karena pembatasan waktu makan akan mengurangi jumlah pakan yang dikonsumsi. Selain itu, perubahan nafsu makan dan aktivitas tikus juga mungkin berperan. Namun hal ini tidak diamati pada penelitian.

Berat badan pada penelitian ini ditimbang setiap minggu untuk mengetahui perubahannya. Secara umum rata-rata berat badan KP, KSK, KDH dan KSH dari sebelum perlakuan sampai akhir perlakuan justru mengalami peningkatan. Namun kelompok setiap hari terjadi penurunan berat badan pada perlakuan minggu pertama, kemudian meningkat sampai akhir perlakuan. Penurunan berat badan yang terjadi pada minggu pertama ini diduga karena tikus masih menyesuaikan diri dengan pola makan yang diberikan pada saat perlakuan. Rata-rata pertambahan berat badan dari yang tertinggi adalah KSK-KP-KSH-KDH. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian diet atherogenik mampu meningkatkan berat badan.

Interval pembatasan waktu makan tidak dapat menurunkan berat badan secara keseluruhan yang terlihat dari ΔBB (selisih berat badan) sebelum dan sesudah perlakuan yang tidak menurun. Artinya pembatasan waktu makan tidak mempengaruhi berat badan. Hal ini berlawanan dengan penelitian Eshghinia and Mohammadzadeh pada tahun 2013 yang menunjukkan penurunan berat badan dengan pembatasan waktu makan selama 6 minggu. Perbedaan ini mungkin terjadi karena diet yang diberikan adalah diet atherogenik sehingga asupan lemak tetap tinggi walau waktu makan terbatas. Oleh sebab itu, dalam menurunkan berat badan, komposisi diet yang dikonsumsi juga turut berperan pada keberhasilan penurunan berat badan.

Kadar Insulin Serum Tikus pada Kelompok Pra Perlakuan dan Kontrol

Dari hasil analisa statistik kadar insulin serum kelompok pra perlakuan dan kelompok kontrol (kontrol negatif dan kontrol positif) tidak didapatkan perbedaan yang signifikan (Gambar 1). Rerata kadar insulin serum pada kontrol positif (KP) cenderung tinggi dibandingkan kontrol negatif (KN). Hal ini menunjukkan bahwa secara statistik pemberian diet atherogenik selama 10 minggu belum mampu meningkatkan kadar insulin serum walaupun ada kecenderungan meningkat.

Kadar insulin serum yang cenderung meningkat ini terjadi karena induksi diet atherogenik. Pemberian diet atherogenik seperti kolesterol, asam lemak, dan minyak babi dapat menyebabkan hiperlipidemia, sehingga asam lemak dalam darah meningkat⁴. Hal ini mengakibatkan peningkatan sekresi insulin untuk mempertahankan kadar asam lemak darah dalam batas normal¹⁷. Salah satu efek insulin adalah meningkatkan pemasukan asam lemak dari darah ke dalam sel jaringan lemak¹⁷. Keadaan hiperlipidemia juga diketahui dapat mengganggu sinyal insulin dan menyebabkan terjadinya resistensi insulin yang menimbulkan hiperglikemia⁶. Hiperglikemia yang terjadi akan menyebabkan sel beta pankreas meningkatkan sintesa hormon insulin untuk mempertahankan euglikemia⁸.

Kadar insulin serum yang tinggi pada kontrol positif (KP) tidak signifikan dengan kontrol negatif (KN) karena kadar glukosa darah yang belum meningkat secara nyata dengan pemberian diet atherogenik selama 10 minggu¹⁸. Hal ini menunjukkan bahwa perubahan atau kecenderungan peningkatan kadar insulin serum kontrol positif (KP) lebih dominan karena hiperlipidemia dan bukan hiperglikemia.

Kadar Insulin Serum Tikus pada Kelompok Perlakuan Berbagai Interval Pembatasan Waktu Makan

Pada perlakuan interval pembatasan waktu makan tidak menunjukkan perubahan rerata kadar insulin serum yang signifikan pada semua kelompok perlakuan dibandingkan kontrol positif (KP) (Gambar 5.2). Hal ini menunjukkan bahwa interval pembatasan waktu makan secara statistik tidak dapat menurunkan kadar insulin serum. Berdasarkan gambar 5.2 rerata kadar insulin serum pada kelompok dua hari (KDH) dan kelompok setiap hari (KSH) lebih tinggi dibandingkan kontrol positif (KP), sedangkan pada kelompok senin kamis (KSK) cenderung lebih rendah dibandingkan kontrol positif (KP).

Perbedaan rerata kadar insulin serum kelompok perlakuan diduga terjadi akibat perbedaan pada rerata asupan makan dan berat badan. Tikus dengan berat badan berlebih dapat mengalami peningkatan

asam lemak dalam darah, sehingga terjadi peningkatan sekresi insulin oleh sel beta untuk mempertahankan kadar asam lemak darah dalam batas normal¹⁷.

Perlakuan pembatasan waktu makan akan menurunkan asupan makan pada hewan coba, sehingga asam lemak tubuh berkurang¹². Keadaan ini akan menurunkan kadar insulin dalam darah. Asam lemak dalam tubuh juga dapat mempengaruhi adiponektin yang mengatur sensitivitas insulin. Adiponektin merupakan adipokin yang berasal dari jaringan adiposa dan memiliki sifat insulinomimetik⁶. Namun adiponektin pada penelitian ini tidak diukur sehingga efeknya tidak dapat diketahui secara pasti.

Peningkatan kadar insulin serum pada KDH dan KSH diduga karena keadaan hiperglikemia sementara yang belum terkontrol, sehingga sintesa hormon insulin meningkat untuk mempertahankan euglikemia. Hal ini diduga tidak terjadi pada kelompok senin kamis (KSK). Penelitian Siswandevi 2017 menunjukkan pembatasan waktu makan dua hari dan setiap hari belum mampu menurunkan kadar glukosa darah secara signifikan. Sedangkan pada kelompok senin kamis (KSK) kadar glukosa darah sudah menurun, sehingga kadar insulin serum kelompok senin kamis (KSK) bernilai yang terendah.

Jumlah Sel di Pulau Langerhans Tikus pada Kelompok Pra Perlakuan dan Kontrol

Hasil analisa statistik jumlah sel di pulau langerhans pada kelompok pra perlakuan dan kelompok kontrol (kontrol negatif dan kontrol positif) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan (Gambar 5.4), walaupun jumlah sel di pulau langerhans pada kontrol positif lebih tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian diet atherogenik selama 10 minggu belum mampu menurunkan jumlah sel di pulau langerhans.

Kegagalan penurunan jumlah sel di pulau langerhans diduga karena nilai LDL yang belum meningkat secara nyata dengan diet atherogenik selama 10 minggu, sehingga belum mempengaruhi jumlah sel di pulau langerhans. Penelitian Zeng *et al.*, 2012 menunjukkan bahwa fungsi sel beta pankreas pada individu akan menurun dengan kadar LDL yang tinggi. Peningkatan kadar LDL akan menurunkan sekresi insulin dengan menghambat proliferasi sel beta pankreas²⁰.

Kelompok kontrol positif (KP) cenderung memiliki jumlah sel di pulau langerhans yang tinggi dibandingkan kontrol negatif (KN). Hal ini diduga karena aktivitas proliferasi sel beta yang meningkat seiring dengan peningkatan asam lemak tubuh karena hiperlipidemia (Sherwood, 2015).

Jumlah sel di pulau langerhans yang tinggi pada kontrol positif (KP) tidak signifikan dengan kontrol negatif (KN) dikarenakan perubahan berat badan yang fluktuatif setiap minggu, sehingga berpengaruh pada kadar asam lemak tubuh. Hal ini menunjukkan bahwa kecenderungan peningkatan jumlah sel di pulau langerhans kontrol positif (KP) disebabkan oleh hiperlipidemia.

Jumlah Sel di Pulau Langerhans Tikus pada Kelompok Perlakuan Berbagai Interval Pembatasan Waktu Makan

Pada perlakuan interval pembatasan waktu makan tidak menunjukkan perubahan jumlah sel di pulau langerhans yang signifikan pada semua kelompok perlakuan dibandingkan kontrol positif (KP) (Gambar 5.6). Berdasarkan Gambar 5.6, peningkatan rata-rata jumlah sel di pulau langerhans dari yang tertinggi adalah kelompok setiap hari (KSH), kelompok senin-kamis (KSK), dan kelompok dua hari (KDH).

Jumlah sel di pulau langerhans yang cenderung tinggi pada semua kelompok perlakuan diduga karena perubahan profil lipid yang terkontrol akibat adanya pembatasan waktu makan, sehingga asam lemak bebas yang meningkat dalam darah dapat dikendalikan. Keadaan ini menyebabkan peningkatan aktivitas regenerasi sel beta (Sherwood, 2015). Hal ini menunjukkan bahwa kecenderungan jumlah sel di pulau langerhans yang tinggi pada semua kelompok perlakuan disebabkan oleh hiperlipidemia yang sudah bisa dikendalikan.

Perbedaan rerata jumlah sel di pulau langerhans kelompok perlakuan terjadi akibat tipe berbagai interval pembatasan waktu makan yang dilakukan. Interval pembatasan waktu makan akan menurunkan asupan makan, sehingga menimbulkan efek pada aktivitas sel di pulau langerhans untuk mengatur metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein¹⁷.

Hubungan antara Kadar Insulin Serum dan Jumlah Sel di Pulau Langerhans

Kadar insulin serum dan jumlah sel di pulau langerhans pada semua kelompok tidak didapatkan perbedaan yang signifikan dan tidak adanya korelasi antara kedua variabel. Hal ini diduga karena nilai kolesterol pada komposisi diet yang kurang tinggi. Pada penelitian lain menyebutkan bahwa nilai kolesterol merupakan hal mendasar terkait dengan fungsi sekresi insulin sel beta. Akumulasi kolesterol berlebihan pada sel beta dapat menimbulkan lipotoksitas sehingga mengurangi sekresi insulin²⁰. Selain itu pemberian diet atherogenik selama 10 minggu pada penelitian ini yang diduga belum mampu menyebabkan keadaan resistensi insulin secara nyata. Sehingga tidak ada hubungan antara kadar insulin serum dengan jumlah sel di pulau langerhans.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian diet atherogenik selama 10 minggu belum dapat merubah kadar insulin serum pada tikus wistar betina secara signifikan.
2. Pemberian diet atherogenik selama 10 minggu belum dapat mempengaruhi jumlah sel di pulau langerhans tikus wistar betina.
3. Pembatasan waktu makan Senin-Kamis, Dua Hari, dan Setiap Hari tidak berpengaruh secara signifikan terhadap kadar insulin serum dan jumlah sel di pulau langerhans tikus wistar betina dengan diet atherogenik.

SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka peneliti memberikan saran demi mengembangkan penelitian ini, antara lain:

1. Melakukan penelitian lebih lanjut, terkait induksi diet atherogenik lebih dari 10 minggu terhadap resistensi insulin.
2. Melakukan penelitian lebih lanjut, terkait induksi diet atherogenik lebih dari 10 minggu terhadap perubahan jumlah sel di pulau langerhans.
3. Melakukan penelitian lebih lanjut, tentang penambahan kadar kolesterol pada komposisi diet atherogenik terkait resistensi insulin.
4. Melakukan penelitian lebih lanjut, tentang penambahan kadar kolesterol pada komposisi diet atherogenik terkait perubahan jumlah sel di pulau langerhans.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Ikatan Orangtua Mahasiswa (IOM) selaku pemberi dana pada penelitian ini dan kepada H. Yudi Purnomo, S.Si, Apt, M.Kes selaku reviewer jurnal.

DAFTAR PUSTAKA

1. Balgis, 2013. Pengaruh Pemberian Angkak (*Red Yeast Rice*) terhadap Kadar Kolesterol Total dan Trigliserida pada Wanita Penderita Hiperlipidemia. Program Studi Ilmu Gizi. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. *Journal of Nutrition College*. 4(2): 571-577.
2. Riset Kesehatan Dasar. 2013. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
3. Dorland, W.A.N. 2012. Kamus kedokteran. Edisi ke-31. Terjemahan: Retna Neary Elseria, et al., Penerbit Buku Kedokteran. EGC. Jakarta.

4. Speakman, J., Hambly C., Mitchell S., and Krol E. 2008. The Contribution of Animal Models to the Study of Obesity. *Laboratory Animals*. 42(4): 413-432.
5. Triliana, R., Soeatmadji, D.W. dan Kalim, H. 2012. Pengaruh Terapi Suplementasi Fitosterol pada Profil Lemak Plasma, Kadar Apolipoprotein (Apo) B-48, dan Penghitungan Sel Busa Aorta Tikus Pascadiet Atherogenik. *Journal of Experimental Life Science*. 2(2): 70 - 81.
6. Dewi, M. 2007. Obesity Related Insulin Resistance: Endocrine and Cell Intrinsic Mechanism. *Jurnal Gizi dan Pangan*. 2(2): 49 - 54.
7. Karpe, F., Dickmann, J.R., and Frayn, K.N. 2011. Fatty Acids, Obesity, and Insulin Resistance: Time for a Reevaluation. *Diabetes*. 60(10): 2441-2449.
8. Miranda, P.J., Defronzo, R.A., Califf R.M., and Guyton J.R. 2005. Metabolic Syndrome: Definition, Pathophysiology, and Mechanisms. *American Journal*. 149: 33-45.
9. Leibowitz, G., Yuli, M., Donath, M.Y., Nesher, R., Melloul, D., Gross, D.J., Cerasi, E. And Kaiser, N. 2001. Beta-Cell Glucotoxicity in the Psammomys Obesus Model of Type 2 Diabetes. *American Diabetes Association*. 50(1): 113.
10. Jensen, T.L., Kiersgaard, M.K., Sorensen, D.B., and Mikkelsen, L.F. 2013. Laboratory Animals: Fasting of Mice: A Review. 47(4): 225-240.
11. Murray, R.K., Granner, D.K., dan Rodwell, 2012. *Biokimia Harper*. Jakarta. ECG.
12. Munigar, M. 2013. Puasa Ramadhan dan Obesitas. *Jurnal Health Quality*. 1(4): 1-76.
13. Triliana, R. 2005. Pengaruh Terapi Suplementasi Sterol Tanaman (Fitosterol) pada Profil Lemak Plasma, Kadar Apolipoprotein (Apo) B-48, dan Penghitungan Sel Busa Aorta Tikus Pascadiet Atherogenik. Tesis. Program Studi Biomedik Minat Farmakologi Kedokteran. Program Pascasarjana. Universitas Brawijaya. Malang.
14. Elabscience. 2015. Rat Insulin ELISA Kit. Retrieved from www.elabscience.com. 1: 1-11.
15. Raharja, P.A.R, Mahardika, M.A., dan Wardana, P.W.A. 2012. Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Nanas (*Ananas comosus*) terhadap Regenerasi Sel Beta Pankreas Pada Tikus Dengan Diabetes Mellitus Tipe 2. *Essence of Scientific Medical Journal*. Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. Denpasar. 3(11).
16. Kanthal, S., Suresh, V., Arunachalam, G.P.R.F., and Kameshwaran. 2012. Anti-Obesity of Methanol Extract of *Tabernaemontana Divaricata* on Atherogenic Diet Induced Obesity. 3(3): 157-161.
17. Sherwood, L. 2015. Fisiologi Manusia Dari Sel ke Sistem. Edisi 8. Alih Bahasa: Brahm U. Pendit. Editor Edisi Bahasa Indonesia: Herman Octavius Ong, Albertus Agung Mahode, Dian Ramadhani. Penerbit Buku Kedokteran. EGC. Jakarta.
18. Siswandevi, N.A. 2017. Pengaruh Berbagai Interval Pembatasan Waktu Makan terhadap Kadar Glukosa Darah dan Kadar IGF-1 Serum Tikus Wistar Jantan Dengan Diet Atherogenik. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.
19. Sholihuddin, M. 2017. Pengaruh Berbagai Interval Pembatasan Waktu Makan terhadap Kadar Insulin Serum dan Jumlah Sel di Pulau Langerhans Pankreas Tikus Wistar Jantan Dengan Diet Atherogenik. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.
20. Zheng, T., Gao, Y., and Tian, H. 2012. Relationship between Blood Lipid Profiles and Pancreatic Islet A-Cell Function in Chinese Men and Women with Normal Glucose Tolerance: A Cross-Sectional Study. *BMC Public Health*. 12: 634.