

**EFEK KURKUMIN DAN *FISH OIL* TERHADAP RESISTENSI INSULIN
PADA MENCIT OBES :
KAJIAN TERHADAP PENGATURAN EKSPRESI GEN DAN KADAR
TUMOR NECROSIS FACTOR α**

***THE EFFECT OF CURCUMIN AND FISH OIL ON INSULIN RESISTANCE
IN OBESE MICE : THE STUDY OF THE REGULATION OF
GENE EXPRESSION AND THE LEVEL OF
TUMOR NECROSIS FACTOR α***

**MARNIAR
P1507209129**



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**EFEK KURKUMIN DAN FISH OIL TERHADAP RESISTENSI INSULIN
PADA MENCIT OBES : KAJIAN TERHADAP PENGATURAN EKSPRESI
GEN DAN KADAR TUMOR NECROSIS FACTOR α**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

MARNIAR

Kepada

PROGRAM PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2013

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Marniar

Nomor Mahasiswa : P1507209129

Program Studi : Biomedik

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 18 Februari 2013

Yang menyatakan,

Marniar

PRAKATA

Puji dan syukur kehadiran Allah SWT yang senantiasa mencurahkan rahmat dan hidayahNya, sehingga kami dapat melaksanakan dan menyelesaikan proses penelitian dan penulisan tesis dengan judul Efek kurkumin dan fish oil terhadap resistensi insulin pada mencit obes : kajian terhadap pengaturan ekspresi gen dan kadar tumor necrosis factor α .

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa penulisan tesis ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga diharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun sebagai bahan pertimbangan dalam perbaikan dan penyempurnaan penulisan tesis di masa mendatang.

Terwujudnya penelitian ini tidak lepas dari bantuan dan dorongan serta doa berbagai pihak. Kami menyampaikan terima kasih kepada semua pihak, teristimewa kepada :

1. Dr. Agussalim Bukhari, MCN, PhD, SpGK, sebagai pembimbing utama yang memberi banyak bimbingan, arahan dan motivasi serta mambantu kami di laboratorimu dari awal hingga selesainya penelitian ini.
2. Prof. Dr. dr. Nurpudji A.Taslim, mph, SpGK, sebagai pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan arahan selama penelitian ini.
3. Prof. Dr. dr. R. Satriono, MSc., SpA(K), SpGK, sebagai pembimbing III yang telah memberikan bimbingan dan masukan demi sempurnanya penelitian ini.

4. Prof. Dr. dr. Suryani As'ad, MSc, SpGK sebagai penguji yang telah memberi saran.
5. DR. dr. A. Makbul Aman, SpPD-KEMD sebagai penguji yang juga telah memberi saran
6. Penyelenggara Pimpinan Fakultas Kedokteran UNHAS atas segala bantuan sehingga penelitian ini dapat terlaksana.
7. Ibu dan ayahku tercinta yang senantiasa mengiringi langkahku dengan doa.
8. Suami dan anak-anakku tercinta yang senantiasa menjadi motivasi dan penyemangat hidupku.
9. Adikku tersayang yang senantiasa memberi dukungan.
10. Tema-teman PPDS Gizi Klinik.
11. Staf laboratorium hewan dan laborstorium penelitian FK UNHAS.
12. Semua pihak yang tidak sempat disebutkan satu per satu.

Akhirnya kami berharap dan berdoa kepada Allah SWT semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi masyarakat dan akademisi khususnya tema-teman sejawat dan mahasiswa FK UNHAS.

Makassar, 18 Februari 2013

Marniar

Abstrak

Efek kurkumin atau *fish oil* telah terbukti dapat mencegah perkembangan resistensi insulin dan menurunkan TNF α . Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian kurkumin dan *fish oil* terhadap resistensi insulin melalui pengaturan ekspresi gen dan kadar TNF α . Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hewan dan Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Metode penelitian yang digunakan adalah uji klinis dengan menggunakan sampel mencit C57BL/6J. Penelitian ini dilakukan terhadap enam kelompok mencit yang diberi diet normal (ND) atau diet tinggi lemak (HFD) selama 12 minggu. Mencit ini kemudian diberi diet (1) diet normal sebagai kontrol normal, (2) diet tinggi lemak sebagai kontrol negatif, (3) diet tinggi lemak + *fish oil* 3 g/100 g diet (HFD-FO), (4) diet tinggi lemak + kurkumin 3 g/kg diet (HFD-CUR), (5) diet tinggi lemak + *fish oil* 3 g/100 g diet + kurkumin 3 g/kg diet (HFD-FO-CUR, dan (6) diet tinggi lemak + metformin 3 g/kg diet (HFD-MET) sebagai kontrol positif selama 8 minggu. Mencit kelompok HFD mempunyai berat badan yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan mencit kelompok ND ($p < 0.01$). Pada pemeriksaan tes toleransi glukosa (TTG) dan tes toleransi insulin (TTI), peningkatan kadar gula darah pada semua kelompok HFD lebih tinggi bermakna dibanding ND. Mencit kelompok HFD-FO-CUR menunjukkan kadar glukosa darah yang lebih rendah setelah menit ke-60 pada TTG dan TTI dan cenderung menurun sampai akhir pemeriksaan jika dibandingkan dengan HFD-MET dan ND. Dibanding dengan kelompok HFD-MET, ekspresi gen TNF α di jaringan lemak epididimis lebih rendah, sedangkan kadar TNF α hampir sama pada kedua kelompok. Dari penelitian ini disimpulkan bahwa mencit kelompok HFD-FO-CUR menunjukkan perbaikan resistensi insulin melalui penurunan ekspresi gen dan kadar TNF α .

Kata kunci : kurkumin, *fish oil*, resistensi insulin, TNF α

Abstract

The effect of curcumin or fish oil have been found to protect against the development of insulin resistance and to decrease TNF α . This study aims investigate the effect of curcumin and fish oil on insulin resistance through the regulation of gene expression and the level of TNF α . The study was conducted in Animal Laboratory and Research Laboratory of the Faculty of Medicine, Hasanuddin University. The method used was clinical trials to C57BL/6J mice samples divided into six groups. One group was given Normal diet (ND) and others a High fat diet (HFD) for 12 weeks. The mice were then treated for eight weeks : (1) one group was given a normal diet as a control group; (2) one group was given HFD as negative control group; (3) one other HFD + fish oil 3 g/100 g (HFD-FO); (4) another group HFD + curcumin 3 g/kg diet (HFD-CUR); (5) another HFD + fish oil 3 g/100 g + curcumin 3 g/kg diet (HFD-FO+CUR), and (6) HFD with Metformin 3 g/kg diet (HFD-MET) as positive control group. The study shows the HFD groups of mice have significantly higher body weight compared to ones in ND group ($p < 0.01$). Glucose and Insulin tolerance test (GTT, ITT) reveal that all HFD groups have higher blood glucose than the ND group does the mice with HFD-FO+CUR have significant lower blood glucose level on min 60 of GTT and ITT and a lower trend of blood glucose level at all other times point as compared to both HFD-MET and ND. Compared to HFD-MET mice, gene expression of TNF α in epydidimal fat is lower in HFD-FO+CUR group, while the level of TNF- α was similar in both groups. In conclusion, HFD-FO+CUR mice have improved in insulin resistance indicated by the decrease of gene expression and the lowering level of TNF- α .

Keywords : curcumin, *fish oil*, insulin resistance, TNF α

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
DAFTAR SINGKATAN	x
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	5
D. Hipotesis	5
E. Manfaat Penelitian	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	7
A. <i>Tumor Necrosis Factor α</i>	7
B. Obesitas	10
C. Resistensi Insulin	12
D. TNF α , Obesitas, dan Resistensi Insulin	14

E. Efek Kurkumin terhadap Resistensi Insulin dan TNF α pada Obesitas	25
F. Efek <i>Fish Oil</i> terhadap Resistensi Insulin dan TNF α pada Obesitas	32
III. KERANGKA PENELITIAN	41
A. Kerangka Teori	41
B. Kerangka Konsep	42
IV. METODE PENELITIAN	43
A. Desain Penelitian	43
B. Tempat Penelitian	43
C. Populasi dan Sampel	43
D. Prosedur Penelitian	44
E. Identifikasi Variabel	47
F. Definisi Operasional	48
G. Rencana Manajemen dan Analisis Data	51
H. Izin Penelitian dan Kelaikan Etik	51
I. Alur Penelitian	52
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	53
A. Hasil	53
B. Pembahasan	64
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	75
A. Kesimpulan	75
B. Saran	75
DAFTAR PUSTAKA	77

DAFTAR TABEL

nomor		halaman
1.	Komposisi asam lemak DHA dan EPA	33
2.	Komposisi diet	48
3.	Berat badan awal mencit dan setelah diet tinggi lemak	54
4.	Pemeriksaan tes toleransi glukosa	55
5.	Pemeriksaan tes toleransi insulin	58
6.	Ekspresi gen TNF α pada pemeriksaan RT-PCR	61
7.	Kadar TNF α pada pemeriksaan ELISA	61

DAFTAR GAMBAR

nomor	halaman
1. Obesitas memicu penyakit degeneratif	12
2. Jaringan lemak mensekresi berbagai peptida bioaktif	16
3. Patogenesis obesitas	23
4. Penggunaan kurkumin sebagai obat berbagai penyakit	26
5. Target molekul kurkumin	27
6. Mekanisme kurkumin menghambat inflamasi	31
7. Mekanisme pengaruh suplai asam lemak terhadap sel inflamasi	fungsi 34
8. Mekanisme klasik efek anti inflamasi asam lemak omega 3	36
9. Mekanisme efek anti inflamasi <i>fish oil</i>	38
10. Kerangka teori	41
11. Kerangka konsep	42
12. Alur penelitian	52
13. Perubahan berat badan mencit	54
14. Kadar glukosa darah puasa masing-masing kelompok	56
15. Kadar glukosa darah puasa setelah penyuntikan insulin	59
16. Ekspresi TNF α lemak intraabdomen (epididimis)	62
17. Kadar TNF α serum	63

DAFTAR LAMPIRAN

nomor		halaman
1.	Komposisi diet normal	84
2.	Komposisi diet tinggi lemak	85
3.	Komposisi diet tinggi lemak+ menhaden fish oil	86
4.	Rekomendasi persetujuan etik	87
5.	Tabel konversi dosis manusia dan hewan	88

DAFTAR SINGKATAN

Singkatan	Arti dan keterangan
5-LOX	<i>5-lipoxygenase</i>
AP1	<i>Activator Protein 1</i>
ATM	<i>Adipose Tissue Macrophages</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i>
CRP	<i>C-reactive protein</i>
DEXA	<i>Dual Energy X-ray Absorptiometry</i>
DHA	<i>Docosahexaenoic Acid, asam dokosaheksanoat</i>
DM	Diabetes Melitus
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPA	<i>Eicosapentaenoic Acid, asam eikosapentanoat</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FFA	<i>Free Fatty Acid</i>
GLUT4	<i>Glucose transporter 4</i>
GSK 3 β	<i>Glycogen Synthase 3β</i>
IL	Interleukin
IMT	Indeks Massa Tubuh
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
IOTF	<i>International Obesity Taskforce</i>
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>

IRT	<i>Insulin Receptor Tyrosine</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LT	<i>lymphotoxin</i>
LTB4	<i>Leukotriene B4</i>
LTE4	<i>Leukotriene E4</i>
M1	<i>Macrophage 1</i>
M2	<i>Macrophage 2</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor kappa Beta</i>
PG	<i>prostaglandin</i>
PGE2	<i>Prostaglandin E2</i>
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors</i>
PTB	<i>Protein Tyrosine Phosphatase</i>
PUFA	<i>Poli Unsaturated Fatty Acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
SOCS3	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 3</i>
TEF	<i>Thermic Effect of Food</i>
TG	<i>Triglyceride</i>
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TNFR	<i>Tumor Necrosis Factor α Receptors, Reseptor TNF α</i>
TTG	<i>Tes Toleransi Glukosa</i>

TTI	Tes Toleransi Insulin
WAT	<i>White Adipose Tissue</i> , jaringan lemak putih
WHO	<i>World Health Organization</i> , Organisasi Kesehatan Sedunia

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Obesitas didefinisikan sebagai suatu keadaan yang ditandai dengan penimbunan jaringan lemak yang melebihi keperluan untuk fungsi tubuh yang normal. Obesitas telah menjadi pandemi global di seluruh dunia dan dinyatakan oleh *World Health Organization* (WHO) sebagai masalah kesehatan kronis terbesar pada orang dewasa (Soegih R, 2009).

Angka kejadian obesitas di berbagai negara terus meningkat. Prevalensi obesitas di Inggris pada tahun 1980 hanya 7%, lalu meningkat menjadi 23% pada tahun 2005. Pada tahun 1999, 61% penduduk Amerika menderita *overweight* (27% diantaranya obes), kemudian pada tahun 2007 meningkat menjadi 66% (32% diantaranya obes) (Soegih R, 2009).

Di Indonesia sendiri berdasarkan data Riskesdas tahun 2010 menunjukkan bahwa jika digunakan status gizi menurut BB/TB, maka prevalensi gizi lebih pada balita adalah sebesar 14,0%. Sedangkan persentase obesitas penduduk dewasa (>18 tahun) menurut kategori Indeks Massa Tubuh (IMT) adalah 7,8 pada laki-laki dan 15,5 pada perempuan (Balitbangkes, 2010).

Penyebab obesitas sangat kompleks dan multifaktorial meliputi faktor metabolik, hormonal, genetik dan psikososial. Faktor utama yang

berperan terhadap peningkatan berat badan yang berlebihan adalah ketidakseimbangan asupan dan pemakaian energi (Nur Aslan, 2010).

Obesitas berkaitan dengan berbagai komplikasi baik metabolik, endokrinologik, kardiovaskuler, bahkan diduga berkaitan dengan keganasan. Semua ini menurunkan angka harapan hidup. Perkembangan komplikasi metabolik misalnya peningkatan risiko diabetes tipe 2, dislipidemia dan penyakit kardiovaskuler (Nur Aslan, 2010).

Pada obesitas terjadi inflamasi kronik sistemik dengan peningkatan sitokin pro inflamasi dalam sirkulasi. Inflamasi sistemik terjadi karena respons inflamasi dalam jaringan adiposa yang meluas dengan cepat. Sel adiposit memproduksi sitokin-sitokin. Selain itu infiltrasi makrofag ke jaringan adiposa berkontribusi meningkatkan produksi sitokin. Peningkatan *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α) dalam jaringan adiposa adalah sitokin yang pertama kali diteliti pada mencit obes oleh Hotamisligil dkk pada tahun 1993.

Obesitas terkait dengan terjadinya resistensi insulin dan diabetes. Inflamasi dianggap berperan penting dalam patogenesis resistensi insulin pada orang obes. Hal ini telah diteliti pada beberapa penelitian eksperimental. Individu obes dengan resistensi insulin menunjukkan peningkatan kadar TNF α yang mungkin mempunyai hubungan sebab akibat (Farmer JA, 2008).

Oleh karena hubungan antara inflamasi dengan obesitas dan resistensi insulin ini maka mengendalikan respons inflamasi bermanfaat

mencegah dan memperbaiki efek patologis dari obesitas (Ye J, 2010 ; Hotamisligil GS, 1995).

Kurkumin adalah [senyawa](#) aktif yang ditemukan pada [kunyit](#). Zat ini adalah [polifenol](#) dengan rumus kimia $C_{21}H_{20}O_6$. Kunyit (*Curcuma longa*) termasuk salah satu tanaman rempah dan obat, habitat asli tanaman ini meliputi wilayah Asia khususnya Asia Tenggara. Penelitian tentang efek terapi kurkumin telah banyak dilakukan. Saat ini penelitian lebih difokuskan pada mekanisme efek molekulernya. Penelitian yang dilakukan oleh Weisberg dkk (2008) menunjukkan bahwa kurkumin terbukti memperbaiki inflamasi terkait obesitas dan diabetes (Weisberg SP, 2008).

Fish oil berasal dari jaringan *oily fish*. *Fish oil* mengandung asam lemak omega 3 asam eikosapentanoat (*eicosapentaenoic acid*, EPA) dan asam dokosaheksanoat (*docosahexaenoic acid*, DHA) yang merupakan prekursor eikosanoid yang penting untuk mengurangi inflamasi. Penelitian yang dilakukan oleh Muurling M dkk yang dipublikasikan pada tahun 2003 menunjukkan bahwa mencit obes yang diberi diet *fish oil* mengalami penurunan kadar TNF α (Muurling M, 2003).

Berdasarkan uraian di atas, maka kami menganggap penting untuk meneliti tentang efek pemberian kurkumin dan *fish oil* terhadap perbaikan resistensi insulin pada obesitas dengan menilai kadar dan ekspresi TNF α . Efek ini akan dibandingkan dengan kelompok yang mendapatkan diet tinggi lemak. Sebagai kontrol positif digunakan obat diabetes golongan metformin yang merupakan salah satu obat unggulan untuk meningkatkan sensitivitas

insulin. Jika hal ini terbukti maka kelak kurkumin dan *fish oil* dapat direkomendasikan sebagai suplementasi bagi penderita obesitas.

Penelitian ini dilakukan pada mencit dengan pertimbangan bahwa pada penelitian hewan perbedaan faktor genetik dapat dikendalikan dan pengaruh rancu dari lingkungan dapat diminimalkan serta penggunaan jaringan tubuh lebih memungkinkan, sehingga patomekanisme penyakit dapat ditelusuri lebih baik dibandingkan dengan penelitian pada manusia.

Sepanjang pengetahuan kami penelitian tentang efek gabungan keduanya terhadap perbaikan resistensi insulin berdasarkan mekanisme pengaturan TNF α dengan metformin sebagai kontrol positif belum pernah dilakukan.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka yang menjadi pertanyaan dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah pemberian kombinasi kurkumin dan *fish oil* memperbaiki resistensi insulin pada mencit obes ?
2. Apakah pemberian kombinasi kurkumin dan *fish oil* dapat menurunkan ekspresi gen TNF α pada mencit obes ?
3. Apakah pemberian kombinasi kurkumin dan *fish oil* dapat menurunkan kadar TNF α pada mencit obes ?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan umum

Mengetahui efek pemberian kurkumin dan *fish oil* serta kombinasi keduanya dalam memperbaiki resistensi insulin pada mencit dengan obesitas melalui penurunan ekspresi gen dan kadar TNF α mencit obes.

2. Tujuan khusus

- a. Mengukur dan membandingkan resistensi insulin melalui Tes Toleransi Glukosa dan Insulin (TTG & TTI) pada mencit kontrol dan perlakuan sesudah intervensi selama 8 minggu.
- b. Memeriksa dan membandingkan ekspresi gen TNF α pada mencit kontrol dan perlakuan sesudah intervensi selama 8 minggu.
- c. Memeriksa dan membandingkan kadar TNF α pada mencit kontrol dan perlakuan sesudah intervensi selama 8 minggu.

D. Hipotesis

1. Pemberian kombinasi kurkumin dan *fish oil* dapat memperbaiki resistensi insulin dibandingkan dengan diet tinggi lemak.
2. Pemberian kombinasi kurkumin dan *fish oil* menurunkan ekspresi gen TNF α dibandingkan dengan diet tinggi lemak.
3. Pemberian kombinasi kurkumin dan *fish oil* menurunkan kadar TNF α dibandingkan dengan diet tinggi lemak.

E. Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai manfaat suplementasi kurkumin dan *fish oil* dalam memperbaiki resistensi insulin melalui penurunan ekspresi gen dan kadar TNF α .
2. Dapat menjadi bahan pertimbangan industri masyarakat untuk lebih mengembangkan pemanfaatan kurkuma dan *fish oil* karena bermanfaat bagi penderita obesitas.
3. Dapat dijadikan sebagai dasar untuk penelitian selanjutnya baik untuk menggali informasi mengenai mekanisme molekuler yang lain maupun penelitian pada manusia yang berhubungan dengan obesitas serta penyakit lainnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tumor Necrosis Factor α

Teori tentang suatu respons anti tumor dari sistem imun *in vivo* telah disebutkan oleh William B. Coley. Pada tahun 1968, Dr. Gale A Granger dari Universitas California, Irvine, melaporkan suatu faktor sitotoksik yang diproduksi oleh limfosit dan diberi nama limfotoksin (LT). Hal yang sama juga dilaporkan oleh Dr. Nancy H. Ruddle dari Universitas Yale. Kemudian pada tahun 1975 Dr. Lloyd J. Old dari *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*, New York, melaporkan tentang suatu faktor sitotoksik lain yang diproduksi oleh makrofag dan disebut sebagai *Tumor Necrosis Factor* (TNF).

Pada tahun 1985, Old dkk mengidentifikasi suatu protein dari serum kelinci yang sudah diberi endotoksin dan protein tersebut sangat responsif terhadap nekrosis hemoragik pada tumor. Protein tersebut dinamakan TNF α . Pada waktu yang bersamaan, kelompok peneliti lain yang dikepalai oleh Anthony Cerami mengidentifikasi suatu protein yang responsif terhadap perkembangan karsinoma yang mereka namakan *cachectin*. Pada tahun 1982, Kawakami dkk mengemukakan suatu zat yang disekresi oleh makrofag yang diinduksi oleh endotoksin yang menghambat sintesis lipoprotein lipase jaringan adiposa. Secara umum, zat tersebut tampaknya

menekan proses anabolik dan menstimulasi proses katabolik. Hal ini mendorong peneliti menamakan zat tersebut sebagai "*cachectin*" yang menunjukkan peran zat tersebut dalam proses kakheksia pada penyakit-penyakit kronik. Berdasarkan beberapa perbandingan, TNF α dan *cachectin* dinyatakan identik. Sejak penemuan tersebut, TNF α kemudian dibuktikan lebih dari sekedar suatu "*tumor necrosis factor*", namun juga terlibat dalam respons imun dan inflamasi, disintesis dan disekresi oleh jaringan adiposa, dan berperan sebagai mediator resistensi insulin pada diabetes mellitus (Qi C, 2000).

Terdapat 2 reseptor TNF α yang sudah diidentifikasi yaitu TNFR1 dan TNFR2. Sebagian besar aktivitas biologik TNF α seperti apoptosis, aktivitas antivirus, dan pengaktifan faktor transkripsi NF- κ B, telah dibuktikan dimediasi oleh TNFR1 (Qi C, 2000).

Meskipun sebagian besar disintesis dan disekresi oleh sel fagosit, TNF α juga dibuat di dalam adiposit baik pada mencit maupun pada manusia. Dalam jaringan adiposa tikus dengan obesitas dan resistensi insulin genetik, terjadi peningkatan kadar zat tersebut yang mendukung adanya keterkaitan antara obesitas, diabetes dan TNF α . Pada tahun 1993, keterkaitan langsung antara TNF α dan resistensi insulin terkait obesitas telah ditetapkan pada suatu penelitian dengan menetralkan TNF α pada beberapa tikus model obesitas dan resistensi insulin yang menunjukkan perbaikan sensitivitas insulin dan sinyal reseptor insulin. Terdapat

hubungan langsung antara derajat adipositas, peningkatan produksi TNF α dan resistensi insulin (Qi C, 2000).

Tumor Necrosis Factor α merupakan sitokin yang terutama diproduksi oleh makrofag sebagai respons terhadap endotoksemia, inflamasi dan kanker. Sel lemak manusia merupakan sumber produksi TNF α yang signifikan. Kadar TNF α meningkat pada beberapa kondisi klinis seperti penyakit vaskular dan gagal jantung kongestif. TNF α disintesis secara langsung oleh adiposit dan tampaknya berperan untuk pemeliharaan metabolisme dan massa jaringan adiposa. Sintesis TNF α di dalam jaringan adiposa juga dimungkinkan oleh efek autokrin dan parakrin yang mungkin dipengaruhi jumlah dan ukuran adiposit. *Tumor Necrosis Factor α* berkaitan dengan peningkatan apoptosis *stem cell* yang potensial untuk berkembang menjadi adiposit yang matang dan berdiferensiasi sempurna (Markiewicz BZ, 2000 ; Farmer, 2008).

Tumor Necrosis Factor α juga penting dalam metabolisme asam lemak dan kandungan lemak sel adiposit melalui efek langsung terhadap aktivitas lipoprotein lipase yang mempengaruhi keberadaan substrat untuk sintesis trigliserida. Aktivitas enzimatik intrinsik lipoprotein lipase dapat berkurang secara signifikan oleh TNF α yang juga menurunkan metabolisme trigliserida yang kaya akan lipoprotein. Gangguan degradasi trigliserida yang kaya akan lipoprotein menurunkan aliran asam lemak bebas ke dalam sel adiposit yang berpengaruh terhadap konsentrasi lemak intraseluler. Disamping itu, TNF α berkaitan langsung dengan penurunan

asill Co-A sintetase yang juga berkontribusi terhadap derajat sintesis trigliserida dan akumulasi lemak dalam sel adiposit (Farmer, 2008).

Peranan TNF α dalam manifestasi inflamasi pada obesitas sangat kompleks. Sintesis lokal TNF α dalam sel adiposit orang obes meningkat dan penurunan berat badan telah terbukti menurunkan kadarnya dalam sirkulasi. Beberapa penelitian juga telah membuktikan bahwa peningkatan kadar TNF α sirkulasi hanya terjadi pada peningkatan berat badan yang ekstrim (Farmer, 2008).

Obesitas dan peningkatan Indeks Massa Tubuh (IMT) sering berhubungan dengan terjadinya resistensi insulin dan diabetes. Inflamasi dianggap berperan penting dalam patogenesis resistensi insulin pada orang obes. Hal ini telah diteliti pada beberapa penelitian eksperimental. Subjek obes dengan resistensi insulin menunjukkan peningkatan kadar TNF α yang mungkin mempunyai hubungan sebab akibat (Farmer, 2008).

B. Obesitas

Secara sederhana *World Health Organization (WHO)* (2000) mendefinisikan obesitas sebagai kondisi abnormal atas akumulasi lemak yang ekstrim pada jaringan adiposa. Kelebihan berat badan sebagai akibat dari penimbunan lemak tubuh yang berlebihan ini penyebabnya multifaktorial meliputi faktor metabolik, hormonal, genetik dan psikososial. Terjadinya obesitas secara umum berkaitan dengan keseimbangan energi di dalam tubuh. Keseimbangan energi ditentukan oleh jumlah dan

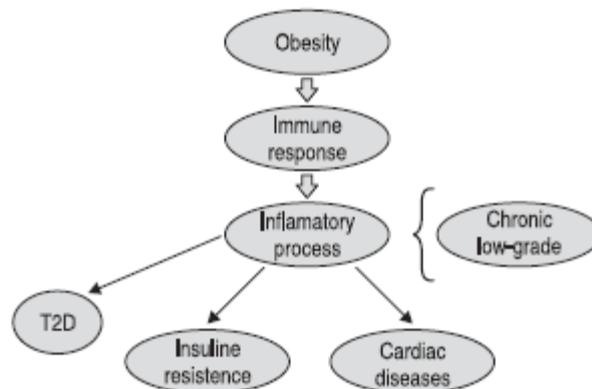
komposisi karbohidrat, lemak dan protein serta kebutuhan energi yang ditentukan oleh kebutuhan energi basal, aktivitas fisik dan *thermic effect of food* (TEF) yaitu energi yang diperlukan untuk mengolah zat gizi menjadi energi. Keseimbangan energi di dalam tubuh dipengaruhi oleh berbagai faktor baik yang berasal dari dalam tubuh yaitu regulasi fisiologis dan metabolisme ataupun dari luar tubuh yang berkaitan dengan gaya hidup (lingkungan) yang akan mempengaruhi kebiasaan makan dan aktivitas fisik. Regulasi fisiologis dan metabolisme dipengaruhi oleh genetik dan juga oleh lingkungan. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa obesitas dipengaruhi 70% oleh lingkungan dan 30% oleh genetik (Sugih, 2009).

Obesitas terkait dengan terjadinya resistensi insulin dan diabetes. Inflamasi dianggap berperan penting dalam patogenesis resistensi insulin pada orang obes. Hal ini telah diteliti pada beberapa penelitian eksperimental. Individu obes dengan resistensi insulin menunjukkan peningkatan kadar *TNF α* yang mungkin mempunyai hubungan sebab akibat (Farmer JA, 2008).

Obesitas juga berhubungan dengan berbagai komplikasi baik metabolik, endokrinologik, kardiovaskuler, bahkan diduga berkaitan dengan keganasan. Semua ini menurunkan angka harapan hidup (Nur Aslan, 2010).

Indeks Massa Tubuh (IMT) pada umumnya digunakan sebagai indikator obesitas, yang menunjukkan berat badan seseorang dalam

kilogram (kg) dibagi dengan tinggi badan dalam meter pangkat dua (m²) (Nishida C, 2004).



Gambar 1. Obesitas memicu penyakit degeneratif (Flores GB, 2010)

Obesitas mempengaruhi respons imun yang menyebabkan proses inflamasi kronik dan *low-grade*, yang kemudian terkait dengan penyakit-penyakit degeneratif seperti diabetes melitus tipe 2, hipertensi, dislipidemia, penyakit jantung dan lain-lain. Inflamasi dianggap berperan penting dalam patogenesis resistensi insulin pada orang dengan obesitas (Flores GB, 2010).

C. Resistensi Insulin

Insulin adalah hormon yang dihasilkan oleh pankreas, yang membantu tubuh menggunakan glukosa sebagai energi. Peran insulin dalam berbagai metabolisme di jaringan target didahului oleh pengikatan insulin pada reseptor spesifik dan pengaktifan tirosin kinase. Reseptor

insulin kinase yang telah aktif ini selanjutnya akan melakukan fosforilasi gugus tirosin pada IRS (*Insulin Receptor Substrate*) dan selanjutnya akan menurunkan aktivitas dari *phosphoinositol-3 kinase* dan menyebabkan translokasi glukosa dari ekstrasel ke intrasel oleh transporter glukosa (GLUT4) (Kasuga M, 2006).

Fungsi normal insulin secara keseluruhan ialah sebagai hormon anabolik, bekerja pada sejumlah jaringan, dan memacu penyimpanan nutrien, atau mencegah katabolismenya. Kadar insulin normalnya meningkat setelah makan seiring dengan kenaikan kadar glukosa, dan menurun pada keadaan setelah makan, ketika metabolit yang tersimpan digunakan untuk energi.

Resistensi insulin adalah suatu kondisi tubuh memproduksi insulin namun tidak dapat menggunakannya dengan optimal. Proses *cross talk* antara jalur sinyal inflamasi dan jalur sinyal insulin menyebabkan resistensi insulin dan disfungsi endotel. Ketika seseorang mengalami resistensi insulin, sel otot, lemak dan sel heparnya tidak memberikan respons yang baik terhadap insulin. Dan hasilnya tubuh mereka membutuhkan insulin yang lebih tinggi untuk membantu glukosa masuk ke dalam sel. Pankreas mencoba mengatasi keadaan ini dengan memproduksi lebih banyak insulin. Selanjutnya, kegagalan pankreas dalam memenuhi kebutuhan tubuh terhadap insulin menyebabkan terjadinya peningkatan glukosa pada peredaran darah, sehingga orang-orang yang mengalami resistensi insulin, pada saat yang sama memiliki level glukosa dan insulin yang tinggi.

Resistensi insulin meningkatkan kemungkinan kejadian diabetes tipe 2 dan penyakit jantung (Cefalu WT, 2001 ; Merentek E, 2006 ; Mohamed MK, 2010).

Resistensi insulin memegang peranan utama dalam patofisiologi diabetes dan terkait erat dengan masalah kesehatan seperti obesitas, dislipidemia dan sindrom metabolik. Sindrom metabolik dianggap sebagai suatu keadaan pro inflamasi karena terkait dengan peningkatan kadar mediator pro inflamasi yang menyebabkan terjadinya penyakit kardiovaskuler aterosklerotik. Oleh karena itu, perbaikan sensitivitas insulin merupakan tujuan terapi yang penting (Mohamed MK, 2010).

D. *Tumor Necrosis Factor α* , Obesitas dan Resistensi Insulin

Jaringan lemak bukanlah suatu depot energi yang pasif. Fungsi utama adiposit adalah untuk menyimpan energi pada saat asupan makan berlebih dan melepaskan energi saat starvasi. Studi terbaru menunjukkan bahwa jaringan adiposa merupakan suatu organ endokrin yang memproduksi beberapa adipokin yang mempunyai aktivitas biologik yang sangat banyak. Meskipun hati turut berperan terhadap terjadinya inflamasi sistemik pada obesitas, namun organ pengontrol utamanya adalah jaringan lemak (Nur Aslan, 2010).

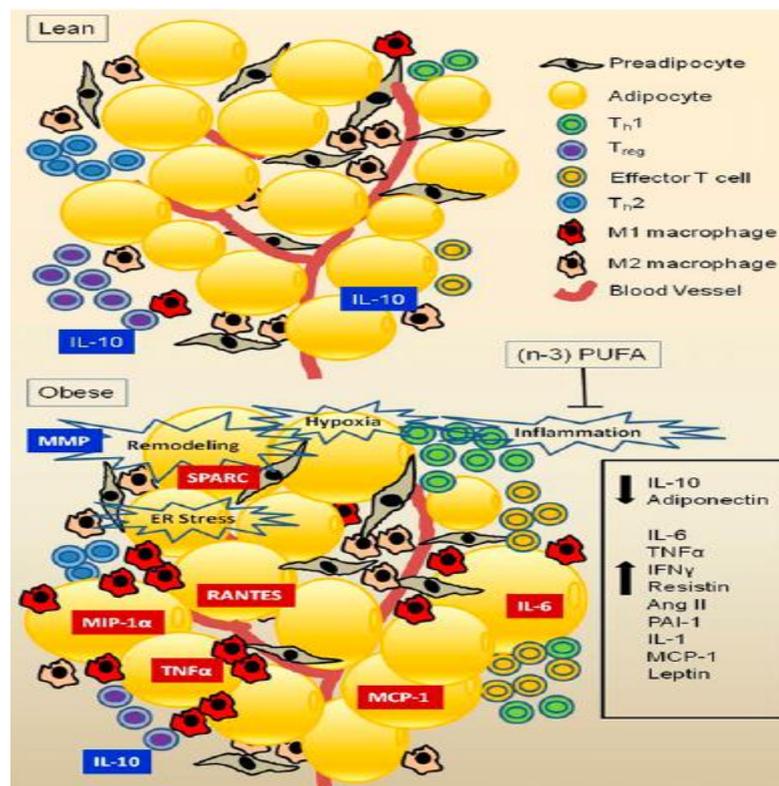
Jaringan lemak putih (WAT) merupakan tempat penyimpanan energi yang berlebihan dalam tubuh. Jaringan lemak putih terdiri atas adiposit, matriks ekstraseluler, jaringan saraf dan vaskuler, dan beberapa sel lain

meliputi preadiposit, fibroblas, sel stem, dan sel imun seperti makrofag dan limfosit T. Jaringan adiposa mensekresi berbagai peptida bioaktif yang secara kolektif disebut adipokin. Contohnya adalah hormon yang terlibat dalam homeostasis glukosa dan energi seperti leptin, adiponektin, resistin, apelin dan visfatin; kemokin seperti *monocyte chemotactic protein* (MCP)-1 dan IL-8; sitokin proinflamasi seperti IL-6, IL-1, angiotensin-II, dan TNF α ; serta sitokin anti inflamasi seperti IL-10. Oleh karena itu, jaringan adiposa merupakan organ endokrin yang dinamis yang berperan penting dalam balans energi, homeostasis glukosa, regulasi tekanan darah dan fungsi imun (Kalupahana NS, 2011).

Berbeda dengan inflamasi yang diinduksi oleh infeksi bakteri atau virus yang mengalami peningkatan granulosit neutrofil dalam sirkulasi, hal ini tidak terjadi pada obesitas. Inflamasi *low-grade* terjadi tanpa demam dan malaise seperti pada inflamasi akibat infeksi bakteri/virus (Ye J, 2010).

Akumulasi trigliserida yang berlebihan dalam adiposit terkait dengan *overload* jaringan adiposa sebagai akibat dari adanya keseimbangan energi positif yang mengakibatkan hipertrofi adiposit dan disregulasi pola sekresi adipokin. Hal ini menyebabkan ketidakseimbangan sekresi adipokin pro dan anti inflamasi. Sehingga obesitas dianggap sebagai suatu inflamasi *low-grade* kronik pada jaringan adiposa. Meskipun adiposit merupakan sumber sitokin pro inflamasi pada obesitas, sel-sel lain seperti preadiposit, makrofag dan stem sel adiposa juga dapat memproduksi sitokin (Kalupahana NS, 2011).

Inflamasi jaringan adiposa pada obesitas ditandai oleh infiltrasi makrofag. Makrofag jaringan adiposa (*Adipose Tissue Macrophages*, ATM) terdiri atas 2 tipe. M1 atau makrofag yang diaktifkan secara klasik distimulasi oleh IFN γ dan LPS serta produksi sitokin proinflamasi seperti TNF α , IL-6, IL-1 dan spesies oksigen reaktif seperti NO. M2 atau makrofag yang dipengaktifkan sebagai alternatif diaktifkan oleh IL-4, IL-13 dan faktor anti inflamasi seperti IL-10, TGF β , antagonis reseptor IL-1, IL-4 dan arginase (Kalupahana NS, 2011).



Gambar 2. Jaringan lemak mensekresi berbagai peptida bioaktif (Kalupahana NS, 2011)

Faktor-faktor tersebut meningkat pada resistensi insulin akibat obesitas dan inflamasi kronik. Hajri dkk membuktikan bahwa ekspresi dan sekresi TNF α dan IL-6 meningkat secara signifikan pada jaringan adiposa subjek obes dan berhubungan negatif dengan kadar adiponektin. Pada kultur adiposit manusia terbukti bahwa insulin mempengaruhi ekspresi dan sekresi adiponektin. Telah diyakini bahwa insulin meningkatkan ekspresi adiponektin dan TNF α berlawanan dengan efek stimulasi insulin. Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar IL-6 dan mRNA TNF α adiposa pada subjek obes dan penurunan pada keadaan kehilangan berat badan. TNF α memfosforilasi S6K1 yang akan merusak resistensi insulin melalui fosforilasi serin IRS-1 yang kemudian akan menghambat aktivitas tirosin kinase pada reseptor insulin di adiposit dan hepatosit. TNF α juga menginduksi *Protein Tyrosine Phosphatase* (PTP)-1B, yang bertindak sebagai regulator negatif sinyal TNF α , dan mencit yang kehilangan PTP-1B terproteksi dari resistensi insulin akibat TNF α . Banyak juga penelitian yang menunjukkan bahwa blokade TNFR1 memproteksi tikus Wistar dari obesitas akibat diet dan resistensi insulin (Shehzad A, 2011).

Obesitas yang terjadi akibat perubahan M2 ke M1 pada populasi ATM ditandai oleh penurunan produksi anti inflamasi IL-10 dan arginase serta peningkatan produksi TNF α . Peningkatan ATM M1 bisa terjadi akibat perubahan fenotip M2 menjadi M1 atau rekrutmen tambahan makrofag M1

dari pembuluh darah. Lipotoksisitas makrofag berperan penting dalam perubahan fenotip M2 menjadi M1 (Kalupahana NS, 2011).

Saat seseorang menjadi obes, sel adipositnya akan membesar dan secara molekuler dan seluler akan mempengaruhi metabolisme sistemik. Asam lemak bebas dan gliserol yang dilepaskan dari adiposit lebih tinggi pada individu obes (Greenberg AS, 2006).

Meskipun pemicu yang tepat timbulnya inflamasi jaringan adiposa sampai sekarang belum diketahui, beberapa mekanisme yang mungkin terlibat telah banyak disebutkan. Pada keadaan keseimbangan energi positif, jaringan adiposa membesar untuk mengakomodasi penyimpanan TG berlebih. *Remodeling* jaringan adiposa melalui degradasi matriks ekstraseluler dan adipogenesis merupakan 2 proses kunci terjadinya proses ini. Matriks metaloproteinase dan *inhibitor* jaringan matriks metaloproteinase memegang peranan penting dalam degradasi matriks ekstraseluler dan *remodeling* jaringan adiposa. Gangguan pada proses ini sebagai akibat disregulasi faktor-faktor diatas akan menyebabkan trauma, kematian dan inflamasi adiposit (Kalupahana NS, 2011).

Penelitian pada tikus menunjukkan bahwa peningkatan jaringan adiposa yang tidak diimbangi dengan peningkatan jaringan pendukung seperti jaringan vaskuler akan mengakibatkan terjadinya hipoksia jaringan yang akan memicu ekspresi gen *hypoxia-inducible factor-1* dan gen inflamasi. Tekanan parsial oksigen pada jaringan adiposa subkutan berkorelasi negatif dengan adipositas pada manusia. Maka hipoksia dapat

menjadi pemicu terjadinya inflamasi jaringan adiposa. Baik penelitian pada binatang maupun manusia mendukung peranan stres retikulum endoplasma jaringan adiposa sebagai penyebab lain terjadinya inflamasi pada obesitas (Kalupahana NS, 2011).

Obesitas memicu terjadinya resistensi insulin pada otot, hati dan jaringan adiposa. Banyak penelitian telah dilakukan untuk menjelaskan mekanisme terjadinya resistensi insulin akibat obesitas. Inflamasi *low-grade* kronik yang terjadi pada jaringan adiposa tampaknya merupakan faktor utama dalam patogenesis resistensi insulin akibat obesitas. Banyak penelitian yang telah membuktikan hal ini. Pertama, over ekspresi sitokin proinflamasi adiposa spesifik seperti MCP-1 memicu resistensi insulin. Kedua, netralisasi atau *knockdown* mediator inflamasi seperti TNF α , MCP-1 memproteksi tikus dari resistensi insulin akibat diet tinggi lemak. Yang terakhir, over ekspresi adipokin anti inflamasi seperti adiponektin mencegah tikus dari resistensi insulin akibat diet tinggi lemak (Kalupahana NS, 2011).

Peningkatan sitokin proinflamasi dapat menginduksi resistensi insulin melalui beberapa mekanisme. Sitokin proinflamasi dapat menginduksi ekspresi SOCS3 yang akan menghambat sinyal insulin melalui inhibisi aktivitas IRS. Sitokin proinflamasi juga mengaktifkan berbagai kinase serin intraseluler seperti JNK dan *inhibitor κ B kinase*. Peningkatan kadar FFA sirkulasi akibat resistensi insulin pada jaringan adiposa pada akhirnya juga dapat menghambat sinyal insulin melalui

fosforilasi serin pada IRS dan kemudian mengakibatkan resistensi insulin pada otot dan hati (Kalupahana NS, 2011).

Meskipun ketidakseimbangan antara sitokin pro dan anti inflamasi dapat memicu resistensi insulin melalui efek parakrin, efek endokrin adipositokin juga penting dalam perkembangan resistensi insulin pada otot dan hati. Contohnya, kadar adiponektin sirkulasi yang merupakan adipokin yang khusus disekresi oleh jaringan adiposa, berkorelasi positif dengan sensitivitas insulin baik pada manusia maupun tikus. Individu dengan adiponektin plasma yang tinggi berisiko lebih rendah untuk mengalami diabetes tipe 2. Inflamasi jaringan adiposa pada obesitas berperan penting terhadap terjadinya resistensi insulin. Oleh karena itu, penelitian dengan menggunakan tikus model dengan berbagai derajat obesitas penting dilakukan (Kalupahana NS, 2011).

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa pengaktifan AMP kinase merupakan bagian dari efek sinyal adiponektin. AMP kinase akhir-akhir ini, dianggap sebagai komponen yang berperan dalam mekanisme kerja metformin sehingga diduga adiponektin mempunyai efek metabolik anti diabetik melalui peningkatan sensitivitas insulin. Secara garis besar dampak adiponektin terhadap respon inflamasi adalah menghambat produksi TNF- α , sehingga dianggap adiponektin adalah anti inflamasi (Chandran M, 2003 ; Fernandez R, 2004).

Peningkatan TNF α dalam jaringan adiposa adalah sitokin yang pertama kali diteliti pada mencit obes oleh Hotamisligil dkk pada tahun

1993. Sesudah itu, literatur yang membahas tentang sitokin inflamasi semakin banyak, misalnya CRP, IL-6, PAI-1. Pengaktifan kinase inflamasi seperti IKK β dan JNK1 merupakan bukti tambahan terjadinya pengaktifan jalur inflamasi intraseluler pada obesitas (Ye J, 2010 ; Hotamisligil, 1995)

Peningkatan TNF α pada keadaan resistensi insulin akan menekan proses penyandian *post receptor* sehingga menghambat aktivitas IRT (*Insulin Receptor Tyrosine*) kinase dan menghambat translokasi GLUT 4, sehingga berakibat ambilan glukosa kedalam sel berkurang dan glukosa darah meningkat.

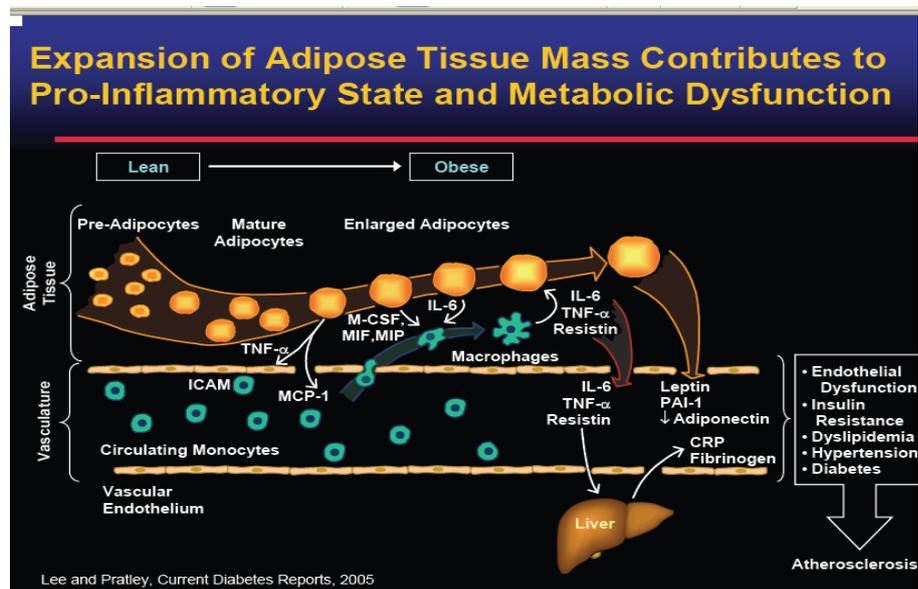
Sel adiposit model binatang coba yang obes ditandai dengan adanya suasana inflamasi atau disebut juga sebagai sel lemak yang sedang “sakit” (*sick fat cells*), serta tampak adanya infiltrasi makrofag yang sejalan dengan derajat obesitas. Perubahan pada adiposit dalam hal jumlah dan ukuran sel, menyebabkan perubahan pada daerah sekitarnya dan terjadi modifikasi fungsi parakrin dari adiposit. Pada keadaan obes, adiposit akan mensekresi TNF α dan *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1). Sel endotel juga menghasilkan MCP-1 sebagai respons terhadap rangsangan sitokin. Keduanya bertanggung jawab pada peningkatan makrofag pada jaringan adiposa. Xu dkk (2003) membuktikan bahwa ekspresi MCP-1 mendahului ekspresi petanda dari makrofag dalam perkembangan obesitas (Xu H, 2003 ; Lee YH, 2005)

Perubahan lemak dari yang normal menjadi obes dipengaruhi oleh adanya faktor genetik dan gaya hidup dengan pola konsumsi yang

berlebihan. Dalam perkembangan menjadi obesitas, sel adiposit membesar, melepaskan TNF α dan MCP-1 ke pembuluh darah, sehingga merangsang sel monosit berubah menjadi makrofag dan masuk ke jaringan adiposa. Jaringan adiposa akan berkembang menjadi bertambah besar dan bertambah banyak. Sel adiposit bersama makrofag selanjutnya terjadi pergesekan satu sama lain yang kemudian merangsang pelepasan adipositokin dan sel pro inflamasi seperti TNF α dan IL-6 (Lee YH,2005 ; Wellen KE, 2003)

Keberadaan makrofag pada jaringan adiposa akan menghasilkan berbagai sitokin, diantaranya IL-6 dan TNF α , yang akan mengaktifkan *Jun N-terminal kinase* (JNK) dan *Nuclear Factor* $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$). Pengaktifan faktor proinflamasi tersebut pada gilirannya akan mengganggu fosforilasi reseptor insulin, sehingga reseptor insulin tidak dapat berfungsi secara optimal untuk berikatan dengan lepasan insulin dalam sirkulasi, dan menimbulkan keadaan klinis yang dikenal sebagai resistensi insulin. Oleh sebab itu disfungsi adiposit tersebut, atau lebih dikenal sebagai "*sick fat cells*" pada gilirannya akan mengakibatkan resistensi insulin pada penderita (Xu H, 2003).

Peningkatan kadar TNF α dalam sirkulasi orang obes tidak hanya berkaitan dengan over produksi pada jaringan adiposa, namun juga merupakan efek sistemik leptin dan adipokin lainnya yang mungkin menginduksi sekresi TNF α dari makrofag dan limfosit (Nur Aslan, 2010).



Gambar 3. Patogenesis obesitas (Lee YH, 2005)

Perbedaan relatif kadar TNF α tergantung pada kondisi klinis, genetik dan lingkungan pada populasi tertentu, dan batas nilainya masih kontroversial. Kadar TNF α dapat diperiksa dengan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sensitivitas tinggi. Pada penelitian yang dilakukan oleh Gurrola dkk (2009) diperoleh data bahwa pada individu *overweight* dan obes kadar TNF α lebih besar dari 1,36 pg/mL (Di'az CMG, 2009).

Kueht dkk (2008) melaporkan bahwa terjadi peningkatan TNF α pada wanita Afrika-Amerika dengan obesitas kelas III (BMI > 40,0 kg/m²). Hal ini terjadi akibat pengaktifan NF κ B yang memainkan peran penting sebagai promotor ekspresi gen proinflamasi yang menyertai stimulasi seluler oleh LPS (Kueht ML, 2009).

Tumor Necrosis Factor α dapat menginduksi resistensi insulin melalui beberapa mekanisme termasuk penurunan regulasi reseptor insulin, penurunan sintesis GLUT4 dan pengaruhnya terhadap aktivitas lipolisis. Hubungan timbal balik antara obesitas dan TNF α sangat kompleks dan mungkin melibatkan banyak hal diantaranya genetik, jenis kelamin dan proses metabolik. Namun demikian, sudah jelas bahwa TNF α berperan penting dalam fungsi dan massa sel adiposit yang berimplikasi terhadap resistensi insulin dan diabetes (Farmer JA, 2008).

Tumor Necrosis Factor α menurunkan aktivitas reseptor tirosin kinase yang diinduksi oleh insulin dan ekspresi reseptor insulin IRS-1 dan GLUT-4, dan meningkatkan fosforilasi serin 307 pada IRS-1, sehingga mengganggu kemampuan insulin untuk berikatan dengan reseptornya dan mengawali menurunnya sinyal insulin (Jain SK, 2009).

Cara umum untuk mengukur sensitivitas insulin adalah secara surogat dengan memeriksa kadar insulin puasa atau kadar insulin setelah pembebanan glukosa. Banyak variasi prosedur yang digunakan untuk mendeteksi resistensi insulin secara klinis. Yang paling baku dipakai dalam penelitian dengan pengukuran yang spesifik adalah cara klem euglikemik hiperinsulinemik dengan cara mengukur jumlah rata-rata glukosa yang diberikan intravena untuk mempertahankan normoglikemia bila insulin diinfuskan. Cara kedua yang kurang invasif adalah dengan metode *Frequently Sampled Intravenous Glucose Tolerance Test (FSIVGTT)*. Cara ketiga merupakan cara yang paling mudah secara klinis adalah pengukuran

insulin puasa. Modifikasi cara ini adalah *Oral Glucose Tolerance Test* (OGTT) pada manusia dan *Intraperitoneal Glucose Tolerance Test* (IPGTT) pada hewan coba (Cefalu WT, 2001).

E. Efek Kurkumin terhadap Resistensi Insulin dan TNF α pada Obesitas

Kunyit (*Curcuma longa*) termasuk salah satu tanaman rempah dan obat, habitat asli tanaman ini meliputi wilayah Asia khususnya Asia Tenggara. Hampir setiap orang Indonesia pernah mengonsumsi tanaman rempah ini, baik sebagai pelengkap bumbu masakan, jamu atau untuk menjaga kesehatan dan kecantikan, juga dapat digunakan sebagai obat berbagai penyakit.

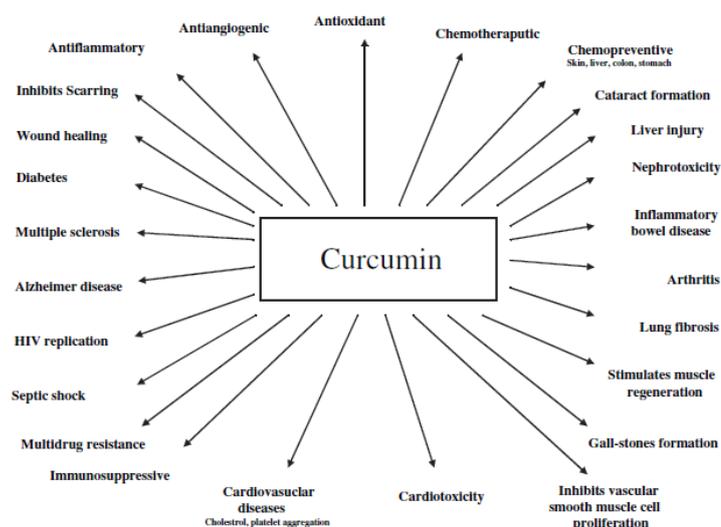
Taksonomi tanaman kunyit adalah sebagai berikut (Chattopadhyay I, 2004) :

Kelas : Liliopsida
Subklas : Commelinids
Ordo : Zingiberales
Famili : Zingiberaceae
Genus : *Curcuma*
Species : *Curcuma longa*

Kunyit mengandung protein (6.3%), fat (5.1%), mineral (3.5%), karbohidrat (69.4%) dan *moisture* (13.1%). Kurkuminoid sebagai komponen yang utama dalam jenis kurkuma yang bertanggung jawab untuk efek

farmakologis karena sifat kimia dan biologinya. Kurkuminoid dalam *C. longa* dan spesies kurkuma lainnya terutama terdiri dari *curcumin* (1), *bis-demethoxycurcumin* (2) and *demethoxycurcumin* (3) dan telah banyak penelitian yang menunjukkan spektrum aktivitas biologiknya (Itokawa H, 1985 ; Uehara S, 1987)

Kurkumin pertama kali diisolasi pada tahun 1815 dan struktur kimianya ditemukan oleh Roughley dan Whiting pada tahun 1973 (Chattopadhyay I, 2004).

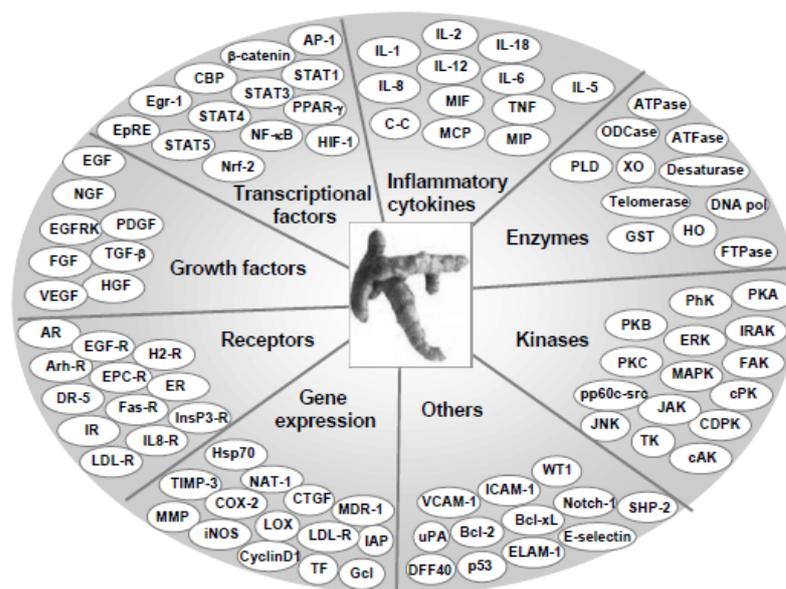


Gambar 4. Penggunaan kurkumin sebagai obat berbagai penyakit (Aggarwal BB, 2006)

Kurkumin merupakan suatu senyawa polifenol yang sudah digunakan berabad-abad sebagai obat di India dan mempunyai berbagai efek farmakologis, diantaranya efek anti inflamasi, anti oksidan, kemopreventif dan efek kemoterapi. Rhizoma dari kunyit ini telah lama

dikenal di dunia sebagai bumbu dapur dan pewarna makanan maupun pakaian (Mohamed MK, 2010 ; Aggarwal BB, 2006)

Kurkumin dihasilkan dari kunyit melalui proses ekstraksi etanol. Secara farmakologi, tanaman ini cukup aman berdasarkan pertimbangan bahwa tanaman ini telah digunakan sebagai bumbu dengan dosis sampai 100 mg/hari selama berabad-abad. Penelitian eksperimental yang telah dilakukan menunjukkan bahwa manusia dapat mentoleransi sampai dosis 8 gram/hari. Di Amerika Serikat, kurkumin digunakan sebagai pewarna makanan pada keju, bumbu, mustar, sereal, acar, keripik kentang, sup, es krim dan yogurt (Aggarwal BB, 2005).



Gambar 5. Target molekul kurkumin (Aggarwal BB, 2007)

Kurkumin telah digunakan secara luas untuk mengobati penyakit-penyakit inflamasi, termasuk obesitas dan penyakit metabolik lainnya.

Penelitian tentang efek terapi kurkumin telah banyak dilakukan. Kurkumin dipercaya sebagai agen anti oksidan dan anti inflamasi yang potensial. Saat ini penelitian lebih difokuskan pada mekanisme efek molekulernya. Berbagai penelitian tentang kurkumin sebagai anti oksidan dan efeknya terhadap kadar TNF α telah dilakukan. Kurkumin bekerja secara langsung melalui COX2, DNA polimerase, LOX, glycogen synthase-3 β (GSK-3 β) dan sitokin-sitokin (TNF α). Juga bekerja secara tidak langsung melalui NF κ B, AP-1, β -katenin, protein STAT dan PPAR γ (Shehzad A, 2011).

Penelitian yang dilakukan oleh Seo dkk (2007) menunjukkan bahwa kurkumin terbukti sebagai agen penurun glukosa darah dan anti oksidan yang potensial pada tikus diabetes. Mekanismenya melalui perbaikan resistensi insulin dengan peningkatan kadar leptin dan insulin plasma. Tampaknya kurkumin mempengaruhi pelepasan insulin melalui induksi pada aktivitas elektrik sel β pankreas. Insulin menginduksi sintesis dan sekresi leptin melalui regulasi metabolisme glukosa di adiposit. Kurkumin juga memperbaiki metabolisme glukosa dan lemak di hati dan otot, melalui regulasi enzim glukoneogenik dan glikolitik (Jain SK, 2009 ; Seo KI, 2008).

Banyak pula penelitian yang menunjukkan efek kurkumin sebagai anti inflamasi. Kurkumin menghambat metabolisme asam arakhidonat, siklooksigenase, lipooksigenase dan sitokin-sitokin (interleukin dan TNF α), NF κ B dan pelepasan hormon steroid. Beberapa penelitian pada hewan, dosis 100 – 200 mg/kg berat badan memperlihatkan aktivitas anti inflamasi yang baik dan mengakibatkan efek samping yang ringan pada manusia.

Dosis letal (LD50) per oral pada mencit mencapai lebih dari 2 g/kg berat badan. Dalam suatu penelitian tentang toksisitas sub akut, tidak ditemukan efek samping yang signifikan pada tikus dengan pemberian kurkumin 1 – 2 g/kg berat badan selama 4 minggu. Menurut Sharma dkk (2007) sifat anti inflamasi kurkumin dengan cara menghambat produksi IL-1, IL-6 dan TNF- α dan merangsang sekresi IL-10 melalui pengaruhnya terhadap makrofag (Mullaicharam AR, 2012 ; Sharma S, 2007).

Dalam 2 dekade terakhir, terdapat banyak penelitian tentang kurkumin yang telah dipublikasikan yang mengungkapkan bahwa kurkumin memodulasi berbagai protein regulator, termasuk faktor transkripsi, enzim, sitokin dan *growth factor*. Penelitian-penelitian tersebut menunjukkan bahwa kurkumin menghambat berbagai jalur sinyal dan target molekul pada inflamasi dan penyakit metabolik terkait obesitas. Kurkumin dapat menghambat kompleks sinyal IKK yang bertanggung jawab untuk fosforilasi I κ B yang akan menghentikan pengaktifan NF κ B yang diinduksi oleh agen-agen inflamasi. Kurkumin juga menurunkan ekspresi berbagai sitokin proinflamasi termasuk TNF α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 melalui inaktivasi NF κ B (Shehzad A, 2011).

Penelitian yang dilakukan oleh Weisberg dkk (2008) menunjukkan bahwa kurkumin terbukti memperbaiki inflamasi terkait obesitas dan diabetes. Mereka melaporkan setelah pemberian 3% kurkumin dalam diet pada tikus percobaan, dapat meningkatkan sensitivitas insulin dengan cara menekan infiltrasi makrofag pada jaringan adipose putih (WAT),

meningkatkan produksi adiponektin, menurunkan aktivitas NF κ B, hepatomegali, dan petanda inflamasi di hepar (Weisberg SP, 2008).

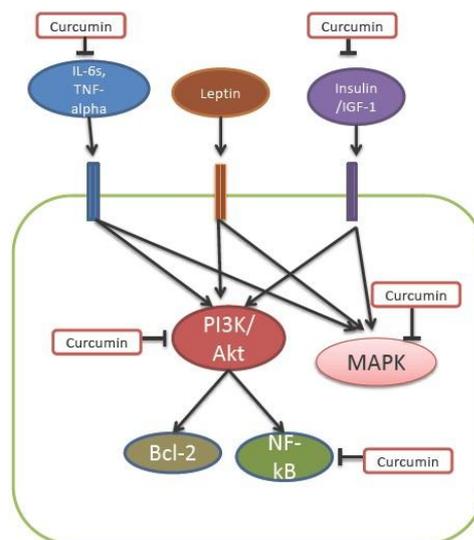
Penelitian oleh Wang dkk (2009) membuktikan bahwa kurkumin meningkatkan ambilan glukosa yang distimulasi oleh insulin pada sel dan menekan transkripsi dan sekresi TNF α dan IL-6 melalui palmitat dengan *concentration-dependent manner*. Palmitat dan glukosa tinggi dapat mengaktifkan NF κ B dan menginduksi TNF α dan IL-6 pada adiposit. Kurkumin menghambat pengaktifan NF κ B. Kurkumin juga menurunkan aktivitas JNK. Inhibisi JNK menekan ekspresi TNF α yang diinduksi oleh palmitat, sehingga disimpulkan bahwa kurkumin memediasi efeknya pada adiposit melalui inhibisi JNK (Aggarwal BB, 2010 ; Wang SL, 2009).

Gonzales dan Orlando (2008) melaporkan bahwa kurkumin menghambat sinyal NF κ B yang mengaktifkan TNF α pada adiposit dan menurunkan ekspresi sitokin secara signifikan. Mekanismenya diduga oleh karena kurkumin mencegah degradasi I κ B dan mengurangi translokasi nuklear NF κ B adiposit (Gonzales AM, 2008).

Penelitian lain yang dilakukan oleh Jain dkk (2009) melaporkan bahwa suplementasi kurkumin menurunkan produksi sitokin inflamasi termasuk TNF α , IL-6, IL-8 dan MCP-1 dari monosit yang diinduksi oleh kadar glukosa yang tinggi. Mereka juga menunjukkan bahwa kadar TNF α , IL-6, MCP-1, glukosa dan hemoglobin terglikosilasi dalam darah menurun pada tikus diabetes yang diberi diet kurkumin (Jain SK, 2009).

Kurkumin juga telah terbukti menurunkan ekspresi gen yang diinduksi TNF α pada sel endotelial aorta sapi melalui penekanan aktivitas AP-1 dan NF κ B (Bierhous A, 1997).

Terdapat beberapa mekanisme efek protektif kurkumin pada obesitas. Kurkumin dapat menghambat jalur MAPK dan Akt. Kurkumin juga menurunkan NF κ B yang diinduksi oleh TNF α , mengurangi kadar TNF α , IL-6, reseptor IGF-1 dan mRNA COX2. Sehingga kurkumin mengurangi inflamasi pada obesitas (Chen J, 2012).



Gambar 6. Mekanisme kurkumin menghambat inflamasi (Chen J, 2012)

Penelitian efek anti inflamasi ekstrak etanol kunyit terhadap tikus juga telah dilakukan di Indonesia oleh Rustam E dkk (2007) dan menyimpulkan bahwa ekstrak etanol kunyit dengan berbagai dosis memperlihatkan efek anti inflamasi dan pada dosis tinggi 1000 mg/kg dapat menekan udem sebesarnya sebesar 78,37%. Hal ini diduga merupakan efek dari

kurkumin sebagai salah satu bahan aktif kunyit yang dapat menghambat pembentukan prostaglandin dan menekan efektivitas enzim siklooksigenase (Rustam E, 2007).

F. Efek *Fish Oil* terhadap Resistensi Insulin dan TNF α pada Obesitas

Lipid merupakan komponen esensial dalam diet, yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan fungsi yang normal. Asam lemak esensial seperti asam linoleat (omega 6) dan asam linolenat (omega 3) merupakan komponen lipid yang penting. Contoh peran fisiologik *Poly Unsaturated Fatty Acid (PUFA)* rantai panjang adalah asam eikosapentanoat (EPA), asam dokosaheksanoat (DHA) dan asam arakhidonat (ARA) yang diproduksi melalui desaturasi dan elongasi asam lemak atau diperoleh dari diet (Yeung DL, 2003).

Fish oil berasal dari jaringan *oily fish*. *Fish oil* mengandung asam lemak omega 3 EPA dan DHA, yang merupakan prekursor eikosanoid yang penting untuk mengurangi inflamasi. Ikan sebenarnya tidak memproduksi asam lemak omega 3, tetapi memperolehnya dengan mengonsumsi mikroalga.

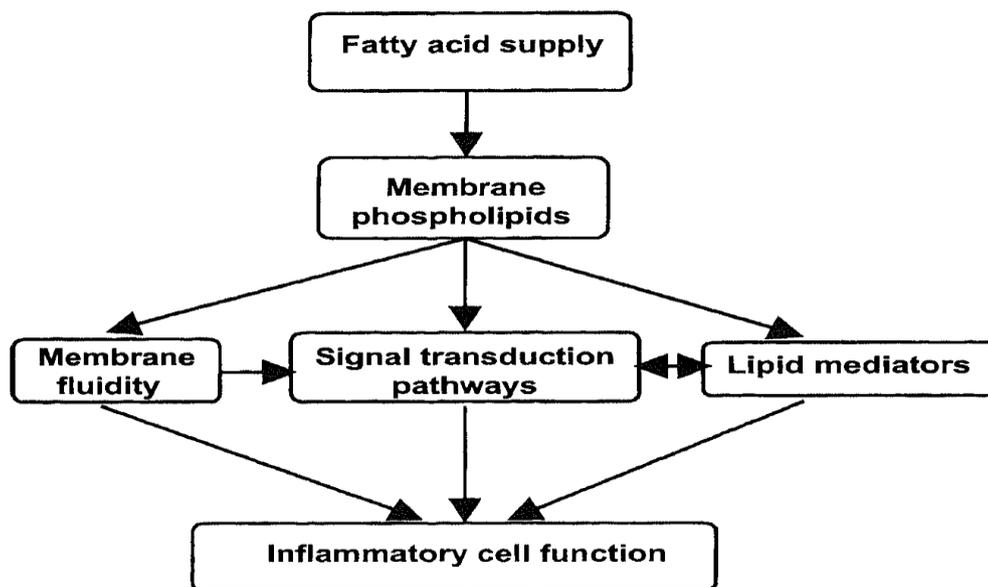
Tabel 1. Komposisi asam lemak DHA dan EPA

Nama ikan	DHA (%)	EPA (%)
Ikan Selar Kuning	9.4	3.2
Ikan Kembung	14.9	5.0
Ikan Layang	21.8	5.4
Ikan Pari	21.3	3.7
Ikan Lemuru	16.1	12.3

Asam lemak mempengaruhi inflamasi melalui berbagai mekanisme, sebagian besar berdasarkan komposisi asam lemak membran sel. Perubahan komposisi ini dapat memodifikasi fluiditas membran, sinyal sel yang mempengaruhi ekspresi gen dan pola produksi mediator lipid. Respons inflamasi sel melibatkan asam lemak omega 6 asam arakhidonat. Eikosanoid yang diproduksi dari asam arakhidonat berperan dalam proses inflamasi. Asam eikosapentanoat juga menghasilkan eikosanoid namun dengan karakteristik yang berbeda dengan eikosanoid yang dihasilkan oleh asam arakhidonat. EPA dan DHA menghasilkan resolvin yang mempunyai efek anti inflamasi. Perubahan komposisi asam lemak sel inflamasi juga mempengaruhi produksi mediator peptida seperti sitokin (Calder PC, 2010).

Kaitan antara asam lemak dan inflamasi terdapat pada komposisi fosfolipid membran sel inflamasi, karena komposisi asam lemak fosfolipid membran dapat mempengaruhi berbagai aktivitas membran yang dapat mempengaruhi respons seluler (Calder PC, 2003).

Fluiditas membran sel inflamasi sebagian ditentukan oleh komposisi kandungan fosfolipidnya. Fluiditas membran mempengaruhi aktivitas *membrane-bound* protein termasuk reseptor, transporter dan enzim yang akan mempengaruhi respons sel inflamasi terhadap stimulus. Eikosanoid, suatu kelompok mediator, dihasilkan dari asam lemak yang dibebaskan dari fosfolipid membran, sehingga kemampuan untuk memproduksi mediator ini sangat dipengaruhi oleh komposisi asam lemak fosfolipid membran (ketersediaan substrat). Jadi, komposisi asam lemak sel inflamasi sangat penting untuk regulasi respons fungsional sel tersebut (Calder PC, 2003).



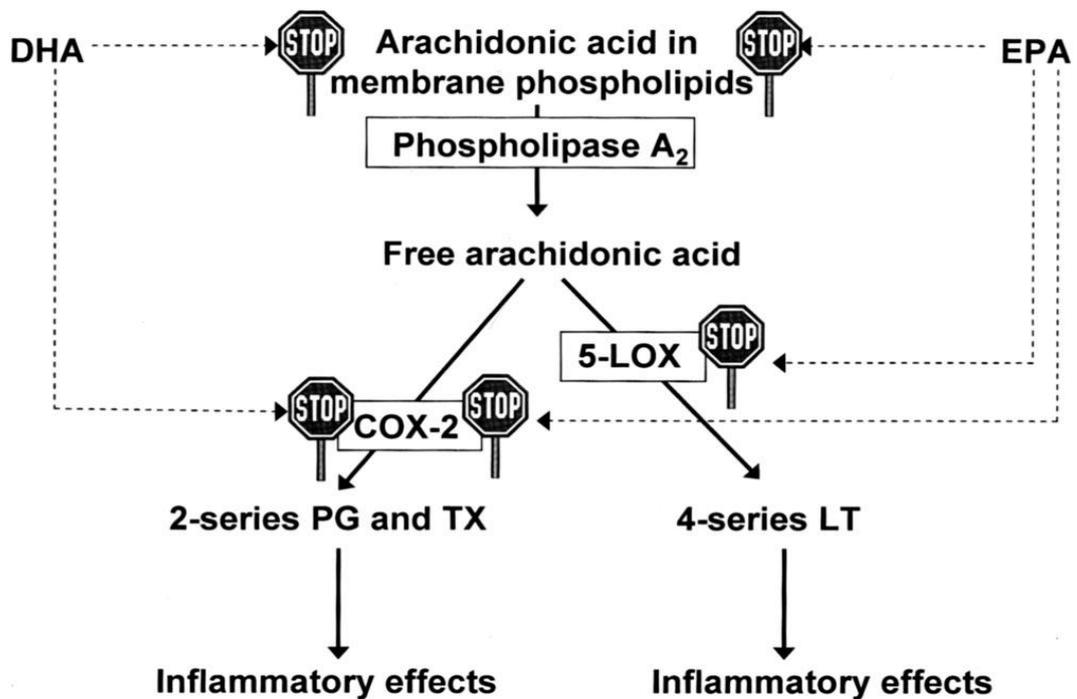
Gambar 7. Mekanisme pengaruh suplai asam lemak terhadap fungsi sel inflamasi (Calder PC, 2003)

Peningkatan konsumsi omega 3 EPA dan DHA akan meningkatkan proporsi asam lemak tersebut dalam fosfolipid sel inflamasi. Penggabungan EPA dan DHA ke dalam sel inflamasi manusia

terjadi secara *dose-respons*. Suplementasi fish oil dalam diet telah terbukti menurunkan produksi PGE₂, B₂ tromboksan, LTB₄, 5-asam hidroksieikosatetaranoat, dan LTE₄ oleh sel inflamasi. Kelley dkk melaporkan bahwa 6 g DHA / hari menghasilkan penurunan produksi PGE₂ (60%) dan LTB₄ (75%) melalui sel mononuklear yang distimulasi oleh endotoksin (Calder PC, 2006).

Asam eikosapentanoat juga dapat bertindak sebagai substrat untuk COX dan 5-LOX, meningkatkan eikosanoid dengan struktur yang sedikit berbeda dengan eikosanoid yang terbentuk dari asam arakhidonat. Bagga dkk melaporkan bahwa PGE₃ merupakan induser kurang ampuh terhadap ekspresi gen COX-2 dalam fibroblas dan produksi IL-6 oleh makrofag. Namun demikian, PGE₂ dan PGE₃ memiliki efek inhibisi terhadap efek produksi TNF α dan IL-1 oleh sel mononuklear manusia yang distimulasi oleh endotoksin. Berkurangnya mediator yang berasal dari asam arakhidonat ketika mengonsumsi fish oil telah membuktikan efek fish oil sebagai antiinflamasi (Calder PC, 2006).

Meskipun efek antagonis metabolisme asam arakhidonat adalah efek anti inflamasi utama omega 3, asam lemak ini memiliki beberapa efek anti inflamasi lain yang mungkin berhubungan dengan produksi eikosanoid. Sebagai contoh, penelitian telah menunjukkan bahwa, bila dikonsumsi dalam jumlah yang cukup, *fish oil* mengakibatkan penurunan kemotaksis leukosit, penurunan produksi spesies oksigen reaktif dan sitokin pro inflamasi, dan penurunan ekspresi adhesi molekul (Calder PC, 2006).



Gambar 8. Mekanisme klasik efek anti inflamasi asam lemak omega 3 (Calder PC, 2006)

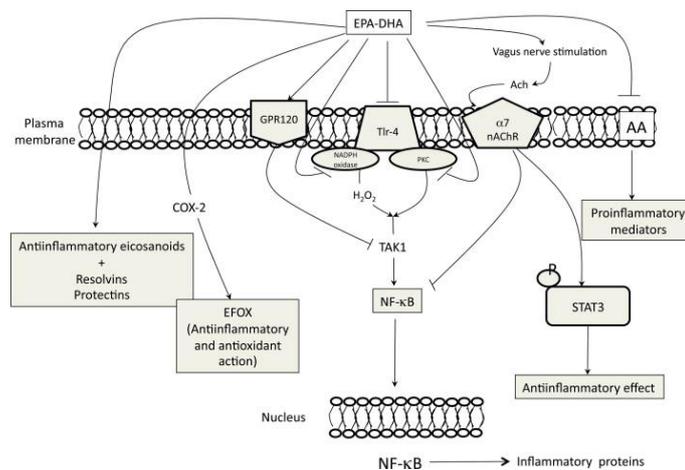
Philip C. Calder (2009) dalam sebuah *review* melaporkan bahwa efek omega 3 terhadap ekspresi gen sitokin inflamasi dapat melalui modifikasi aktivitas faktor transkripsi, sebagian besar melalui NF κ B dan PPAR- γ (Calder PC, 2009).

Nuclear Factor κ B diaktifkan sebagai akibat dari kaskade sinyal yang dipicu oleh stimulus inflamasi ekstraseluler dan melibatkan fosforilasi. EPA atau fish oil menurunkan pengaktifan NF κ B yang diinduksi oleh lipopolisakarida pada kultur monosit manusia dan hal ini dikaitkan dengan penurunan fosforilasi IKB, mungkin karena berkurangnya pengaktifan Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) (Calder PC, 2009).

Penelitian pada tikus telah membuktikan bahwa EPA dan DHA dapat mencegah dan mengatasi resistensi insulin terkait diet tinggi lemak atau diet tinggi sukrosa. EPA dan DHA mengurangi adipositas pada manusia khususnya jika dikombinasi dengan restriksi energi. Asam lemak ini mencegah perkembangan adipositas akibat diet tinggi lemak dan hipertropi adiposit pada tikus. Terdapat 2 mekanisme yang mungkin mendasari efek anti obesitas ini. Pertama, EPA dan DHA dapat meningkatkan oksidasi asam lemak di hati, jaringan adiposa dan usus halus pada tikus *in vivo* dan adiposit *in vitro*. *Fish oil* juga meningkatkan oksidasi asam lemak pada manusia dengan menurunkan *respiratory quotient*. Kedua, EPA dan DHA menghambat lipogenesis hepatic. Efek terhadap oksidasi asam lemak dapat terjadi melalui mekanisme pengaktifan AMPK pada jaringan adiposa. PUFA juga diketahui memicu biogenesis mitokondria (Kalupahana NS, 2011).

Meskipun kemungkinan bahwa perbaikan resistensi insulin sistemik terjadi secara sekunder akibat berkurangnya massa lemak, namun hal ini juga dapat terjadi akibat kerja langsung EPA dan DHA dalam memperbaiki fungsi jaringan adiposa. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa sensitivitas insulin yang dimediasi oleh EPA dan DHA tetap terjadi meskipun terjadi peningkatan massa lemak. EPA dan DHA memodulasi sekresi adipokin dari jaringan adiposa. EPA dan DHA meningkatkan kadar adiponektin plasma pada manusia dan tikus obes, yang mungkin merupakan mekanisme potensial bagaimana EPA dan DHA memperbaiki sensitivitas insulin. EPA dan DHA juga menginduksi sekresi leptin dan

visfatin serta menurunkan ekspresi beberapa sitokin proinflamasi dari jaringan adiposa, termasuk TGF α , IL-6, MCP-1 dan PAI-1. Bukti-bukti terbaru menunjukkan bahwa aktivitas anti inflamasi inilah yang memegang peranan utama pada efeknya dalam memperbaiki sensitivitas insulin (Kalupahana NS, 2011).



Gambar 9. Mekanisme efek anti inflamasi *fish oil* (Giudetti AM, 2012)

Suplementasi dengan EPA dan DHA juga mengurangi inflamasi melalui penurunan kadar sitokin proinflamasi TNF α , IL-1 dan IL-6 dalam sirkulasi. Mekanisme ini mungkin terkait dengan kemampuannya untuk memodulasi faktor transkripsi. Sintesis sitokin diatur oleh NF κ B. Secara in vitro EPA mencegah pengaktifan NF κ B yang diinduksi oleh LPS dan ekspresi TNF α mRNA (Duda MK, 2009).

Studi kultur sel menunjukkan bahwa EPA dan DHA dapat menghambat produksi IL-1 dan TNF α oleh monosit dan produksi IL-6 dan IL-8 oleh sel endotel vena. Pemberian *fish oil* menurunkan produksi *ex vivo* TNF α , IL-1, dan IL-6 oleh makrofag tikus. Suplementasi pada subjek yang

sehat dengan *fish oil* yang mengandung > 2 g EPA+DHA / hari menurunkan produksi TNF α atau IL-1 atau IL-6 oleh sel mononuklear dalam beberapa penelitian. Caughey dkk melaporkan korelasi terbalik yang signifikan antara kandungan EPA sel mononuklear dan kemampuan sel-sel untuk memproduksi TNF α dan IL-1 sebagai respons terhadap endotoksin (Calder PC, 2006).

Kelley dkk menunjukkan bahwa 6 g DHA / hari selama 12 minggu menghasilkan penurunan produksi TNF α (20%) dan IL-1 (35%) oleh sel mononuklear yang distimulasi oleh endotoksin. Baik EPA dan DHA mengakibatkan penurunan konsentrasi TNF α plasma, meskipun efek DHA lebih kuat (reduksi 35% dibandingkan dengan 20% untuk EPA) (Calder PC, 2006).

Asam eikosapentanoat dan DHA dapat menghambat produksi IL-1 dan TNF α oleh monosit. Pada keadaan inflamasi, fosfolipase A2 menghidrolisis fosfolipid membran, yang menyediakan asam arakhidonat untuk produksi prostaglandin E2 (PGE2) dan leukotrien B4 (LTB4), suatu eikosanoid proinflamasi. Studi *invitro* menunjukkan bahwa PGE2 dan LTB4 mempunyai efek berlawanan dengan produksi sitokin proinflamasi *fish oil* mungkin merubah produksi sitokin proinflamasi secara langsung melalui kandungan omega 3, mengganti asam arakhidonat pada membran sel. Hal ini akan menurunkan produksi PGE2 dan LTB4 dan meningkatkan formasi PGE3 dan LTB5 (Calder PC, 2003).

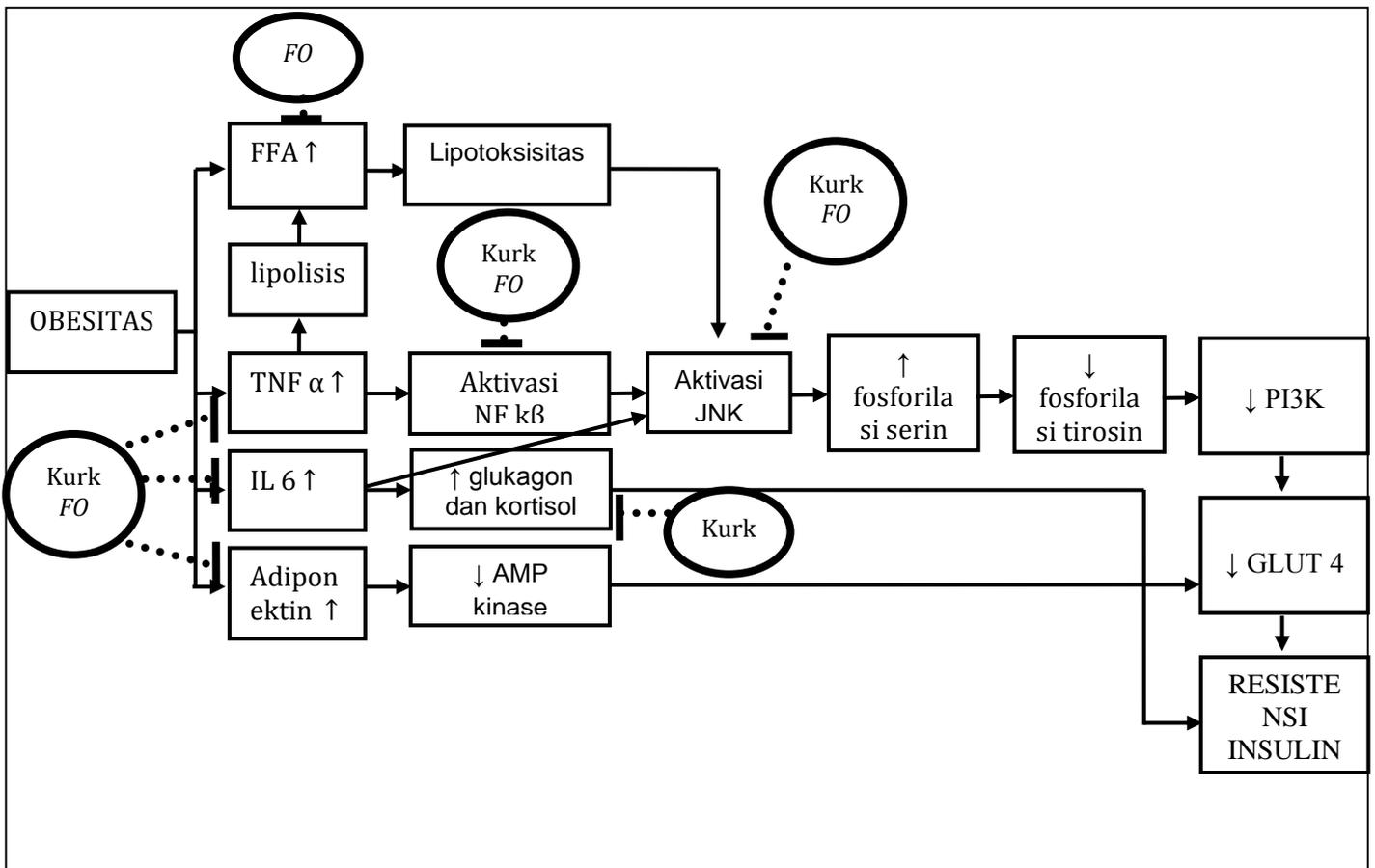
Faktor genetik juga mempengaruhi produksi TNF α . Grimble dkk (2002) melaporkan bahwa *fish oil* mampu menurunkan produksi TNF α pada subjek sehat melalui polimorfisme TNF α dan gen limfotoksin α (Grimble RF, 2002).

Penelitian yang dilakukan oleh Muurling M dkk yang dipublikasikan pada tahun 2003 menunjukkan bahwa mencit obes yang diberi diet *fish oil* mengalami penurunan kadar TNF α disertai penurunan berat badan. Penurunan berat badan diduga akibat berkurangnya massa lemak akibat meningkatnya lipolisis jaringan adiposa (Muurling M, 2003).

BAB III

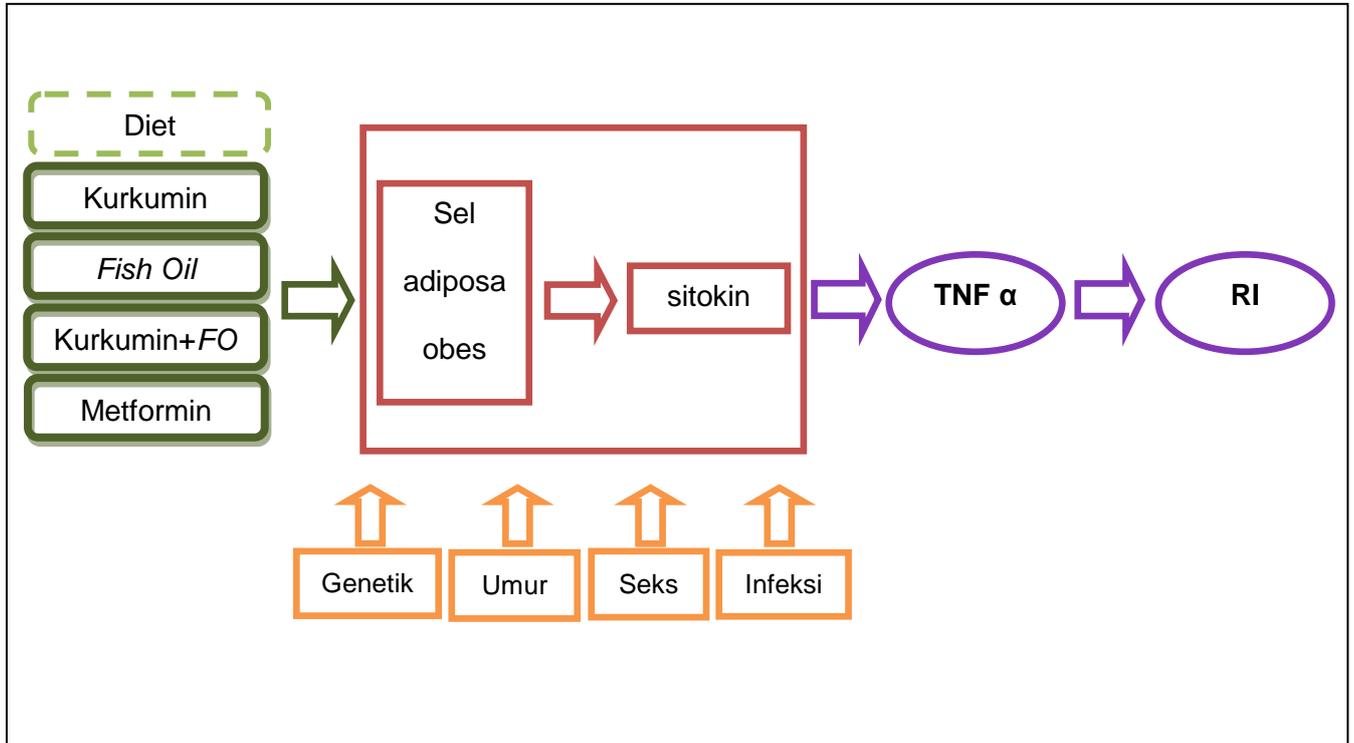
KERANGKA PENELITIAN

A. Kerangka Teori



Gambar 10. Kerangka teori

B. Kerangka Konsep



Gambar 11. Kerangka konsep

Keterangan:

- = Variabel bebas yang diteliti
- = Variabel bebas yang tidak diteliti
- = Variabel tergantung
- = Variabel antara
- = Variabel kendali
- ➡ = Hubungan variabel bebas
- ➡ = Hubungan variabel tergantung
- ➡ = Hubungan variabel antara
- ➡ = Hubungan variabel kendali

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Desain

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental.

B. Tempat

Penelitian dilakukan di laboratorium hewan Fakultas Kedokteran UNHAS Makassar.

C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan adalah mencit sehat, jenis kelamin jantan dengan galur C57BL/6J. Sampel yang diambil adalah mencit umur 5 minggu dengan berat badan 15-20 gram sebanyak 30 ekor. Penentuan jumlah sampel mengikuti perhitungan jumlah sampel menurut *Federer* (Federer, 1991) dengan rumus :

$$(n-1) (t-1) > 15$$

Keterangan :

n = jumlah sampel

t = jumlah kelompok

Karena t = 6 maka jumlah sampel yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah minimal 4 untuk setiap kelompok.

D. Prosedur Penelitian

1. Prosedur penelitian eksperimental

Seluruh mencit dikandangkan pada kondisi bebas patogen dan diadaptasikan pada kondisi laboratorium selama 2 minggu dengan pemberian makanan normal dan diberi siklus penerangan 12 jam gelap dan 12 jam terang. Mencit kemudian dibagi menjadi 4 kelompok yaitu :

- a. Kelompok I : Mencit umur 5 minggu, sebanyak 5 ekor diberikan diet normal, sebagai kelompok kontrol normal.
- b. Kelompok II : Mencit umur 5 minggu, sebanyak 5 ekor diberi diet tinggi lemak selama 12 minggu, setelah didapatkan mencit dengan berat 35-40 gram, mencit ini tetap diberi diet tinggi lemak kembali tanpa intervensi selama 5 minggu, sebagai kelompok kontrol negatif.
- c. Kelompok III : Mencit umur 5 minggu, sebanyak 5 ekor diberi diet tinggi lemak selama 12 minggu, setelah didapatkan mencit dengan berat 35-40 gram, diberi intervensi *fish oil* selama 8 minggu, sebagai kelompok intervensi *fish oil*.
- d. Kelompok IV : Mencit umur 5 minggu, sebanyak 5 ekor diberi diet tinggi lemak selama 12 minggu, setelah didapatkan mencit dengan berat 35-40 gram, diberi intervensi kurkumin selama 6 minggu, sebagai kelompok intervensi kurkumin.
- e. Kelompok V : Mencit umur 5 minggu, sebanyak 5 ekor diberi diet tinggi lemak selama 12 minggu, setelah didapatkan mencit dengan berat 35-

40 gram, diberi intervensi kurkumin + *fish oil* selama 8 minggu, sebagai kelompok intervensi kurkumin + *fish oil*.

- f. Kelompok VI : Mencit umur 5 minggu, sebanyak 5 ekor diberi diet tinggi lemak selama 12 minggu, setelah didapatkan mencit dengan berat 35-40 gram, diberi intervensi metformin selama 8 minggu, sebagai kelompok kontrol positif.

Selama perlakuan dilakukan penimbangan pellet dan pembersihan kandang setiap 3 hari. Pencatatan kenaikan berat badan mencit dilakukan setiap minggu.

Pada akhir masa perlakuan dan TTG/ITT mencit akan dikorbankan dengan menggunakan anestesi lokal intraperitoneum *Bupivacaine* 0.25% dan jaringan lemak epididimis akan diambil untuk pemeriksaan TNF α .

2. Prosedur pemeriksaan tes toleransi glukosa

- a. Mencit dipuasakan selama 16 jam.
- b. Berat masing-masing mencit diukur untuk menentukan dosis glukosa yang akan diberikan.
- c. Setiap mencit diberikan dosis glukosa 2,5 gram/ kgBB.
- d. Serbuk glukosa yang disiapkan diencerkan dengan konsentrasi 250 mg/ml akuades.
- e. Ukur glukosa darah sebelum penyuntikan glukosa menggunakan glukometer untuk mendapatkan nilai kadar glukosa 0 menit.

- f. Darah diambil dari ekor mencit yang sebelumnya telah di anastesi lokal dengan *Bupivacaine* 0.25% untuk menekan nyeri akibat pemotongan ekor mencit.
- g. Lakukan suntikan glukosa melalui intraperitoneum dengan dosis berat badan dalam gram dikalikan 10 ul yang diambil dari glukosa yang sudah diencerkan.
- h. Glukosa darah kemudian diukur pada 30, 60,120 menit setelah penyuntikan glukosa.

3. Prosedur pemeriksaan tes toleransi insulin

- a. Mencit dipuasakan selama 4 jam.
- b. Berat masing-masing mencit diukur untuk menentukan dosis glukosa yang akan diberikan.
- c. Penyuntikan insulin secara intraperitoneum dilakukan dengan dosis 0,75 U/kgBB.
- d. Insulin disiapkan dengan melarutkan insulin 16,6 ul dari 10 mg/ml dalam 40 ml BPS untuk mendapatkan insulin 0,1 U/ml.
- e. Ukur glukosa darah sebelum penyuntikan glukosa menggunakan glukometer untuk mendapatkan nilai kadar glukosa 0 menit.
- f. Darah diambil dari ekor mencit yang sebelumnya telah di anastesi lokal dengan *Bupivacaine* (0.25%) untuk menekan nyeri akibat pemotongan ekor mencit.
- g. Lakukan penyuntikan insulin melalui intraperitoneum.

- h. Glukosa darah kemudian diukur pada 30, 60,120 menit setelah penyuntikan insulin.

4. Prosedur pemeriksaan RT-PCR

RNA total diekstraksi dari jaringan dengan menggunakan *RN easy kit* (Qiagen) atau ISOGEN. *Quantitative* RT-PCR dilakukan dengan menggunakan SYBR Green QRT-PCR Master Mix, 1 langkah sesuai protokol dari produsen (Stratagene), yaitu mensintesis cDNA dan *Real Time* PCR dilakukan satu langkah dengan menggunakan RNA diamplifikasi pada *Stratagene Mx3000P QPCR System* (Stratagene, USA). Hasilnya dinormalisasi dengan internal kontrol β -actin.

TNF α forward, 5'-CCAGACCCTCACTAGATCA-3'; *TNF α reverse*, 5'-CACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'; *b-actin forward primer*, 5'-ATGGATGACGATATCGCT-3', *b-actin reverse primer*, 5'-ATGAGGTAGTCTGTCAGGT-3'.

E. Identifikasi Variabel

1. Variabel bebas pada penelitian ini adalah kurkumin, *fish oil*, kurkumin + *fish oil*, metformin, dan diet.
2. Variabel antara pada penelitian ini adalah proses inflamasi pada obesitas.
3. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah GTT, ITT, dan TNF α .

F. Definisi Operasional

1. Diet normal adalah diet yang mengandung 10% lemak, yang didatangkan dari *Research Diet* Amerika Serikat.
2. Diet tinggi lemak adalah diet yang mengandung 45% lemak, yang didatangkan dari *Research Diet* Amerika Serikat.
3. *Fish oil* terdapat dalam diet 45% lemak, yang mengandung 3 gram *Menhaden Oil* dalam 100 gram diet, yang didatangkan dari *Research Diet* Amerika Serikat.

Tabel 2. Komposisi diet

Komposisi	Diet Normal		Diet Tinggi Lemak	
	gram%	kcal%	gram%	kcal%
Protein	19.2	20.0	24.0	20.0
Karbohidrat	67.3	70.0	41.0	35.0
Lemak	4.3	10.0	24.0	45.0
kcal/gram	3.85		4.7	

4. Kurkumin adalah ekstrak kurkuma, dengan kode C7727 yang diproduksi oleh Sigma Ltd (Amerika), dicampurkan ke dalam diet 45% lemak dan dibuat pellet.
5. Metformin dibeli dalam bentuk tablet 500 mg di apotik setempat dengan menggunakan resep dokter dan dicampur ke dalam diet 45% lemak.
6. Mencit kontrol normal adalah mencit jantan, sehat galur C57BL/6J, didatangkan langsung dari *Animal Research Centre* (Australia), umur 5

minggu yang diberi diet normal, komposisi pakan mengandung 10% lemak.

7. Mencit kontrol negatif adalah mencit jantan, sehat galur C57BL/6J, didatangkan langsung dari *Animal Research Centre* (Australia), umur 5 minggu, yang telah diberi diet tinggi lemak, komposisi pakan mengandung 45% lemak, selama 12 minggu sampai mendapatkan berat 35-40 gram dan tetap diberi diet 45% lemak sampai akhir percobaan.
8. Mencit perlakuan (intervensi) adalah mencit yang telah diberi diet tinggi lemak selama 3 bulan sampai berat didapatkan 35-40 gram kemudian diberi diet 45% lemak ditambah suplemen *fish oil* atau kurkumin atau kurkumin dan *fish oil* melalui oral yang dicampur dengan pellet yang dimakan selama 8 minggu.
9. Mencit kontrol positif adalah mencit yang telah diberi diet tinggi lemak selama 3 bulan ditambah metformin yang dicampur dengan pellet yang dimakan selama 8 minggu.
10. Berat badan adalah nilai berat badan mencit yang di dapat dengan mengukur berat badan mencit setiap minggu selama penelitian berlangsung dengan menggunakan timbangan digital dengan ketelitian 0,1 gram.
11. Tes Toleransi Glukosa (TTG) adalah pemeriksaan untuk melihat sensitivitas insulin dengan cara mencit dipuaskan selama 16 jam kemudian larutan glukosa diinjeksi secara intraperitonium dengan dosis

2,5 gram/kgBB. Kadar gula darah diukur dengan glukometer menggunakan darah dari vena ekor pada menit 0, 30, 60, 120.

12. Tes Toleransi Insulin (TTI) adalah pemeriksaan untuk melihat sensitivitas insulin dengan cara mencit dipuasakan selama 4 jam kemudian larutan insulin diinjeksi secara intraperitonium dengan dengan dosis 0,75 U/kgBB. Kadar gula darah diukur dengan glukometer menggunakan darah dari vena ekor pada menit 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90.
13. *Tumor Necrosis Factor α* adalah didapatkan dari serum plasma mencit dan jaringan adiposa epididimis setelah 8 minggu intervensi, diperiksa menggunakan teknik ELISA dan RT-PCR di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran UNHAS Makassar.
14. Insulin resisten adalah keadaan jika terjadi peningkatan kadar glukosa darah sesuai waktu pada 0, 30, 60, 90, dan 120 menit setelah penyuntikan glukosa intraperitoneum atau keadaan jika tidak terjadi penurunan kadar glukosa darah sesuai waktu pada 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 menit setelah penyuntikan insulin intraperitoneum jika dibandingkan dengan kelompok kontrol normal.
15. Insulin sensitif adalah keadaan jika terjadi penurunan kadar glukosa darah sesuai waktu pada 0, 30, 60, 90, dan 120 menit setelah penyuntikan glukosa intraperitoneum atau keadaan jika terjadi penurunan kadar glukosa darah sesuai waktu pada 0, 15, 30, 45, 60, 75, dan 90 menit setelah penyuntikan insulin intraperitoneum jika dibandingkan dengan kelompok kontrol normal.

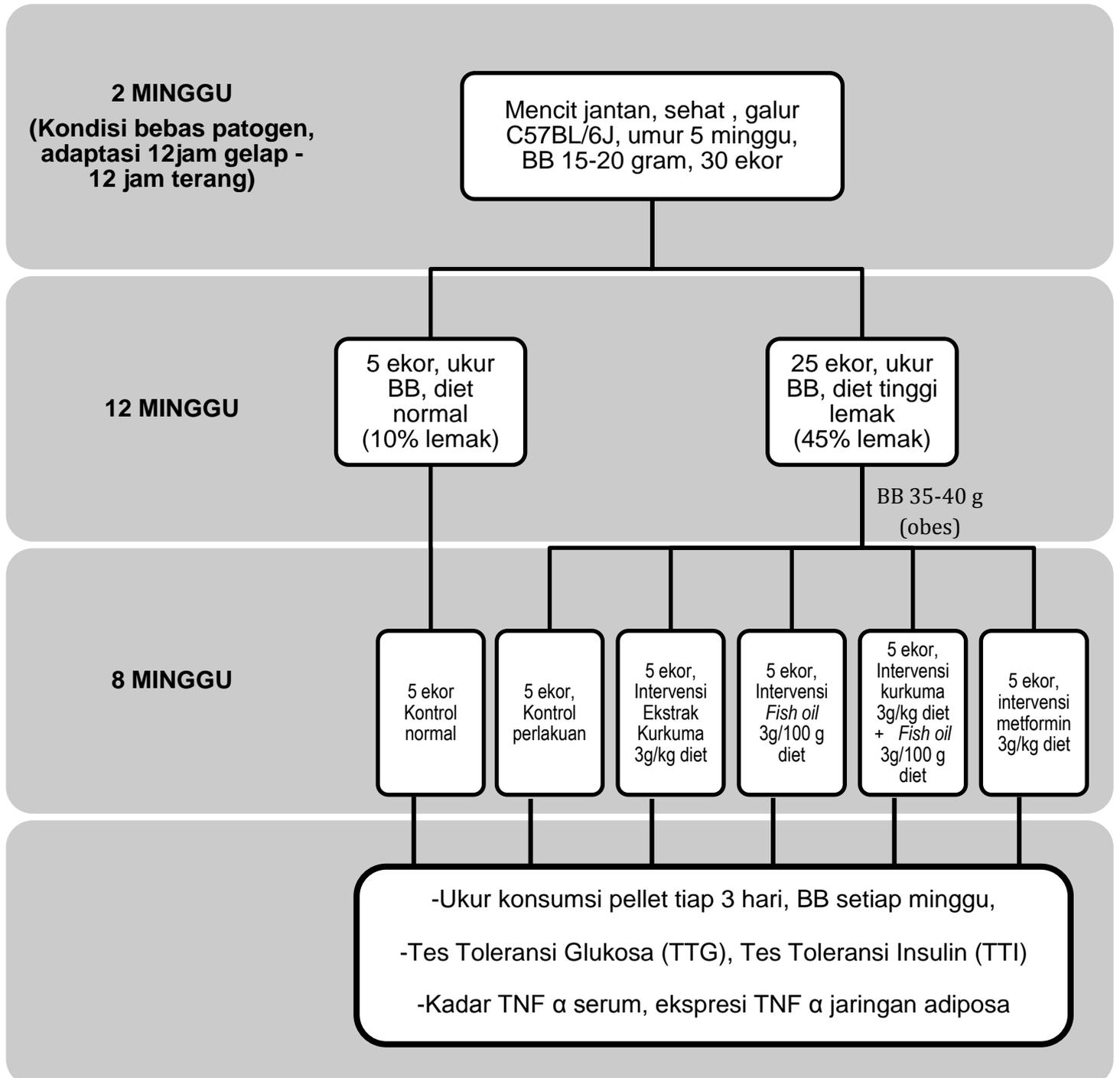
G. Rencana Manajemen dan Analisis Data

Data yang dikumpul diolah menggunakan analisis statistik dengan menggunakan SPSS 19. Untuk melihat perbandingan hasil terapi di antara keenam kelompok digunakan Uji ANOVA dengan batas kemaknaan 5% ($p < 0,05$) jika data berdistribusi normal. Namun jika data tidak normal digunakan Uji Kruskal-Wallis untuk data yang tidak berpasangan dan Uji Friedman untuk data yang berpasangan. Untuk melihat perbandingan dua kelompok digunakan uji t jika data berdistribusi normal dan uji Mann-Whitney jika distribusi data tidak normal.

H. Izin Penelitian dan Kelaikan Etik

Permintaan izin penelitian ini dinyatakan memenuhi persyaratan etik penelitian hewan dari Komisi Etik Penelitian Biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

I. Alur Penelitian



Gambar 12. Alur penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Penelitian ini dimulai dengan pemeliharaan mencit CL57BL/6J yang berumur 5 minggu dengan berat badan rata-rata 19 gram. Sebanyak 35 ekor mencit yang diteliti dibagi dalam 2 jenis diet yaitu 5 ekor untuk diet normal (10% kalori dari lemak) dan 30 ekor diberi diet tinggi lemak (45% kalori dari lemak). Setelah 12 minggu pemeliharaan didapatkan 2 kelompok mencit dengan berat badan yang berbeda secara signifikan antara kelompok diet normal dan kelompok diet tinggi lemak.

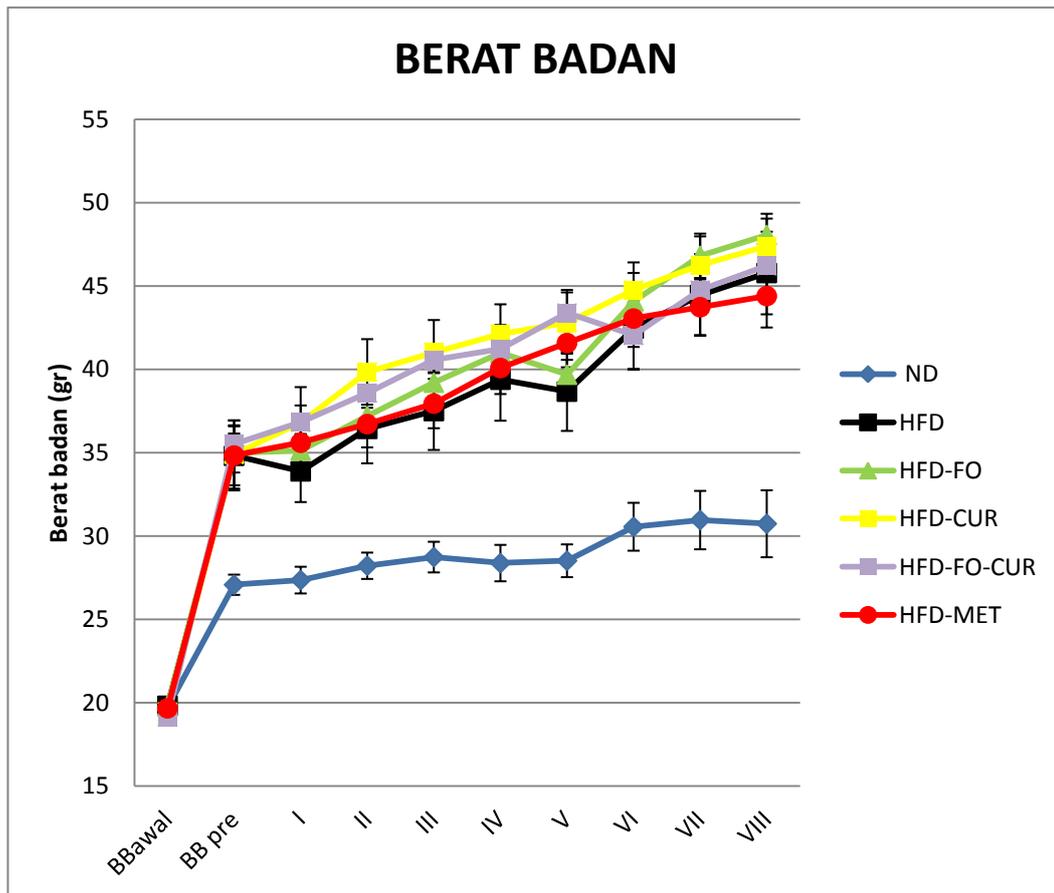
Selanjutnya 30 ekor mencit yang mendapatkan diet tinggi lemak dibagi lagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri atas 6 ekor mencit, yaitu kelompok kontrol negatif (*High Fat Diet*, HFD), kelompok kontrol positif (*High Fat Diet-Metformin*, HFD-Met), kelompok intervensi *fish oil* (HFD-FO), kurkumin (HFD-Cur), dan gabungan *fish oil* dan kurkumin (HFD-FO-Cur). Pada keenam kelompok tersebut kemudian dilakukan analisis terhadap sejumlah variabel yang akan menjadi acuan dalam melakukan penilaian adanya pengaruh pemberian kurkumin, *fish oil*, dan kombinasi keduanya terhadap mekanisme perbaikan resistensi insulin mencit obes.

1. Karakteristik data dasar

Tabel 3. Berat badan awal mencit dan sebelum intervensi

		n	Mean ± SD	P
BBawal	ND	5	19.70 ± 1.29	0.80
	HFD	29	19.59 ± 0.82	
BBpreinterv	ND	5	27.08 ± 1.35	0.000
	HFD	29	34.99 ± 3.87	

Uji t tidak berpasangan



Gambar 13. Perubahan berat badan mencit. ND = Normal Diet, HFD = High Fat Diet, HFD-FO = High Fat Diet-Fish oil, HFD-CUR = High Fat Diet-Curcumin, HFD-FO-CUR = High Fat Diet-Fish Oil-Curcumin, HFD-MET = High Fat Diet-Metformin.

Berat badan mencit pada awal pemeliharaan tidak berbeda signifikan, BB mencit setelah pemberian diet tinggi lemak selama 12 minggu pada kelompok yang akan diintervensi didapatkan perbedaan BB yang signifikan (29%) antara kelompok ND dibanding HFD. BB pada kelima kelompok HFD sebelum intervensi tidak didapatkan perbedaan bermakna.

2. Efek terhadap resistensi insulin setelah intervensi

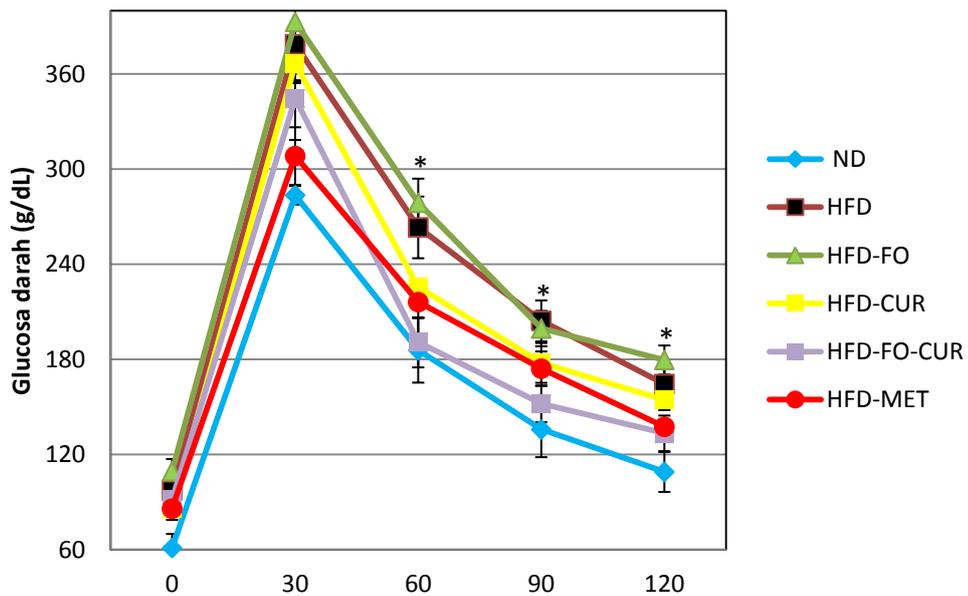
Tabel 4. Pemeriksaan tes toleransi glukosa

		N	Mean±SD
GTT_0	ND	5	61±20.06
	HFD	6	97.16±16.21
	HFD-FO	6	109.5±18.83
	HFD-CUR	6	86.33±12.01
	HFD-FO+CUR	5	91.40±9.31
	HFD-MET	6	85.83±17.26
GTT_30	ND	5	283.6±13.12
	HFD	6	378.83±59.97
	HFD-FO	6	393±90.21
	HFD-CUR	6	366.5±27.81
	HFD-FO+CUR	5	344.6±58.41
	HFD-MET	6	308.33±44.51
GTT_60	ND	5	185.8±45.64
	HFD	6	263.33±47.64
	HFD-FO	6	278.83±37.34
	HFD-CUR	6	225.66±12.83
	HFD-FO+CUR	5	190.8±35.30
	HFD-MET	6	216.16±24.54
GTT_90	ND	5	135.± 39.02
	HFD	6	204.33±31.67
	HFD-FO	6	199.5±27.33

	HFD-CUR	6	177.83±30.78
	HFD-FO+CUR	5	152±25.94
	HFD-MET	6	174.16±26.64
GTT_120	ND	5	109±28.11
	HFD	6	164.5±29.79
	HFD-FO	6	179.66±22.42
	HFD-CUR	6	154.5±15.75
	HFD-FO+CUR	5	133.4±25.10
	HFD-MET	6	137.5±8.73

Uji one way anova

TES TOLERANSI GLUKOSA



Gambar 14. Kadar glukosa darah puasa pada masing-masing kelompok ND, HFD, HFD-FO, HFD-CUR, HFD-CUR+FO, dan HFD-MET (n = 5-6 mencit. * $p < 0.05$)

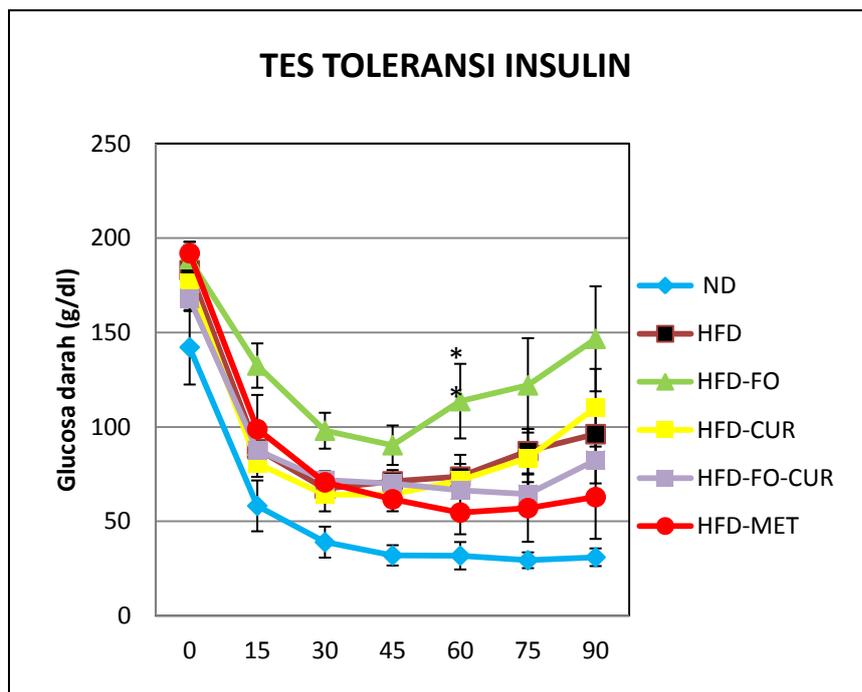
Pada pemeriksaan *Glucose Tolerance Test* (GTT) yang dipaparkan dalam tabel dan grafik didapatkan:

1. GTT menit 0 atau glukosa darah puasa selama 16 jam, terdapat perbedaan bermakna antara kelompok ND dibanding kelompok HFD dan HFD-FO, tapi pada kelompok ND dibanding kelompok HFD-Cur, HFD-Cur-FO dan HFD-met tidak didapatkan perbedaan yang bermakna.
2. GTT menit 30, didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok ND dibanding kelompok HFD dan HFD-FO.
3. GTT menit 60, didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok ND dibanding kelompok HFD dan HFD-FO. Didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok HFD dibanding kelompok ND dan HFD - FO-Cur ($*p < 0.05$)
4. GTT menit 90, didapatkan perbedaan bermakna antara ND dengan HFD dan HFD-FO.
5. GTT menit 120, didapatkan perbedaan bermakna antara ND dengan HFD, HFD-FO dan HFD-Cur. Perbedaan bermakna HFD hanya dengan ND, sedang antara HFD dan HFD-FO dan HFD-Cur tidak didapatkan perbedaan bermakna.

Tabel 5. Pemeriksaan tes toleransi insulin

		N	Mean±SD
ITT_0	ND	5	142.2±44.13
	HFD	6	183±36.55
	HFD-FO	6	188.83±22.78
	HFD-CUR	6	176.16±12.13
	HFD-FO+CUR	5	168±14.84
	HFD-MET	6	192±10.19
ITT_15	ND	5	58.2±30.07
	HFD	6	88.33±29.63
	HFD-FO	6	132.5±28.76
	HFD-CUR	6	80.66±17.36
	HFD-FO+CUR	5	87.6±19.75
	HFD-MET	6	98.83±44.37
ITT_30	ND	5	39±18.35
	HFD	6	67.33±10.25
	HFD-FO	6	98±23.3
	HFD-CUR	6	64.1667
	HFD-FO+CUR	5	71.8±21.73
	HFD-MET	6	70.66±13.98
ITT_45	ND	5	32±12.02
	HFD	6	71.16±14.72
	HFD-FO	6	90.33±25.57
	HFD-CUR	6	64.33±16.35
	HFD-FO+CUR	5	70±6.96
	HFD-MET	6	61.66±15.5
ITT_60	ND	5	31.8±16.22
	HFD	6	73.66±16.52
	HFD-FO	6	113.66±48.37
	HFD-CUR	6	71.66±33.23
	HFD-FO+CUR	5	66.4±5.22
	HFD-MET	6	54.66±28.16

ITT_75	ND	5	29.4±9.31
	HFD	6	87.16±28.85
	HFD-FO	6	122±61.25
	HFD-CUR	6	83.5±37.74
	HFD-FO+CUR	5	64.4±14.25
	HFD-MET	6	57±43.68
ITT_90	ND	5	31±10.44
	HFD	6	96.16±40.25
	HFD-FO	6	146.66±68.1
	HFD-CUR	6	110.16±50.38
	HFD-FO+CUR	5	82.4±27.5
	HFD-MET	6	62.83±54.18



Gambar 15. Kadar glukosa darah puasa setelah penyuntikan insulin intraperitoneal pada masing-masing kelompok diet ND, HFD, HFD-FO, HFD-CUR, HFD-CUR+FO, dan HFD-MET. (n = 5-6 mencit. ** $p < 0.01$).

Pada pemeriksaan *Insulin Tolerance Test* (ITT) yang dipaparkan dalam tabel dan grafik didapatkan:

1. ITT menit 0 atau glukosa darah puasa selama 4 jam berpuasa, didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok ND dengan HFD-Met.
2. ITT menit 15, didapatkan perbedaan bermakna antara ND dengan HFD-FO, sedangkan ND dan HFD tidak didapatkan perbedaan bermakna. Perbedaan bermakna tidak lagi didapatkan antara ND dan HFD-Met seperti yang terjadi pada menit 0.
3. ITT menit 30, didapatkan perbedaan bermakna antara ND dengan HFD-FO.
4. ITT menit 45, didapatkan perbedaan bermakna antara ND dengan kelompok lainnya, kecuali antara ND dengan HFD-met. Sedang untuk kelompok HFD didapatkan perbedaan bermakna hanya dengan kelompok ND, tidak didapatkan perbedaan bermakna dengan kelompok HFD lainnya.
5. ITT menit 60, didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok ND dan HFD-FO. Kelompok HFD-FO juga berbeda bermakna dengan kelompok HFD-Met. Kelompok HFD-FO tidak berbeda bermakna dengan kelompok HFD.
6. ITT menit 75, didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok ND dan HFD-FO.

7. ITT menit 90, didapatkan perbedaan bermakna antara kelompok ND dan HFD-FO.

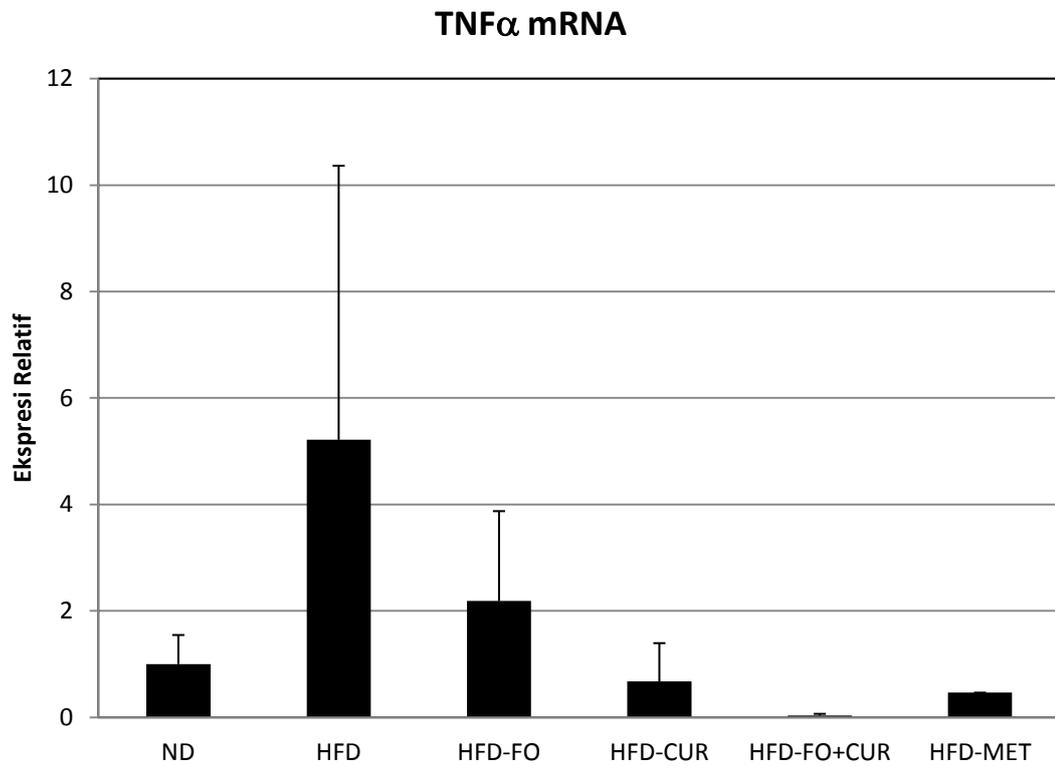
3. Ekspresi dan kadar TNF α

Tabel 6. Ekspresi gen TNF α pada pemeriksaan RT-PCR

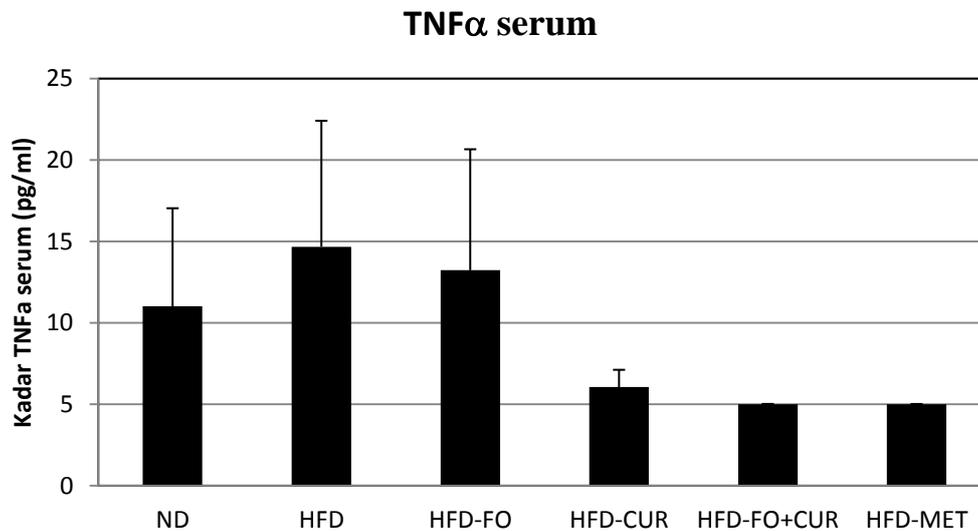
	n	Mean \pm SD
ND	5	1,000 \pm 0,547
HFD	6	5,210 \pm 5,150
HFD-FO	6	2,180 \pm 1,690
HFD-CUR	6	0,676 \pm 0,718
HFD-CUR-FO	5	0,032 \pm 0,032
HFD-MET	6	0,464 \pm 0,000

Tabel 7. Kadar TNF α pada pemeriksaan ELISA

	n	Mean \pm SD
ND	5	11,020 \pm 13,461
HFD	6	14,673 \pm 18,952
HFD-FO	6	13,234 \pm 18,190
HFD-CUR	6	6,059 \pm 2,595
HFD-CUR-FO	5	5,040 \pm 0,054
HFD-MET	6	5,033 \pm 0,051



Gambar 16. Ekspresi TNF α lemak intraabdomen (epididimis) ND = Normal Diet, HFD = High Fat Diet, HFD-FO = High Fat Diet-Fish oil, HFD-CUR = High Fat Diet-Curcumin, HFD-FO-CUR = High Fat Diet-Fish Oil-Curcumin, HFD-MET = High Fat Diet-Metformin.



Gambar 17. Kadar TNF α serum. ND = Normal Diet, HFD = High Fat Diet, HFD-FO = High Fat Diet-Fish oil, HFD-CUR = High Fat Diet-Curcumin, HFD-FO-CUR = High Fat Diet-Fish Oil-Curcumin, HFD-MET = High Fat Diet-Metformin.

Ekspresi TNF α jaringan lemak intraabdomen (epididimis) cenderung meningkat pada mencit kelompok diet tinggi lemak (HFD) dibanding kelompok normal diet (ND) dan sedikit menurun pada kelompok *fish oil* namun tidak signifikan. Diet tinggi lemak dengan *fish oil* (HFD-FO), kurkumin (HFD-CUR), kombinasi *fish oil* dan kurkumin (HFD-FO+CUR), dan metformin (HFD-MET) cenderung menurunkan ekspresi TNF α dibandingkan dengan diet tinggi lemak (HFD). Kecenderungan yang sama ditemukan pada kadar TNF α serum.

B. Pembahasan

Sampel pada penelitian ini adalah mencit tipe C57BL/6J yang merupakan mencit hasil mutasi dengan karakteristik memiliki onset obesitas yang sangat cepat, hiperfagia, hiperinsulinemia dan resistensi insulin dengan hiperglikemia. Mencit jenis ini merupakan salah satu mencit yang dapat diinduksi diabetes dengan diet. Mereka mewakili karakteristik pasien yang secara predisposisi genetik akan menderita diabetes tipe 2 jika mengalami obesitas. Penelitian yang dilakukan oleh Burcelin R dkk membuktikan bahwa pada mencit tipe C57BL/6J yang diberi diet tinggi lemak selama 9 bulan semuanya mengalami resistensi insulin (Haluzik M, 2004 ; Srinivasan K, 2007 ; Burcelin R, 2002)

1. Diet normal dan diet tinggi lemak

Secara umum obesitas berkaitan dengan keseimbangan energi positif di dalam tubuh. Keseimbangan energi ditentukan antara lain oleh jumlah dan komposisi karbohidrat, lemak dan protein. Komposisi makronutrien diet normal adalah karbohidrat 60-75%, protein 10-15% dan lemak 10-25%. Asupan lemak yang tinggi berperan terhadap proses metabolisme lemak dan dapat menginduksi obesitas. Pada penelitian ini diberikan diet tinggi lemak yaitu 45% kalori dari lemak untuk menginduksi obesitas. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa setelah 12 minggu mencit

dengan diet tinggi lemak memiliki berat badan yang lebih tinggi secara signifikan (29%) dari pada mencit dengan diet normal/ND (10% kalori dari lemak). Hal ini sesuai dengan penelitian Burcelin R dkk yang menemukan bahwa setelah pemberian diet selama 3 bulan pada mencit tipe C57BL/6J, berat badan meningkat 25% pada kelompok HFD dan hanya meningkat 11% pada kelompok ND (Almatsier, 2007 ; Burcelin R, 2002)

Pemeriksaan tes toleransi glukosa pada mencit dengan diet normal dan diet tinggi lemak menunjukkan perbedaan yang signifikan sejak menit 0 (glukosa darah puasa) sampai menit 120 setelah penyuntikan glukosa intraperitoneal. Untuk pemeriksaan tes toleransi insulin, perbedaan yang signifikan terjadi sejak menit 45 sampai menit 90. Dengan demikian dapat diambil kesimpulan bahwa diet tinggi lemak memicu terjadinya resistensi insulin pada mencit.

Penelitian pada tikus menunjukkan bahwa peningkatan jaringan adiposa yang tidak diimbangi dengan peningkatan jaringan pendukung seperti jaringan vaskuler akan mengakibatkan terjadinya hipoksia jaringan yang akan memicu ekspresi gen *hypoxia-inducible factor-1* dan gen inflamasi. Tekanan parsial oksigen pada jaringan adiposa subkutan berkorelasi negatif dengan adipositas pada manusia. Maka hipoksia dapat menjadi pemicu terjadinya inflamasi jaringan adiposa. Baik penelitian pada binatang maupun manusia mendukung peranan stres retikulum endoplasma jaringan adiposa sebagai penyebab lain terjadinya inflamasi pada obesitas.

Obesitas memicu terjadinya resistensi insulin pada otot, hati dan jaringan adiposa (Kalupahana NS, 2011).

Setelah makan atau infus lipid, konsentrasi asam lemak plasma meningkat dan asam lemak lalu ditransport ke dalam sel β melalui protein pengikat asam lemak (*fatty acidbinding protein*). Di dalam sitosol, asam lemak diubah menjadi turunan asam lemak koA, yang pada gilirannya mengganggu sekresi insulin melalui berbagai mekanisme : 1) peningkatan pembentukan asam fosfatidat dan diasilgliserol yang baik secara langsung atau tidak langsung menyebabkan eksositosis dari insulin yang disimpan dalam granul sekretorik, 2) perangsangan Ca^{2+} -ATP retikulum endoplasma yang mengakibatkan peningkatan konsentrasi kalsium intraseluler dan penguatan sekresi insulin, dan 3) penutupan kanal K^{+} -ATP yang menghasilkan depolarisasi dari membran sel β , yang menyebabkan peningkatan kalsium intraseluler dan perangsangan eksositosis dari granul yang mengandung insulin (Kantartzis, 2006 ; Park, 2006).

Paparan asam lemak menyebabkan gangguan dalam respons sel β terhadap glukosa, baik in vitro mau pun in vivo pada hewan dan manusia. Efek penghambatan asam lemak plasma yang meningkat secara kronis tampak lebih nyata pada individu dengan predisposisi genetik terhadap diabetes melitus tipe 2. Sebaliknya, penurunan konsentrasi asam lemak pada penderita diabetes tipe 2 memperbaiki sekresi insulin. Unger mengemukakan istilah lipotoksisitas untuk menggambarkan efek penghilangan (*deleterious effect*) dari peningkatan kronis kadar asam lemak

terhadap sekresi insulin oleh sel β pankreas. Pada tikus Zucker yang gemuk dan diabetes, peningkatan kronis kadar asam lemak plasma mula-mula akan mengakibatkan gangguan fisiologis dari sekresi insulin. Seiring dengan waktu, apoptosis sel β terjadi dan massa sel β akan berkurang sampai lebih dari 50%. Di dalam sel β , peningkatan asil koA lemak akan meningkatkan pembentukan seramide. Seramide, pada gilirannya, akan memperkuat pembentukan oksida nitrat yang bersifat mematikan bagi sel β . Pada sel yang menggunakan glukosa sebagai sumber energi, adalah pengambilan glukosa, bukannya metabolisme glukosa intraseluler, yang telah diimplikasikan sebagai langkah yang *rate-limiting* untuk terjadinya resistensi insulin yang diinduksi asam lemak. Asam lemak dan beberapa metabolit lain termasuk asil koA, seramid dan diasil gliserol bertindak sebagai molekul sinyaling yang mengaktifkan protein kinase seperti PKC, Jun Kinase dan penghambat faktor NF κ B kinase (IKK). Kinase-kinase ini dapat merusak sinyaling insulin dengan meningkatkan fosforilasi serin yang bersifat inhibisi dari IRS (Shulman 2000 ; Unger, 2000).

Ekspresi TNF α jaringan lemak intraabdomen (epididimis) cenderung meningkat pada mencit kelompok diet tinggi lemak dibanding kelompok diet normal. Kueht dkk (2008) melaporkan bahwa terjadi peningkatan TNF α pada wanita Afrika-Amerika dengan obesitas kelas III (BMI > 40,0 kg/m²). Hal ini terjadi akibat pengaktifan NF κ B yang memainkan peran penting sebagai promotor ekspresi gen proinflamasi yang menyertai stimulasi seluler oleh LPS (Kueht ML, 2009).

Peningkatan kadar TNF α dalam sirkulasi orang obes tidak hanya berkaitan dengan over produksi pada jaringan adiposa, namun juga merupakan efek sistemik leptin dan adipokin lainnya yang mungkin menginduksi sekresi TNF α dari makrofag dan limfosit (Nur Aslan, 2010).

Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar IL-6 dan mRNA TNF α adiposa pada subjek obes dan penurunan pada keadaan kehilangan berat badan. TNF α memfosforilasi S6K1 yang akan merusak resistensi insulin melalui fosforilasi serin IRS-1 yang kemudian akan menghambat aktivitas tirosin kinase pada reseptor insulin di adiposit dan hepatosit. TNF α juga menginduksi *Protein Tyrosine Phosphatase* (PTB)-1B, yang bertindak sebagai regulator negatif sinyal TNF, dan mencit yang kehilangan PTP-1B terproteksi dari resistensi insulin akibat TNF α . Penelitian juga menunjukkan bahwa blokade TNFR1 memproteksi tikus Wistar dari obesitas akibat diet dan resistensi insulin (Shehzad A, 2011).

2. Diet tinggi lemak dan kurkumin

Pada penelitian ini, kami tidak menemukan perbedaan yang signifikan terhadap perbaikan resistensi insulin pada kelompok yang mendapatkan diet tinggi lemak dan kurkumin meskipun kelompok ini memiliki kadar glukosa darah yang sedikit lebih rendah. Penelitian lain menunjukkan hasil yang berbeda secara signifikan. Penelitian yang dilakukan oleh Seo dkk dengan dosis 4 g/kg diet selama 28 minggu

menunjukkan bahwa kurkumin terbukti sebagai agen penurun glukosa darah dan anti oksidan yang potensial pada mencit diabetes. Mekanismenya melalui perbaikan resistensi insulin dengan peningkatan kadar leptin dan insulin plasma. Tampaknya kurkumin mempengaruhi pelepasan insulin melalui induksi pada aktivitas elektrik sel β pankreas. Insulin menginduksi sintesis dan sekresi leptin melalui regulasi metabolisme glukosa di adiposit. Kurkumin juga memperbaiki metabolisme glukosa dan lemak di hati dan otot, melalui regulasi enzim glukoneogenik dan glikolitik (Jain SK, 2009 ; Seo KI, 2008)

Weisberg dkk melaporkan setelah pemberian 3% kurkumin dalam diet pada tikus percobaan, dapat meningkatkan sensitivitas insulin dengan cara menekan infiltrasi makrofag pada jaringan adiposa putih (WAT), meningkatkan produksi adiponektin, menurunkan aktivitas *nuclear factor-kappa B* (NfK β), secara signifikan menurunkan ekspresi gen TNF- α , SOCS-3, MCP-1 dan CCR-2 pada mencit **ob/ob** setelah pemberian 10 minggu. Dari penelitian tikus yang lain, dapat ditarik kesimpulan kurkumin mempunyai efek anti inflamasi yang dapat menghambat produksi glukosa di sel hepar (Weisberg SP, 2008 ; Fujiwara H, 2008).

Penelitian lain yang dilakukan oleh Sharma dkk (2007) yang menunjukkan bahwa sifat anti inflamasi kurkumin dengan cara menghambat produksi IL-1, IL-6 dan TNF- α dan merangsang sekresi IL-10 melalui pengaruhnya terhadap makrofag (Sharma S, 2007).

Jain dkk (2009) melaporkan bahwa suplementasi kurkumin 100 mg/kg berat badan menurunkan produksi sitokin inflamasi termasuk TNF α , IL-6, IL-8 dan MCP-1 dari monosit yang diinduksi oleh kadar glukosa yang tinggi. Mereka juga menunjukkan bahwa kadar TNF α , IL-6, MCP-1, glukosa dan hemoglobin terglikosilasi dalam darah menurun pada tikus diabetes yang diberi diet kurkumin (Jain SK, 2009).

3. Diet tinggi lemak dan *fish oil*

Pada tes toleransi glukosa dan toleransi insulin diet tinggi lemak juga menyebabkan kadar gula darah yang lebih tinggi pada kelompok mencit tinggi lemak dibandingkan dengan mencit dengan diet normal. Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, kelompok ini justru memiliki kadar gula darah yang cenderung lebih tinggi bahkan dengan diet tinggi lemak kelompok lainnya. Hal ini sejalan dengan laporan sebelumnya bahwa *fish oil* dapat mengganggu toleransi glukosa dan cenderung meningkatkan kadar gula darah meskipun laporan lainnya menyebutkan tidak ada peningkatan gula darah dengan diet *fish oil* (Mostad, 2008 ; Galgani, 2008).

Eksresi gen dan kadar TNF α juga menurun pada kelompok ini. Hal ini sejalan dengan penelitian lain yang menunjukkan bahwa suplementasi dengan EPA dan DHA mengurangi inflamasi melalui penurunan kadar sitokin proinflamasi TNF α , IL-1 dan IL-6 dalam sirkulasi. Mekanisme ini mungkin terkait dengan kemampuannya untuk memodulasi faktor transkripsi. Sintesis sitokin diatur oleh NF κ B. Secara in vitro EPA

mencegah pengaktifan NF κ B yang diinduksi oleh LPS dan ekspresi TNF α mRNA (Duda MK, 2009)

Studi kultur sel menunjukkan bahwa EPA dan DHA dapat menghambat produksi IL-1 dan TNF α oleh monosit dan produksi IL-6 dan IL-8 oleh sel endotel vena. Pemberian *fish oil* menurunkan produksi *ex vivo* TNF α , IL-1, dan IL-6 oleh makrofag tikus. Suplementasi pada subjek yang sehat dengan *fish oil* yang mengandung > 2 g EPA+DHA / hari menurunkan produksi TNF α atau IL-1 atau IL-6 oleh sel mononuklear dalam beberapa penelitian. Caughey dkk melaporkan korelasi terbalik yang signifikan antara kandungan EPA sel mononuklear dan kemampuan sel-sel untuk memproduksi TNF α dan IL-1 sebagai respons terhadap endotoksin (Calder PC, 2006).

Kelley dkk menunjukkan bahwa 6 g DHA / hari selama 12 minggu menghasilkan penurunan produksi TNF α (20%) dan IL-1 (35%) oleh sel mononuklear yang distimulasi oleh endotoksin. Baik EPA dan DHA mengakibatkan penurunan konsentrasi TNF α plasma, meskipun efek DHA lebih kuat (reduksi 35% dibandingkan dengan 20% untuk EPA) (Calder PC, 2006).

Asam eikosapentanoat dan DHA dapat menghambat produksi IL-1 dan TNF α oleh monosit. Pada keadaan inflamasi, fosfolipase A2 menghidrolisis fosfolipid membran, yang menyediakan asam arakhidonat untuk produksi prostaglandin E2 (PGE2) dan leukotrien B4 (LTB4), suatu eikosanoid proinflamasi. Studi *invitro* menunjukkan bahwa PGE2 dan LTB4

mempunyai efek berlawanan dengan produksi sitokin proinflamasi *fish oil* mungkin merubah produksi sitokin proinflamasi secara langsung melalui kandungan omega 3, mengganti asam arakhidonat pada membran sel. Hal ini akan menurunkan produksi PGE2 dan LTB4 dan meningkatkan formasi PGE3 dan LTB5 (Calder PC, 2003).

Faktor genetik juga mempengaruhi produksi TNF α . Grimbale dkk (2002) melaporkan bahwa *fish oil* mampu menurunkan produksi TNF α pada subjek sehat melalui polimorfisme TNF α dan gen limfotoksin α (Grimble RF, 2002).

Penelitian yang dilakukan oleh Muurling M dkk yang dipublikasikan pada tahun 2003 menunjukkan bahwa mencit obes yang diberi diet *fish oil* mengalami penurunan kadar TNF α disertai penurunan berat badan. Penurunan berat badan diduga akibat berkurangnya massa lemak akibat meningkatnya lipolisis jaringan adiposa (Muurling M, 2003).

4. Diet tinggi lemak dan kombinasi kurkumin-*fish oil*

Pada pemeriksaan Tes Toleransi Glukosa kombinasi kurkumin dan *fish oil* menurunkan kadar gula pada tes toleransi glukosa yang konsisten dan signifikan pada menit ke-60 dan lebih rendah dibanding kontrol positif metformin sampai menit ke-90. Pada pemeriksaan Tes Toleransi Insulin menit 15 menunjukkan pola yang hampir sama dengan diet normal dan menit 30 polanya diatas diet normal dan metformin tetapi tidak berbeda signifikan dengan diet normal. Sehingga dapat disimpulkan bahwa diet

kombinasi kurkumin dan *fish oil* dapat memperbaiki resistensi insulin pada mencit obes. Perbaikan toleransi glukosa ini berhubungan dengan rendahnya ekspresi TNF α pada jaringan lemak intraabdominal pada kelompok ini. *Tumor necrosis factor α* telah dilaporkan meningkat ekspresinya pada jaringan lemak intraabdomen mencit dan pasien obesitas dan berhubungan dengan resistensi insulin (Hotamisligil dkk, 1993).

Efek kombinasi kurkumin dan *fish oil* telah diteliti oleh Jia Q dan dipublikasikan pada tahun 2011. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbaikan pada tikus yang diinduksi mengalami inflamasi usus melalui supresi NF κ B pada mukosa kolon. Penelitian lain oleh Ma QL menunjukkan bahwa pada mencit Alzheimer yang diberi kombinasi kurkumin dan *fish oil* selama sebulan mengalami perbaikan melalui inhibisi JNK. (Jia Q, 2011 ; Ma QL, 2009)

5. Diet tinggi lemak dan metformin

Pemeriksaan tes toleransi glukosa dan toleransi insulin pada kelompok ini memperlihatkan area bawah kurva mendekati pola yang ditunjukkan oleh diet normal. Ini menunjukkan sebagai kontrol positif, metformin dapat dijadikan patokan untuk melihat adanya perbaikan resistensi insulin. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Bikman BT dkk terhadap tikus obes dengan dosis 320 mg/kg/hari selama 4

minggu yang menunjukkan perbaikan sinyal insulin melalui pengaktifan AMPK (Bikman BT, 2010).

Ekspresi maupun kadar TNF α cenderung rendah pada kelompok ini. Penelitian yang dilakukan oleh Hattori Y dkk menunjukkan hasil yang sama. Metformin mengaktifkan AMPK dan menghambat pengaktifan NF κ B yang juga akan menghambat TNF α yang diinduksi oleh NF κ B serta I κ B kinase (Hattori Y, 2006).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Diet tinggi lemak dapat memicu terjadinya obesitas dan resistensi insulin.
2. Pemberian kurkumin dapat memperbaiki resistensi insulin dan cenderung menurunkan ekspresi dan kadar TNF α .
3. Pemberian *fish oil* cenderung menurunkan ekspresi dan kadar TNF α namun tidak memperbaiki resistensi insulin. Hal ini kemungkinan terjadi karena rendahnya dosis yang digunakan.
4. Kombinasi kurkumin dan *fish oil* memperbaiki resistensi insulin dibandingkan dengan diet tinggi lemak.
5. Kombinasi kurkumin dan *fish oil* cenderung menurunkan ekspresi dan kadar TNF α dibandingkan dengan diet tinggi lemak.

B. SARAN

1. Disarankan penelitian selanjutnya dengan dosis yang lebih bervariasi untuk mendapatkan dosis optimal.

2. Disarankan untuk dilakukan penelitian pada manusia untuk mengetahui efek dan dosis yang tepat untuk menurunkan ekspresi dan kadar TNF α serta memperbaiki resistensi insulin pada manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal BB, Bhatt ID, Ichikawa H, Ahn KS, Sethi G, Sandur SK, Natarajan C, Seeram N, Shishodia S. Curcumin — Biological and Medicinal Properties. In *Turmeric : The Genus Curcuma*. 2006 : 298 – 348.
- Aggarwal BB, Kumar A, Aggarwal MS, Shishodia S. Curcumin Derived from Turmeric (*Curcuma longa*) : a Spice for All Seasons. In : *Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention*. CRC Press. 2005 ; 350 - 79.
- Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: The Indian Solid Gold. *Cytokine Research Laboratory*. Houston. 2007 : 1 – 57.
- Aggarwal BB. Targeting Inflammation-Induced Obesity and Metabolic Diseases by Curcumin and Other Nutraceuticals. *Annu Rev Nutr* 2010 ; 21 (30) : 173 – 99.
- Balitbangkes. Status Gizi. Dalam : *Riset Kesehatan Dasar 2010*, Kementerian Kesehatan RI. Jakarta. 2010 ; 17 – 73.
- Bierhous A, Zhang Y, Quehenberger P, Luther T, Haase M, Müller M, Mackman N, Ziegler R, Nawroth PP. The Dietary Pigment Curcumin Reduces Endothelial Tissue Factor Gene Expression by Inhibiting Binding of AP-1 to the DNA and Activation of NF κ B. *Thromb. Haematostasis* 1997 ; 77: 772–82.
- Bikman BT, Zheng D, Kane DA, Anderson EJ, Woodlief TL, Price JW, Dohm GL, Neuffer PD, Cortright RN. Metformin Improves Insulin Signaling in Obese Rats via Reduced IKK β Action in a Fiber-Type Specific Manner. *Journal of Obesity* ; 2010
- Burcelin R, Crivelli V, Dacosta A, Tirelli AR, Thorens B. Heterogeneous Metabolic Adaptation of C57BL/6J Mice to High-Fat Diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 ; 282: E834 – E842.
- Calder PC. N-3 Polyunsaturated Fatty Acids Inflammation and Inflammatory Diseases. *Am J Clin Nutr*. 2006 ; 83(suppl) : 1505S – 19S.
- Calder PC. N-Polyunsaturated Fatty Acids and Inflammation : From Molecular Biology to the Clinic. *Lipids* 2003 ; 38(4) : 343 – 52.
- Calder PC. Review Omega-3 Fatty Acids and Inflammatory Processes. *Nutrients* 2010 ; 2 : 355 – 74.

- Calder PC. Review Polyunsaturated Fatty Acids and Inflammatory Processes : New Twists in an Old Tale. *Biochimie* 2009 ; 91 : 791 – 5.
- Cefalu WT. Insulin Resistance: Cellular and Clinical Concepts, E.B.M. 2001, Vol 226:13–26
- Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T. Adiponectin: More Than Just Another Fat Cell Hormone? *Diabetes Care*. 2003 ; 26 : 2442 - 50.
- Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK. Review Article Turmeric and curcumin : Biological actions and medicinal applications. *Current Science* 2004 ; 87 (1) : 44 – 53.
- Chen J. Review Prevention of Obesity – Associated Colon Cancer by Epigallocatechin – 3 Gallate and Curcumin. *Trans. Gastrointest Cancer*. 2012 ; 1 : 3.
- Chun K, Keum Y, Han S, Song Y, Kim S, Surh Y. Curcumin Inhibits Phorbol Ester-Induced Expression of Cyclooxygenase-2 in Mouse Skin Through Suppression of Extracellular Signal-Regulated Kinase Activity and NF-Kb Activation. *Carcinogenesis* 2003; 24 .9 .1515-1524.
- Díaz CMG, Enriquez SS, Romero EO, Lopez PMG, de la Mora PG, Ramirez BEB, Hita MG, Valle JFM. Establishment of a Cut-Point Value of Serum TNF- α Levels in the Metabolic Syndrome. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2009 ; 23 : 51 – 6.
- Duda MK, O'Shea KM, Stanley WC. Review ω – 3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation for The Treatment of Heart Failure : Mechanisms and Clinical Potential. *Cardiovasc. Research*. 2009 ; 84 : 33 – 41.
- Farmer JA. Obesity and Inflammation : Implication for Atherosclerosis In Oxidative Stress and Inflammatory Mechanisms in Obesity, Diabetes, and the Metabolic Syndrome. Ed. Packer L, Sies H. CRC Press. New York. 2008 ; 139 – 60.
- Federer W. Statistics and society: data collection and interpretation. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1991
- Fernandez-Real J-M, Castro A, Vazquez G. Adiponectin is associated with vascular function independent of insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 2004 ; 27 : 739 - 45.

- Flores GB, Pérez JCA, Roa RIL, Aguilar FJA, Macedo RG, Cruz M. Review Article Obesity as an inflammatory process. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2010 ; 67 : 88 – 96.
- Fujiwara H, Hosokawa M, Zhou X. Curcumin inhibits glucose production in isolated mice hepatocytes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2008 ;80 : 185 - 91.
- Galgani JE, Uauy RD, Aguirre CA, Díaz EO. Effect of the dietary fat quality on insulin sensitivity. *Br J Nutr.* 2008 ; 100 : 471–9.
- Giudetti AM, Cagnazzo R. Review Beneficial Effects of n-3 PUFA on Chronic Airway Inflammation Diseases. *Prostag. and Other Lipid Med.* 2012 ; 99 : 57 – 67.
- Gonzales AM, Orlando RA. Curcumin and Resveratrol Inhibit Nuclear Factor-Kappa β -Mediated Cytokine Expression in Adipocytes. *Nutr. Metab. (Lond.)* 2008 ; 5:17.
- Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr* 2006 ; 83 (suppl) : 461S – 5S.
- Grimble RF, Howell WM, O'Reilly G, Turner SJ, Markovic O, Hirrell S, East JM, Calder PC.. The Ability of Fish Oil to Suppress Tumor Necrosis Factor α Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells in Healthy Men is Associated with Polymorphisms in Genes that Influence Tumor Necrosis Factor α Production. *Am J Clin Nutr.* 2002 ; 76 ; 454 – 9.
- Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, Kasai K. Metformin Inhibits Cytokine-Induced Nuclear Factor κ B Activation via AMP-Activated Protein Kinase Activation in Vascular Endothelial Cells. *Hypertension* ; 47 : 1183 – 8.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased Adipose Tissue Expression on Tumor Necrosis Factor α in Human Obesity and Insulin Resistance. *J Clin Invest* 1995 ; 95 : 2409 – 15.
- Itokawa H, Hirayama F, Funakoshi K, Takeya K. Studies on the antitumor bisabolane sesquiterpenoids isolated from *Curcuma xanthorrhiza*. *Chem Pharm Bull* 1985 ; 33 : 3488 - 92.
- Jain SK, Rains J, Croad J, Larson B, Jones K. Curcumin Supplementation Lowers TNF- α , IL-6, IL-8, and MCP-1 Secretion in High Glucose-Treated Cultured Monocytes and Blood Levels of TNF- α , IL-6, MCP-1, Glucose, and Glycosylated Hemoglobin in Diabetic Rats. *Antioxid. Redox Signal* 2009 ; 11: 241 – 9.

- Jia Q, Ivanov I, Zlatev ZZ, Alaniz RC, Weeks BR, Callaway ES. Dietary fish oil and curcumin combine to modulate colonic cytokinetics and gene expression in dextran sodium sulphate-treated mice. *British Journal of Nutrition* 2011 ; 106 : 519–29.
- Kalupahana NS, Claycombe KJ, Moussa NM. (n3) Fatty Acid Alleviate Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance : Mechanistic Insights. *Adv. Nutr.* 2011 ; 2 : 304–16.
- Kantartzis K. The Relationships of Plasma Adiponectin with a Favorable Lipid Profile, Decreased Inflammation, and Less Ectopic Fat Accumulation Depend on Adiposity. *Clinical Chemistry* 2006 ; 52 : 1934 – 42.
- Kasuga M, Insulin resistance and pancreatic β cell failure, *J Clin Invest*; 2006;117:1780–7
- Kueht ML, McFarlin BK, Lee RE. Severely Obese have Greater LPS-Stimulated TNF- α Production than Normal Weight African-American Women. *Obesity* 2009 ; 17(3) : 447 – 51.
- Lee YH, Pratley RE. The evolving role of inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Current diabetes reports*. 2005 ; 5(1):70 - 5.
- Ma QL, Yang F, Rosario ER, Ubeda OJ, Beech W, Gant DJ. B-Amyloid Oligomers Induce Phosphorylation of Tau and Inactivation of Insulin Receptor Substrate via c-Jun N-Terminal Kinase Signaling: Suppression by Omega-3 Fatty Acids and Curcumin. *The Journal of Neuroscience* 2009 ; 29(28) : 9078 – 89.
- Markiewicz BZ, Janowska J, Glinianowicz MO, Zurakowski A. Serum concentrations of TNF- α and soluble TNF- α receptors in obesity. *International Journal of Obesity* 2000 ; 24 : 1392 – 5.
- Merentek E. Resistensi Insulin Pada Diabetes Melitus Tipe 2 Cermin Dunia Kedokteran No. 150, 2006 39
- Mohamed MK. Curcumin/Irbesartan Combination Improves Insulin Sensitivity and Ameliorates Serum Pro-inflammatory Cytokines levels in Diabetes Rat model. *Journal of American Science* 2010 ; 6 (11) : 1051 – 9.
- Mostad IL, Bjerve KS, Lydersen S, Grill V. Effects of marine n-3 fatty acid supplementation on lipoprotein subclasses measured by nuclear magnetic resonance in subjects with type II diabetes. *Eur J Clin Nutr.* 2008 ; 62 : 419–29.
- Mullaicharam AR, Maheswaran A. Review Pharmacological Effects of Curcumin. *Intern. J. Nutr., Pharm., Neurol. Dss.* 2012 ; 2 : 92 – 99.

- Muurling M, Mensink RP, Pijl H, Romijn JA, Havekes LM, Voshol PJ. A Fish Oil Diet does not Reverse Insulin Resistance despite Decrease Adipose Tissue TNF- α Protein Concentration in ApoE-3*Leiden Mice. *J. Nutr.* 2003 ; 133 : 3350 – 5.
- Nur Arslan, Erdur B, Aydin A. Hormones and Cytokines in Childhood Obesity. *Indian Pediatrics* 2010 ; 47 : 829 – 39.
- Park J. Increase in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Adipocytes Stimulates Oxidative Stress and Inflammatory Signals. *Diabetes* 2006 ; 55 : 2939 - 49.
- Qi C, Pekala PH. Mini Review Tumor Necrosis Factor α – Induced Insulin Resistance in Adipocytes. *P.S.E.B.M* 2000 ; 223 : 128–35.
- Rustam E, Atmasari I, Yanwirasti. Efek Anti Inflamasi Ekstrak Etanol Kunyit (*Curcuma domestica* Val.) pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi* 2007 ; 12 (2) : 112 – 5.
- Seo KI, Choi MS, Jung UJ, Kim HJ, Yeo J, Jeon SM, Lee MK. Effect of curcumin supplementation on blood glucose, plasma insulin, and glucose homeostasis related enzyme activities in diabetic db/db mice. *Mol. Nutr. Food Res* 2008 ; 52.
- Sharma S, Chopra K, Kulkarni SK, Agrewala JN. Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. *Clin Exp Immunol.* 2007 ; 147(1) : 155 - 163.
- Shehzad A, Ha T, Subhan F, Lee YS. Review New Mechanisms and The Anti-Inflammatory Role of Curcumin in Obesity and Obesity-Related Metabolic Diseases. *Eur. J. Nutr.* 2011 ; 50 : 151 – 61.
- Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000 ; 106 : 171 - 6.
- Soegih R. Tren obesitas dulu,sekarang dan yang akan datang. Obesitas, Permasalahan dan Terapi Praktis. Jakarta; 2009.
- Uehara S, Yasuda I, Akiyama K, Hiroshi M, Koichi T, Hideji I. Diarylheptanoids from the rhizome of *Curcuma xanthorrhiza* and *Alpinia officinarum*. *Chem Pharm Bull* 1987 ; 35 : 3298 - 304.
- Unger RH, Orci L. Lipotoxic Diseases of Non Adipose Tissues in Obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000 ; 24 : 528 – 32.
- Wang SL, Li Y, Wen Y, Chen YF, Na LX, Li ST, Sun CH. Curcumin, A Potential Inhibitor of Up-Regulation of TNF-alpha and IL-6 Induced by Palmitate in 3T3-L1 Adipocytes through NF-kappaB and JNK Pathway. *Biomedical and Environmental Sciences* 2009 ; 22 : 32 – 9.

- Weisberg SP, Leibel R, Tortoriello DV. Dietary Curcumin Significantly Improves Obesity-Associated Inflammation and Diabetes in Mouse Models of Diabesity. *Endocrinology* 2008 ; 149(7) : 3549 – 58.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 2003 ;112 : 1785 – 8.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003 ; 112 : 1796 – 802.
- Ye J, Keller JN. Regulation of energy metabolism by inflammation: A feedback response in obesity and calorie restriction. *Aging* 2010 ; 361 – 8.
- Yeung DL, Laquatra I. New Horizons in Nutrition. In : Heinz Handbook of Nutrition. Ninth edition. H.J Heinz Company. 2003 : 243.
- Zhang H, Park Y, Wu J, Chen XP, Lee S, Yang J, Dellsperger KC, Zhang C. Review Role of TNF- α in vascular dysfunction. *Clinical Science* 2009 ; 116 : 219–30.

Lampiran 1. Komposisi Diet Normal

Product #	D12450B	
	gm%	kcal%
Protein	19.2	20
Carbohydrate	67.3	70
Fat	4.3	10
	Total	100
	kcal/gm	
	3.85	
Ingredient	gm	kcal
Casein, 80 Mesh	200	800
L-Cystine	3	12
Corn Starch	315	1260
Maltodextrin 10	35	140
Sucrose	350	1400
Cellulose, BW200	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard*	20	180
Mineral Mix S10026	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H ₂ O	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
FD&C Yellow Dye #5	0.05	0
Total	1055.05	4057

Lampiran 2. Komposisi Diet Tinggi Lemak

Product #	D12451	
Protein	gm%	kcal%
	24	20
Carbohydrate	41	35
Fat	24	45
	Total	100
	kcal/gm	4.73
Ingredient	gm	kcal
Casein, 80 Mesh	200	800
L-Cystine	3	12
Corn Starch	72.8	291
Maltodextrin 10	100	400
Sucrose	172.8	691
Cellulose, BW200	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard*	177.5	1598
Mineral Mix S10026	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H ₂ O	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
FD&C Red Dye #40	0.05	0
Total	858.15	4057

Lampiran 3. Komposisi diet tinggi Lemak+ menhaden Fish Oil

Product #	D12451		New Diet		
	%	gm	kcal	gm	kcal
Protein		24	20	24	20
Carbohydrate		41	35	41	35
Fat		24	45	24	45
Total			100		100
kcal/gm		4.7		4.7	
Ingredient		gm	kcal	gm	kcal
Casein, 80 Mesh		200	800	200	800
L-Cystine		3	12	3	12
Corn Starch		72.8	291	72.8	291
Maltodextrin 10		100	400	100	400
Sucrose		172.8	691	172.8	691
Cellulose, BW200		50	0	50	0
Soybean Oil		25	225	25	225
Menhaden Oil		0	0	25.7	231
Lard		177.5	1598	151.8	1366
Mineral Mix S10026		10	0	10	0
DiCalcium Phosphate		13	0	13	0
Calcium Carbonate		5.5	0	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H2O		16.5	0	16.5	0
Vitamin Mix V10001		10	40	10	40
Choline Bitartrate		2	0	2	0
FD&C Yellow Dye #5		0	0	0	0
FD&C Red Dye #40		0.05	0	0	0
FD&C Blue Dye #1		0	0	0.05	0
Total		858.15	4057	858.15	4057

Lampiran 4. Rekomendasi Persetujuan Etik



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN**

Sekretariat : Lantai 3 Gedung Laboratorium Terpadu
JL. PERINTIS KEMERDEKAAN KAMPUS TAMALANREA KM.10, Makassar Telp. (0411)5780103, Fax (0411) 581431.
Contact person **dr. Agussalim Bukhari, PhD, SpGK** (HP. 081241850858), email: agussalimbukhari@yahoo.com.

REKOMENDASI PERSETUJUAN ETIK
Nomor : 0075 /H4.8.4.5.31/PP36-KOMETIK/2011

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, setelah melalui pembahasan dan penilaian, pada rapat tertanggal **29 Desember 2010**, telah memutuskan, protokol penelitian berjudul:

Perbandingan Efektifitas dari Fish Oil, Ekstrak Kurkuma dan Metformin pada Perbaikan Resistensi Insulin Mencit Obes

dengan Peneliti Utama: **dr. Mardiana**

No. Register

U	H	1	0	1	2	0	2	2	8
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

yang diterima pada tanggal : **20 Desember 2010**

Perbaikan diterima tanggal: **25 Januari 2011**

dapat disetujui untuk dilaksanakan di Animal Laboratorium dan Unit Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

Persetujuan Etik ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian.

Pada akhir penelitian, **laporan pelaksanaan penelitian** harus diserahkan kepada KEPK Fakultas Kedokteran Unhas. Jika ada perubahan protokol dan /atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Makassar, 26 Januari 2011

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fak. Kedokteran Unhas

Ketua

Prof. Dr. dr. Suryani As'ad, M.Sc, Sp.GK
NIP 19600504 1986 01 2 002

Sekretaris

dr. Agussalim B., MMed, Ph.D, SpGK
NIP 19700821 1999 03 1 001

Lampiran 5. Tabel konversi dosis manusia dan hewan

Lampiran

1) **Tabel Konversi Dosis Manusia dan Hewan**

	Mencit 20 gr	Tikus 200 gr	Marmut 400 gr	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 gr	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 gr	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmut 400 gr	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

(Suhardjono D. 1995. *Percobaan Hewan Laboratorium*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press, hal. 207)

2) **Tabel Daftar Volume Maksimal Larutan Sediaan Uji yang Dapat Diberikan pada Berbagai Hewan**

Jenis Hewan Uji	Volume Maksimal (ml) sesuai Jalur Pemberian				
	i.v.	i.m.	i.p.	s.c.	p.o.
Mencit (20-30 gr)	0,5	0,05	1,0	0,5-10	1,0
Tikus (100 gr)	1,0	0,1	2,5	2,5	5,0
Hamster (50 gr)	-	0,1	1-2	2,5	2,5
Marmot (250 gr)	-	0,25	2-5	5,0	10,0
Merpati (300 gr)	2,0	0,5	2,0	2,0	10,0
Kelinci (2,5 kg)	5-10	0,5	10-20	5-10	20,0
Kucing (3 kg)	5-10	1,0	10-20	5-10	50,0
Anjing (5 kg)	10-20	5,0	20-50	10,0	100,0

(Suhardjono D. 1995. *Percobaan Hewan Laboratorium*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press, hal. 207)

Keterangan

- i.v. : intravena
- i.m. : intramuscular
- i.p. : intraperitoneal
- s.c. : subcutan
- p.o. : peroral