

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

Penelitian yang dilakukan ini telah mendapatkan persetujuan penelitian dari *Medical and Health Research Ethics Comitte* (MHREC) Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Pihak MHREC mengeluarkan *Ethics Committee Approval* dengan nomor protokol: KE/FK/0994/EC/2018 sebagai tanda bahwa penelitian ini telah mendapatkan persetujuan komite etik.

4.1.1 Deskripsi Subjek Penelitian

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah Tikus Galur Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang berusia 2-3 bulan dengan berat badan 100-300 gram. Jumlah tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah 25 ekor sesuai dengan perhitungan rumus *festing*. Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah Tikus hiperlipidemia (kadar kolesterol total >130 mg/dl, LDL >60 mg/dl, dan trigliserida >100 mg/dl) dan rendah kadar HDL (<50 mg/dl). Kriteria eksklusi dalam penelitian ini adalah tikus mati selama proses penelitian berlangsung dan tikus mengalami perubahan fisik maupun fisiologis selama penelitian berlangsung. Tikus yang berjumlah 25 ekor dibagi ke dalam 5 kelompok yakni kelompok tikus sakit (K+), kelompok tikus kontrol/sehat (K-), kelompok perlakuan formulasi 1 (P1), kelompok perlakuan formulasi 2 (P2), kelompok perlakuan formulasi 3 (P3). Kelompok tikus sakit (K+), P1, P2 dan P3 mendapatkan intervensi kuning telur puyuh sebanyak 5 ml/200 grBB 1 kali sehari selama 1 bulan pertama penelitian. Pada 1 bulan berikutnya kelompok P1, P2 dan P3 mendapatkan intervensi minuman sinbiotik dengan dosis 85% susu 15% bengkuang (P1), 75% susu 25% bengkuang (P2), 65% susu 35% bengkuang (P3) yang diberikan sebanyak 5 ml/200 grBB 1 kali sehari selama 1 bulan.

Tabel 2. Rata-Rata Berat Badan Tikus Percobaan Sebelum dan Setelah Pemberian Minuman Sinbiotik.

Kelompok Penelitian	Rata-Rata	
	Berat Badan (gram)	
	Pre	Post
K+	211,9±21,8	214,5±10,4
K-	244,7±17,4	218,0±18,5
P1	216,0±9,53	220,8±0,31
P2	243,8±17,4	223,6±15,2
P3	217,5±16,7	223,1±18,8

Tabel 3. Rata-Rata Kadar Profil Lipid Tikus Percobaan Sebelum Intervensi Minuman Sinbiotik.

Kelompok Penelitian	Rata-Rata (mg/dl)			
	KT	LDL	TG	HDL
K+	203,50±2,15	76,81±1,46	141,97±3,09	25,98±1,30
K-	77,80±3,40	24,63±2,32	69,40±2,52	82,31±1,98
P1	203,06±5,68	77,64±3,64	144,98±5,32	25,17±1,73
P2	200±3,26	78,06±1,72	145,45±4,50	25,03±3,01
P3	205,69±3,66	78,61±6,33	146,24±6,44	25,98±2,69

Keterangan: KT; Kolesterol Total, LDL; *Low Density Lipoprotein*, TG; Trigliserida, HDL: *High Density Lipoprotein*.

4.1.2 Hasil Pemeriksaan Kadar *Malondialdehyde* (MDA) dan Aktifitas *Superoxide Dismutase* (SOD) Hepar

Setelah penelitian selesai, dilakukan terminasi terhadap hewan coba dan diambil organ hepar. Organ disimpan dalam kertas aluminium foil dan disimpan ke dalam *freezer* dengan suhu -4°C . Setelah itu, sampel organ dibawa ke Pusat Antar Universitas (PAU) UGM untuk dilakukan pemeriksaan kadar MDA dan aktifitas SOD pada sampel hepar.

Tabel 4. Rata-Rata Kadar *Malondialdehyde* (MDA) dan Aktifitas *Superoxide Dismutase* (SOD) Jaringan Hepar.

Kelompok Penelitian	Rata-Rata Kadar MDA (nmol/gr)	Rata-Rata Aktifitas SOD (%)
Kontrol Positif (K+)	11,8±0,17	21,43±2,52
Kontrol Negatif (K-)	2,5±0,12	71,43±3,91
Perlakuan P1	7,7±0,18	30,71±1,53
Perlakuan P2	5,7±0,10	50,35±2,84
Perlakuan P3	4,1±0,09	63,93±1,53

4.1.3 Hasil Analisis Data Pemeriksaan Kadar *Malondialdehyde* (MDA) dan Aktifitas *Superoxide Dismutase* (SOD) Hepar

Data yang telah didapatkan dari PAU UGM, kemudian dianalisis menggunakan software statistik dan didapatkan hasil bahwa data penelitian MDA dan SOD terdistribusi dengan normal dibuktikan dengan nilai $p > 0,05$ pada semua kelompok pada tabel shapiro-wilk (lampiran 2). Tabel shapiro-wilk dipilih karena jumlah subjek pada penelitian ini kurang dari 50 subjek. Selanjutnya, analisis yang dilakukan adalah *one way ANOVA* karena data penelitian terdistribusi dengan normal. Uji *one way ANOVA* dipilih karena pada penelitian ini ingin mengetahui perbedaan antar kelompok penelitian setelah dilakukannya intervensi penelitian.

Dari hasil uji *one way ANOVA* didapatkan hasil terdapat perbedaan antar kelompok penelitian yang dibuktikan dengan nilai $p < 0,001$ (lampiran 3). Hasil ini menunjukkan bahwa hasil *one way ANOVA* menunjukkan hasil yang signifikan. Setelah mengetahui bahwa hasil *one way ANOVA* menunjukkan hasil yang signifikan, kemudian dilakukan analisis *test of homogeneity of variances* untuk mengetahui variansi data. Berdasarkan *test of homogeneity of variances* didapatkan hasil bahwa data MDA dan SOD memiliki data yang tidak bervariasi (data homogen) yang dibuktikan dengan nilai $p > 0,05$ (lampiran 4) sehingga uji pos hoc yang dilakukan yakni pos hoc bonferoni.

Berdasarkan hasil tes pos hoc yang sudah dilakukan, didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara semua kelompok penelitian dengan $p < 0,001$ pada kadar MDA. Sedangkan pada hasil pos hoc pemeriksaan aktifitas SOD menunjukkan terdapat perbedaan antara semua kelompok kecuali antara K+ dengan

P1 karena memiliki nilai $p > 0,05$ ($P=0,213$) dan K- dengan P3 dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,571$). Hal ini bermakna tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok K+ dengan P1 dan kelompok K- dengan P3 (lampiran 5).

4.2 Pembahasan

Berdasarkan analisis data hasil penelitian, pemberian minuman sari bengkuang dan *kefir grains* sebagai minuman sinbiotik memberikan pengaruh yang signifikan dalam menurunkan kadar MDA dan meningkatkan aktifitas SOD pada jaringan hepar tikus model hiperlipidemia. Kadar awal MDA dan aktifitas SOD tikus setelah pemberian kuning telur puyuh (diet tinggi lemak) menunjukkan hasil terjadi peningkatan kadar MDA (rata-rata $11,8 \pm 0,17$ nmol/gr) dan penurunan aktifitas SOD (rata-rata $21,43 \pm 2,52$ %) pada kelompok tikus sakit (K+). Namun setelah pemberian minuman sinbiotik, terjadi penurunan kadar MDA dan peningkatan aktifitas SOD pada semua kelompok intervensi (data disajikan pada tabel 4).

Setelah dilakukannya uji *one way ANOVA* dengan pos hoc bonferoni didapatkan hasil terdapat perbedaan yang signifikan pada semua kelompok untuk kadar MDA hepar sedangkan aktifitas SOD hepar terdapat perbedaan antar kelompok namun tidak pada semua kelompok penelitian. Pada kelompok tikus kontrol positif (K+) dengan P1 perbedaan aktifitas SOD hanya memiliki nilai $p = 0,213$. Hal ini menunjukkan bahwa pada pemberian intervensi formulasi 1 tidak memberikan efek yang bermakna terhadap peningkatan kadar SOD jika dibandingkan dengan kelompok tikus kontrol positif (K+). Selain antara kelompok K+ dan P1, pemberian minuman sinbiotik juga tidak memberikan makna yang berbeda terhadap aktifitas SOD antara kelompok K- dengan P3 ($p = 0,571$). Hal ini menunjukkan bahwa intervensi minuman sinbiotik formulasi 3 (P3) memiliki aktifitas SOD yang sama dengan kelompok tikus kontrol negatif (K-) setelah pemberian minuman sinbiotik. Secara statistik perbedaan K- dan P3 tidak bermakna karena memiliki nilai $p > 0,05$ namun secara klinis bermakna karena kelompok intervensi P3 dapat mengembalikan aktifitas SOD seperti keadaan aktifitas SOD pada kelompok kontrol/sehat.

Setelah pemberian kuning telur puyuh terjadi peningkatan kadar MDA dan penurunan aktifitas SOD yang diakibatkan karena peningkatan LDL, trigliserida dan kolesterol total serta penurunan kadar HDL di dalam tubuh tikus. Perubahan kadar profil lipid tersebut menyebabkan akumulasi lemak di dalam jaringan hepar dan berefek terhadap peningkatan produksi ROS (Perla *et al.*, 2017). Keadaan ini jika terus terjadi akan menyebabkan kerusakan dari sel hepatosit, terutama akan merusak mitokondria dan retikulum

endoplasma sel. Salah satu biomarker ataupun tanda kerusakan sel akibat adanya peningkatan ROS yang dapat diperiksa adalah kadar MDA dan aktifitas SOD pada jaringan tersebut (Perla *et al.*, 2017),(Li *et al.*, 2015).

Malondialdehyde adalah bentuk akhir dari efek peroksidasi lemak akibat berikatannya ROS dengan PUFA (*polyunsaturated fatty acid*). Ketika semakin banyak ROS yang berikatan dengan PUFA maka akan semakin meningkatkan kadar MDA (Ayala, F.Muñoz and Argüelles, 2014). Selain itu, bentuk kompensasi tubuh paling utama ketika kadar radikal bebas tinggi di dalam tubuh adalah dengan cara memproduksi antioksidan. Antioksidan lini pertama yang akan diproduksi oleh tubuh adalah *superoxide dismutase* (SOD) bersamaan dengan *catalase* dan *glutathion peroxidase* (GSH). Namun pada keadaan hiperlipidemia dapat menyebabkan peningkatan kadar ROS yang menyebabkan tubuh sulit untuk mengompensasi sehingga berefek terhadap penurunan aktifitas antioksidan salah satu diantaranya adalah SOD (Ighodaro and Akinloye, 2017).

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang membuktikan bahwa pemberian diet tinggi lemak selama 30 hari memberikan efek terhadap penurunan kadar SOD pada jaringan hepar (Shrivastava, Chaturvedi and Bhatia, 2013). Selain itu, pada penelitian lainnya juga membuktikan pemberian diet tinggi lemak pada tikus menyebabkan peningkatan biomarker stress oksidatif yang salah satunya ditandai dengan peningkatan MDA dan penurunan aktifitas SOD pada jaringan hepar (Yao *et al.*, 2011),(Noeman, Hamooda and Baalash, 2011).

Setelah pemberian intervensi minuman sinbiotik sari bengkuang dengan *kefir grains* didapatkan hasil bahwa terjadi penurunan kadar MDA dan peningkatan aktifitas SOD pada kelompok intervensi. Sampai dengan saat ini, telah banyak penelitian yang membuktikan bahwa pemberian prebiotik, probiotik ataupun sinbiotik memberikan efek terhadap perbaikan kadar profil lipid darah, penurunan kadar MDA dan peningkatan aktifitas SOD pada plasma (Bahmani *et al.*, 2015), (Shakeri, Hadaegh and Abedi, 2014), (Markowiak and Slizewska, 2017), (Sáez-lara *et al.*, 2016), (Kleniewska *et al.*, 2016). Namun masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yang membuktikan secara langsung efek pemberian minuman sinbiotik yang mengandung probiotik dan prebiotik terhadap kadar MDA dan SOD pada jaringan hepar.

Penelitian tentang pemberian roti sinbiotik selama 8 minggu pada pasien diabetes melitus tipe 2 menunjukkan hasil yang signifikan dalam menurunkan kadar profil lipid yakni trigliserida dan VLDL serta meningkatkan kadar HDL jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (Shakeri, Hadaegh and Abedi, 2014). Pada penelitian lainnya, konsumsi

roti sinbiotik yang mengandung *Lactobacillus sporogenes* dan inulin memberikan efek lebih baik terhadap penurunan kadar MDA serum pasien dengan diabetes melitus tipe 2 jika dibandingkan dengan kelompok intervensi probiotik dan kelompok kontrol. Konsumsi roti sinbiotik ini diberikan selama 8 minggu pada 77 pasien DM tipe 2 dengan metode *randomized control trial with double blind* dengan $P=0,001$ (Bahmani *et al.*, 2015).

Selain itu, pemberian makanan sinbiotik yang mengandung probiotik berupa *L. sporogenes* dan prebiotik berupa inulin selama 6 minggu terbukti dapat menurunkan kadar trigliserida dan meningkatkan kadar HDL-C serta total antioksidan GSH pada pasien DM tipe 2 dibandingkan dengan kelompok kontrol (Mahboobi, 2018). Pada penelitian lainnya, pemberian suplemen sinbiotik yang mengandung bakteri probiotik berupa *L. achidophilus*, *L. rhamnosus*, *B. bifidum*, *B. longum*, *E. faecium* dengan penambahan prebiotik berupa frukto-aligosakarida (FOS) pada 77 anak dengan obesitas selama 30 hari, menunjukkan hasil yang signifikan dalam menurunkan kadar kolesterol total, LDL-C, total stress oksidatif dan peningkatan kadar total kapasitas antioksidan (Ipar *et al.*, 2015).

Perbaikan kadar profil lipid, biomarker stress oksidatif dan peningkatan kadar antioksidan, dapat dikaitkan dengan penurunan kadar MDA dan peningkatan aktifitas SOD jaringan hepar setelah pemberian intervensi minuman sinbiotik pada penelitian ini. Perbaikan kadar profil lipid akan mempengaruhi jumlah akumulasi lipid di jaringan hepar. Pemberian sinbiotik telah terbukti dapat menurunkan kadar profil lipid sehingga hal ini akan menyebabkan penurunan akumulasi lemak di hepar. Penurunan akumulasi ini akan berefek terhadap penurunan produksi radikal bebas seperti ROS di jaringan hepar. Ketika jumlah produksi ROS menurun maka kemungkinan kerusakan jaringan hepar juga dapat dicegah dan diperbaiki (Ipar *et al.*, 2015), (Ighodaro and Akinloye, 2017). Hal ini ditandai dengan penurunan kadar MDA dan peningkatan aktifitas SOD pada jaringan hepar setelah pemberian minuman sinbiotik pada kelompok P1, P2 dan P3. Kadar MDA semakin menurun karena ikatan antara ROS dan PUFA jumlahnya juga menurun sehingga efek dari peroksidasi lemak yang memberikan hasil akhir pembentukan MDA dapat dihambat. Disisi lain, penurunan jumlah ROS juga berefek baik terhadap aktifitas antioksidan alami di dalam tubuh salah satu diantaranya adalah SOD karena tidak banyak SOD yang terpakai untuk mengendalikan radikal bebas yang ada di jaringan sehingga akan berefek terhadap peningkatan aktifitas SOD di jaringan tersebut (Ighodaro and Akinloye, 2017).

Mekanisme penurunan LDL, kolesterol total, dan trigliserida serta peningkatan HDL pada pemberian sinbiotik masih belum dapat dijelaskan dengan pasti. Namun, beberapa penelitian menyebutkan bahwa mekanisme tersebut berasal dari 2 komponen utama pada

sinbiotik yakni probiotik dan prebiotik (Anandharaj, Sivasankari and Rani, 2014). Probiotik dan prebiotik memiliki peran tersendiri dalam memperbaiki keadaan profil lipid di dalam tubuh. Peran probiotik salah satu diantaranya berasal dari jalur mekanisme *bile salt hydrosilase* (BSH). Probiotik memiliki kemampuan dalam mengekskresikan enzim BSH yang berperan dalam menghidrolisis asam empedu sehingga lemak yang masuk ke dalam tubuh tidak dapat diserap. Disisi lain, penurunan kadar kolesterol juga berasal dari mekanisme asimilasi. Mekanisme ini menyebabkan kolesterol yang ada di usus diserap oleh membran sel dari bakteri probiotik sehingga dapat berefek terhadap penurunan kadar kolesterol yang akan diserap oleh tubuh (Roselino *et al.*, 2012). Hal ini sejalan dengan penelitian yang membuktikan pemberian intervensi *L. achidopilus* meningkatkan *faecal excretion* dari asam empedu dengan memeriksa kadar *cholic acid* dan *deoxycholic acid* pada kelompok intervensi jika dibandingkan dengan kelompok tikus yang hanya diinduksi diet tinggi lemak (Shrivastava, Chaturvedi and Bhatia, 2013).

Selain itu, berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pemberian probitoik selama 30 hari terbukti dapat meningkatkan aktifitas LCAT (*plasma lechitin: cholesterol acyltransferase*) dan PHLA (*post heparin lipolytic activity*) pada tikus hewan coba model hiperlipidemia dengan $p < 0,0001$ jika dibandingkan dengan kelompok tikus diet tinggi lemak. Peningkatan aktifitas LCAT berperan terhadap perubahan *free cholesterol* menjadi *cholesteryl ester* yang menjadi salah satu bahan pembentukan HDL baru di dalam tubuh sehingga jumlahnya akan semakin meningkat. Sedangkan peningkatan aktifitas PHLA menyebabkan penurunan kadar trigliserida, VLDL dan LDL karena peningkatan aktifitas lipolitik di hepar (Shrivastava, Chaturvedi and Bhatia, 2013).

Selain komponen probiotik, prebiotik juga merupakan komponen penting pada minuman sinbiotik. Prebiotik terbukti dapat meningkatkan aktifitas, pertumbuhan dan perkembangan probiotik yang ada di dalam usus sehingga bakteri probiotik dapat bekerja lebih maksimal di dalam tubuh (Miremadi and Shah, 2012). Prebiotik berperan sebagai sumber makanan dan pertumbuhan bagi bakteri probiotik. Disisi lain, peran prebiotik yang penting bagi metabolisme lemak di dalam tubuh juga tidak akan bekerja dengan maksimal ketika tidak dibantu oleh proses fermentasi yang dilakukan oleh bakteri probiotik. Sehingga, prebiotik dan probiotik di dalam tubuh memiliki efek yang saling menguntungkan satu dengan yang lain (Pandey, Naik and Vakil, 2015). Hal ini dibuktikan dengan penelitian pemberian roti sinbiotik yang mengandung probiotik *L. sporogenes* dan prebiotik berupa inulin dapat memperbaiki kadar profil lipid pasien DM tipe 2 jauh lebih baik jika dibandingkan dengan kelompok yang hanya diintervensi dengan probiotik

(Bahmani *et al.*, 2015). Hal ini juga mendukung hasil penelitian ini yang membuktikan bahwa kelompok intervensi sinbiotik P3 (65% pro dan 35% pre) yang mengandung lebih banyak prebiotik memberikan efek penurunan MDA dan peningkatan aktifitas SOD jauh lebih baik jika dibandingkan dengan kelompok intervensi P1 dan P3.

Kandungan prebiotik dalam minuman sinbiotik ini adalah inulin yang berasal dari sari bengkuang. Inulin adalah salah satu jenis prebiotik yang memiliki produk akhir berupa SCFA (*Short Chain Fatty Acid*). *Short Chain Fatty Acid* merupakan produk akhir dari proses fermentasi karbohidrat yang tidak dapat dicerna di saluran usus. Inulin dalam bentuk SCFA tidak akan memberikan efek yang baik dalam perbaikan kadar profil lipid di dalam tubuh ketika tidak terjadi proses fermentasi yang berasal dari bakteri probiotik (Morrison and Preston, 2016), (Abed, Ali and Noman, 2016).

Short Chain Fatty Acid memiliki 3 bentuk utama yakni asetat, butirrat, dan propionat. Ketiga bentuk SCFA ini memiliki peran yang sangat penting bagi metabolisme tubuh, salah satu diantaranya adalah pada metabolisme lemak. Setelah dicerna dan terfermentasikan, inulin yang berubah menjadi SCFA akan dicerna dan masuk ke dalam tubuh melalui jalur vena porta hepar. Masing-masing dari jenis SCFA memiliki peran penting terhadap metabolisme lemak diantaranya adalah asetat berperan dalam menurunkan lipolisis adiposit dan adipogenesis. Efek ini akan menyebabkan penurunan kadar asam lemak bebas dari sel adiposit yang menuju ke hepar sehingga proses *de novo lipogenesis* dapat dihambat (Morrison and Preston, 2016). Selain itu, SCFA jenis asetat juga dinilai dapat menghambat enzim lipogenik di hepar yakni *glycerol-3-phosphate acyltransferase*. Enzim ini di dalam hepar berperan terutama dalam sintesis *de novo* lipid di dalam tubuh. Hal ini dibuktikan dengan penelitian penambahan kandungan inulin pada diet makanan tikus yang diberi makanan lemak jenuh secara signifikan dapat mengurangi kadar trigliserida darah dan hepar tikus (Miremadi and Shah, 2012).

Selain itu, SCFA jenis propionat juga memiliki peran yang penting terhadap metabolisme lemak di dalam tubuh. propionat dapat menghambat *insulin stimulated lipid accumulation* di sel adiposit melalui ikatannya dengan *FFAR 2 signaling* dan juga berperan sebagai *HMG-CoA reductase inhibitor*. Dua peran tersebut berefek terhadap penurunan akumulasi lemak di hepar dan penurunan produksi kolesterol di hepar (Morrison and Preston, 2016), (Abed, Ali and Noman, 2016). Sedangkan SCFA jenis butirrat memiliki peran khusus di hepar yakni menurunkan dan menghambat pengeluaran mediator inflamasi seperti TNF-a dan interleukin dengan cara menghambat *nuclear*

factor kappa-B (NF-kB) sehingga dapat berefek terhadap perbaikan keadaan inflamasi yang terjadi di hepar (Morrison and Preston, 2016).

Keseluruhan efek yang berasal dari kombinasi prebiotik dan probiotik menjadi minuman sinbiotik akan berujung pada perbaikan kadar profil lipid, biomarker stress oksidatif dan peningkatan kadar antioksidan endogen di jaringan hepar. Ketika keadaan tersebut dapat diperbaiki, maka kerusakan jaringan hepar akibat penumpukan lemak dan stress oksidatif juga dapat dihambat sehingga faktor risiko penyebab penyakit hepar seperti *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD), *chronic cholestatic liver disease*, *alcoholic steatohepatitis* (NASH), sirosis hepar dan beberapa penyakit hepar lainnya dapat dihambat (Cohen and Fisher, 2013), (Noeman, Hamooda and Baalash, 2011).

