

PENGARUH RESTRIKSI KALORI TERHADAP KADAR HIDROGEN PEROKSIDA DAN KADAR GLUKOSA DARAH PADA TIKUS TUA

(The Effect of Calorie Restriction to Serum Hydrogen Peroxide Level and Glucose Blood Level in Old Mice)

E. Harianja*, Anik Widijanti*, Putu Moda Arsana**, K. Handono*

ABSTRACT

Aging is a syndrome of progressive, universal and irreversible alterations. Endocrinology alterations in aging consist of insulin resistance, hyperinsulinemia, increase of hydrogen peroxide and glucose blood level. At the beginning of aging process the Pancreatic-cells produce more insulin in order to keep blood glucose within normal level. But the persistent of hyperglycemia condition caused the pancreatic-cells unable to produce adequate insulin due to internal factors or external factors. As this condition progress, would be disturbed fasting and post-prandial blood glucose (hyperglycemia). Besides insulin resistance, free radicals also increased as a consequence of failure compensation of cells in the body. The aim of this study is to determine that intermittent and daily calorie restriction in old male Wistar rats can reduce serum hydrogen peroxide, and blood glucose level. The method of this study was an experimental study with post-test control group design. Twenty four male Wistar rats about 12 months old, were divided into four equal groups and each group contain six rats: (i) ad libitum fed (control), (ii) 2-1 intermittent with 2 days fed and 1 day fast, (iii) 1-1 intermittent with 1 day fed and 1 day fast, and (iv) 40% continuous calorie restriction every day. Independent variable in this study was calorie intake and body weight. Dependent variables were hydrogen peroxide level and Blood glucose level. The difference of each group was analyzed with one way ANOVA and the least significant difference was analyzed by the use post hoc tests, using $p < 0.05$. The result of this study for hydrogen peroxide and blood glucose level in control group with experimental groups were $p < 0.000$ and $p < 0.001$. There was positive correlation between hydrogen peroxide level and blood glucose level $r = 0.791$. We conclude that calorie restriction decrease hydrogen peroxide level and as well as regulating of blood glucose level. The best one of this method is 40% calorie restriction.

Key words: aging, calorie restriction, hydrogen peroxide level, blood glucose level

PENDAHULUAN

Sejak dahulu manusia selalu berusaha untuk memperpanjang umurnya, untuk itu manusia melakukan berbagai cara guna mencegah proses penuaan. Kesadaran masyarakat dan kemajuan dunia kedokteran telah berhasil meningkatkan usia harapan hidup. Data Biro Pusat Statistik Indonesia tahun 1984 usia harapan hidup hanya 55,4 tahun, pada tahun 2004 meningkat menjadi 69 tahun. (Biro Pusat Statistik, 2004) Penuaan adalah suatu sindroma perubahan yang merusak, progresif, universal dan ireversibel. Persoalan besar tentang proses penuaan ini sudah diketahui dan hanya membutuhkan integrasi dari berbagai model dan teori untuk memahami proses penuaan yang normal. Penuaan merupakan suatu proses yang kompleks dan melibatkan banyak faktor (*multifactorial*), serta tidak dapat ditawar (*irreducibly*).¹

Perubahannya terjadi mulai dari tingkat molekul (DNA, protein, lipid) sampai pada tingkat seluler dan organ.² Di tinjau dari endokrinologi, pada

proses penuaan terjadi peningkatan kadar insulin dan glukosa,³ yang terjadi sel-sel tubuh menjadi kurang sensitif terhadap stimulasi insulin (resistensi insulin). Pada awal terjadinya resistensi insulin, sel beta pankreas akan mensekresi insulin lebih banyak untuk menjaga agar kadar glukosa darah tetap dalam batas normal. Akan tetapi apabila sel beta pankreas sendiri tidak dapat mengatasi gangguan, baik yang disebabkan oleh faktor internal (genetik) atau pun faktor eksternal (gangguan maturasi neonatal, kelaparan, proses penuaan, dan lain-lain) maka pada kondisi ini terjadi peningkatan kadar glukosa darah. Pada awalnya sel beta pankreas tidak mampu mensekresi insulin untuk merespon peningkatan kadar glukosa darah setelah makan (*post-prandial*) sehingga terjadi hiperglikemia *post-prandial*. Kemudian pada tahap selanjutnya juga terjadi gangguan sekresi insulin dalam keadaan puasa sehingga terjadi hiperglikemia puasa dan *postprandial*.⁴

Selain terjadinya keadaan resistensi insulin, pada proses penuaan juga terjadi peningkatan produksi

* Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

** Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

radikal bebas secara terus-menerus akibat kegagalan kompensasi sel tubuh, di mana radikal bebas merupakan hasil sampingan dari proses produksi energi sel, kerusakan oksidatif terjadi bila radikal bebas menyerang asam nukleat, DNA, protein dan lemak. Hal ini disebabkan karena radikal bebas adalah molekul yang sangat reaktif oleh karena memiliki elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluar sehingga dapat bereaksi dengan molekul di dalam tubuh dengan cara mengikat molekul tersebut.

Menurut R. Paul Robertrson⁵ kerusakan oksidatif pada hewan yang menua dapat diperlambat dengan restriksi kalori. Troen pada penelitiannya berpendapat restriksi kalori juga dilakukan dalam upaya untuk menghambat proses penuaan. Restriksi kalori adalah pengurangan jumlah kalori dalam makanan, tanpa membuatnya menjadi *undernutrition*.^{6,7} Intervensi yang sederhana adalah dengan mencapai ketersediaan suatu diet yang mengandung semua nutrisi dan vitamin esensial tapi secara bermakna dibatasi (30–70%) jumlah kalorinya.¹

Apakah perlakuan berbagai metode restriksi kalori akan menurunkan kadar radikal bebas (hidrogen peroksida) dan kadar glukosa darah sehingga terjadi hambatan proses penuaan?

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental sederhana dengan *post-test design* binatang coba tikus dibagi 4 kelompok secara random acak yaitu 1) kelompok kontrol dengan *diet ad libitum* 2) kelompok intermiten satu hari puasa, dua hari *ad libitum* 3) kelompok intermiten satu hari puasa, satu hari makan *ad libitum* 4) dan kelompok restriksi dengan diet yang direstriksi kalori tiap hari. Sampel penelitian adalah tikus *Rattus Novergicus strain Wistar* berumur 12 bulan dengan berat antara 250–300 gram dengan kondisi baik yang ditandai dengan gerakan aktif dan sehat. Pemilihan umur 12 bulan berdasarkan usia maksimal *strain* ini yaitu sampai 3 tahun (36 bulan). Proses penuaan dimulai pada usia 30 tahun pada manusia,⁸ dan bila diperkirakan usia maksimal manusia adalah 90 tahun, maka proses penuaan pada tikus yang dianalogikan dengan

manusia dimulai pada usia 1 tahun (12 bulan), pemilihan tikus *Rattus Novergicus strain Wistar* pada penelitian ini oleh karena kemiripannya dengan manusia.

Kriteria *inklusi* adalah tikus jantan, berumur 12 bulan, berat 250–300 gram dan sehat ditandai gerakan aktif yang sehat. Kriteria *eksklusi* adalah tikus selama penelitian tidak mau makan dan tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian.

Statistik yang digunakan adalah normalitas distribusinya diuji dengan *Kolmogorov-Smimov Goodness of Fit Test* untuk selanjutnya ditentukan statistik uji beda yang digunakan. Bila distribusi data normal, maka dipakai uji beda *One Way Anova*, kemudian dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) memakai *Post Hoc Test* untuk melihat kebermaknaan perbedaan antar kelompok. Semua pengujian dikerjakan dengan SPSS 13,0. Uji korelasi dilakukan dengan *Pearson Correlation*. Semua analisa statistik menggunakan nilai kemaknaan 0,05 ($p < 0,05$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini parameter-parameter yang diamati adalah tingkat konsumsi makanan tikus setiap hari, perubahan berat badan tikus, kadar glukosa darah pada akhir eksperimental dan kadar hidrogen peroksida dan kadar glukosa darah (tabel 1).

Hasil penghitungan uji normalitas distribusi untuk variabel asupan kalori, perubahan berat badan, kadar hidrogen peroksida dan kadar glukosa darah adalah normal yang ditunjukkan dengan angka probabilitas (p) > dari 0,05, sehingga pengujian selanjutnya digunakan statistik parametrik, yaitu *One Way ANOVA* antar perlakuan dan uji korelasi (r) antar variabel (tabel 2).

Perbedaan pola makan dan jumlah asupan kalori yang diberikan kepada masing-masing kelompok tikus, menghasilkan perbedaan jumlah asupan kalori yang masuk pada tiap-tiap kelompok. Perbedaan ini bermakna antara masing-masing kelompok, di mana kelompok kontrol memiliki jumlah asupan kalori yang masuk paling tinggi, kelompok intermiten 2-1 dan kelompok intermiten 1-1 memiliki jumlah asupan kalori yang hampir sama tetapi lebih rendah dari

Tabel 1. Asupan kalori, perubahan berat badan, kadar glukosa darah dan kadar hidrogen peroksida

Variabel	Kelompok Perlakuan			
	Kontrol	Inter 2-1	Inter 1-1	Restriksi
Kalori (kkal)	672,42 ± 123,53	537,64 ± 66,83	534,50 ± 50,42	455,90 ± 109,70
Perubahan	109,66 ± 20,02	55,8 ± 29,40	19,0 ± 18,12	-12,83 ± 17,42
Berat badan (gr)				
Glukosa (mg/dl)	255,17 ± 38,16	217,50 ± 37,27	272,50 ± 50,93	172,67 ± 42,46
Peroksida (mM)	69,09 ± 15,03	37,30 ± 8,24	57,63 ± 16,23	32,61 ± 1,24

Tabel 2. Hasil perbedaan variabel antar kelompok perlakuan

Variabel	Rata-rata (Mean)				Oneway Anova	
	Kontrol	Inter 2-1	Inter 1-1	Restriksi	F - hitung	Sig.
Kalori (kkl)	672.422	537.637	534.521	455.916	7.380	0,002
Perubahan berat badan (gr)	109.667	55.833	19.000	-12.833	35.020	0,000
Glukosa (mg/dl)	255.167	217.500	272.500	172.667	6.498	0,003
Peroksida (mM)	69,09	37,30	57,63	32,61	14.406	0,000

Nilai F tabel pada tingkat 5% dengan df 3, n=24 = 3.008 dan df 3 = 7.814

kelompok kontrol, sedangkan kelompok restriksi memiliki jumlah asupan kalori paling rendah. Hal ini sesuai dengan teori yang mengatakan bahwa perlakuan intermiten dalam jangka panjang juga akan mengurangi jumlah asupan kalori yang masuk.

Hasil pengukuran perbedaan perubahan berat badan rata-rata dari masing-masing kelompok juga menunjukkan perbedaan yang bermakna. Kelompok kontrol yang memiliki jumlah asupan kalori paling tinggi, mengalami kenaikan berat badan sebesar 109,66 gr atau 32,7% (rerata berat badan sebelum eksperimental 335 gr dan setelah eksperimental 444,66 gr). Kelompok intermiten 2-1 mengalami kenaikan berat badan sebesar 55,83 gr atau 11,75% (rerata berat badan sebelum eksperimental 335 gr dan setelah eksperimental 374,16 gr). Kelompok intermiten 1-1 mengalami kenaikan berat badan sebesar 19 gr atau 10,5% (rerata berat badan sebelum eksperimental 361,66 gr dan setelah eksperimental 380,667 gr). Kelompok restriksi 40% mengalami penurunan berat badan sebesar -12,83 gr atau -9,621% (rerata berat badan sebelum eksperimental 338,66 gr dan setelah eksperimental 325,83 gr). Pada penelitian ini perlakuan intermiten yang berbeda ternyata menghasilkan pengontrolan perubahan berat badan yang berbeda, di mana kelompok intermiten 1-1 mengontrol perubahan berat badan lebih baik dari pada kelompok intermiten 2-1. Hal ini sesuai dengan suatu penelitian yang menunjukkan bahwa puasa intermiten yang menghasilkan penurunan konsumsi makanan selama waktu tertentu, juga akan menurunkan perubahan berat badan, sedangkan pengurangan jumlah asupan kalori setiap hari sebanyak 30–40% dari *diet ad libitum* dapat mengurangi berat badan sebanyak 10% dari berat sebelum eksperimen atau sebesar 40–50% dibandingkan dengan kelompok kontrol.⁹

Kejadian yang mengikuti restriksi kalori dan turunnya berat badan pada individu obesitas dapat memperbaiki metabolisme kadar glukosa darah dengan cara memperbaiki kerja insulin. Dalam suatu penelitian dikatakan bahwa turunnya berat badan pada penderita diabetes tipe 2, bukan hanya menurunkan hiperglikemia puasa, tapi juga meningkatkan sensitifitas insulin (*uptake* glukosa)

pada jaringan perifer.¹⁰ Beberapa data penelitian meyakinkan bahwa restriksi kalori jangka panjang efektif untuk mencegah perkembangan resistensi insulin yang terjadi pada proses penuaan, yang dilakukan pada binatang coba kera, dengan akibat penurunan kadar glukosa darah.^{3,10} Pada penelitian ini perhitungan kadar glukosa darah setelah tikus dipuaskan selama 10 jam. Terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol, intermiten 1-1, intermiten 2-1 dan kelompok restriksi 40%. Hal ini disebabkan karena asupan kalori kelompok restriksi 40% lebih rendah dari kelompok intermiten 2-1 dan intermiten 1-1. Namun tidak tertutup kemungkinan bahwa tidak bermaknanya kadar glukosa darah ini karena pemeriksaan kadar glukosa hanya dilakukan sekali yaitu saat akhir uji coba, yang secara teoritis tidak mewakili kadar rerata glukosa darah selama 3 bulan.

Pada proses penuaan terjadi resistensi insulin. Resistensi insulin terjadi karena adanya tanggap biologi yang tidak normal terhadap pajanan insulin. Pada proses penuaan, terjadi peningkatan kadar radikal bebas yang disebabkan oleh kegagalan kompensasi tubuh.⁸ (Sehingga dikatakan bahwa pertambahan umur mengakibatkan peningkatan kadar radikal bebas).⁸

Peningkatan kadar glukosa darah akan meningkatkan *Glucose-dependent insulin secretion* (GDIS). Jalur yang digunakan untuk mengaktifasi GDIS secara dramatis dapat meningkatkan ROS dengan manifestasi stres oksidasi. Timbulnya ROS dan stres oksidasi oleh aktifasi GDIS sendiri dapat memiliki peran ganda yaitu sebagai tahap awal dalam meningkatkan kecepatan sekresi insulin dan juga kematian sel beta pankreas secara progresif.¹¹ Jika terjadi kekelebihan berat badan dan atau menjadi resistensi insulin bermakna sejalan dengan penuaan, maka tuntutan insulin yang disekresi akan lebih banyak lagi dari sel pankreas. Aktifitas fisik dan restriksi kalori, menurunkan kebutuhan akan insulin sehingga pankreas tidak perlu beradaptasi dengan memperbesar massa dan tidak terjadi peningkatan GDIS. Kedua hal ini akan menyebabkan ROS.¹²

Terdapat perbedaan yang bermakna pada kadar hidrogen peroksida antara kelompok perlakuan

dengan kelompok kontrol, di mana kelompok perlakuan memiliki kadar hidrogen peroksida lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol.

Perbedaan ini menggambarkan kadar hidrogen peroksida pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Kadar hidrogen yang paling rendah diantara kelompok perlakuan adalah kelompok restriksi 40%.^{5,13} Bila di lihat hasil beda nyata terkecil dari keempat kelompok ini, maka perbandingan kadar hidrogen peroksida antara kelompok intermiten 2-1 dan kontrol memiliki perbedaan kadar secara bermakna, sedangkan pada kelompok intermiten 2-1 dibandingkan dengan kelompok intermiten 1-1 tidak bermakna, hal ini dapat disebabkan karena pada kelompok intermiten 2-1 ini jumlah asupan kalori juga tidak berbeda bermakna. Hasil penelitian ini nyata terlihat bahwa penurunan kadar hidrogen peroksida dapat dicapai dengan berbagai macam metode restriksi yaitu intermiten 2-1, dan intermiten 1-1 dan restriksi 40%, kadar hidrogen peroksida kelompok restriksi 40% kalori lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan lain. Hal ini menunjukkan bahwa apapun metode perlakuan yang dilakukan, akan terjadi penurunan kadar hidrogen peroksida. Secara teoritis beberapa parameter lain dapat diperiksa untuk menunjukkan adanya kadar radikal bebas (ROS dan NOS), antara lain *Gluthation hidrogen peroksidase*, *Nitrit Oxide*, *MDA*, tetapi pada penelitian ini tidak dilakukan.¹²

Nilai koefisien korelasi kadar hidrogen peroksida dengan kadar glukosa darah sebesar 0,791, nilai ini lebih besar dari r tabel (0,791 > 0,404) dengan nilai p sebesar 0,005 (0,005 < 0,05). Hal ini menunjukkan bahwa ada korelasi yang bermakna antara kadar hidrogen peroksida dengan kadar glukosa darah dan berkorelasi positif, artinya jika kadar hidrogen peroksida mengalami penurunan, akan terjadi kecenderungan penurunan kadar glukosa darah dan demikian pula sebaliknya.⁶

Penggunaan uji korelasi didapatkan juga korelasi antara kadar hidrogen peroksida dan jumlah asupan kalori, korelasi antara kadar hidrogen peroksida dan perubahan berat badan. Didapatkan korelasi yang bermakna antara kadar hidrogen peroksida dan jumlah asupan kalori, artinya penurunan asupan kalori akan mengakibatkan penurunan jumlah kadar hidrogen peroksida. Demikian pula korelasi yang bermakna antara kadar hidrogen peroksida dan jumlah perubahan berat badan, artinya penurunan berat badan akan mengakibatkan penurunan jumlah kadar hidrogen peroksida.^{5,13}

SIMPULAN

Pengurangan jumlah kalori dalam jangka waktu panjang (12 minggu) dengan metode intermiten maupun restriksi berkelanjutan pada tikus dewasa tua akan menurunkan kadar hidrogen peroksida ($p < 0,000$) dan terbaik adalah restriksi kalori 40%, dan pengurangan jumlah kalori dalam jangka waktu lama (12 minggu) dengan metode intermiten maupun restriksi kalori 40% pada tikus dewasa tua akan menurunkan kadar glukosa darah ($p < 0,001$) dan yang terbaik adalah restriksi kalori 40%. Terdapat korelasi kuat antara kadar hidrogen peroksida dengan kadar glukosa darah ($r > r_{\text{tabel}}$ 0,404 dan $p < 0,005$).

DAFTAR PUSTAKA

1. Briant T, Weinert, Timiras PS. Physiology of aging. Invited review: Theories of aging. J Appl Physiol. 2003; 95: 1706–16.
2. Best B. Mechanism of Aging. [article on line] 2004. Available from: <http://www.benbest.com/lifeex/aging.html> (accessed Februari 26, 2005).
3. Heilbronn LK, Ravussin E. Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. Am J Clin Nutr. 2003; 78: 361–9.
4. Jean – Claude Henquin. Cell biology of insulin secretion. In: Joslin's editors C. Ronald Kahn, Gordon C. weir, Geogre L. King. Diabetes Mellitus, 14th. Lippincott Williams & Wilkins, 2005; 83–107.
5. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahasi. Perspective in diabetes. Glukosa toxicity in b-cell: type 2 diabetes. Good radicals gone bad and the glutathion connection. Diabetes. 2003; 52: 581–7.
6. Koubova J, Guarente L. How does calorie restriction work ?. Genes & Development; 2003; 17: 313–21.
7. Troen BR. The biology of aging. The mount sinai journal of medicine. 2003; 70 (1): 3–22.
8. Moller N, Gormsen L, Fuglsang J, Gjedsted J. Effect of aging on insulin secretion and action. Horm Res. 2003; 60(suppl 1): 102–4.
9. Anson RM, Guo Z, De Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie asupan. PNAS. 2003; 13(100): 6216–20.
10. Grant GF, Parr T. Decline of Life's Energy Theory of Aging. Restoration of anabolic and regulatory processes. Available from: <http://ati.uta.edu/DOLE2.pdf>. (accessed Februari 26, 2005)
11. Fridlyand LE, Philipson LH. Perspective in Diabetes. Does the glucose-dependent insulin secretion mechanism itself cause oxidative in pancreatic b-cell. Diabetes. 2004; 53: 1942–48.
12. Reaven EP, Reaven GM. Structure and function changes in the endocrine pancreas of aging rats with reference to the modulating effects of exercise and caloric restriction. J. Clin. Invest. 1981; 68: 75–84.
13. Biarnes M, Montolio M, Nacher V, Raurell M, Soler J, Montanya E. β -Cell Death and mass in syngeneically transplanted islet exposed to short-and long-term hyperglycemia. Diabetes. 2002; 51: 66–72.