

**PENGARUH FRUKTOSA TERHADAP KADAR LEPTIN
SERUM *POSTPRANDIAL*: DAMPAKNYA TERHADAP
ASUPAN MAKANAN DAN BERAT BADAN TIKUS**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Biomedik

**TRINOVITA ANDRAINI
NPM : 0706304460**



**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN FISILOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
JAKARTA**

JUNI 2010

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri
dan semua sumber, baik yang dikutip maupun dirujuk,
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Trinovita Andraini

NPM : 0706304460

Tanda Tangan : The image shows a handwritten signature in black ink over a rectangular official stamp. The stamp contains the text 'METERAI TEMPEL' at the top, followed by '24EB7AAF190362702' in the center, and '6000' and 'DJP' at the bottom. To the right of the stamp is a small emblem of a Garuda bird.

Tanggal : 22 Juni 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh:

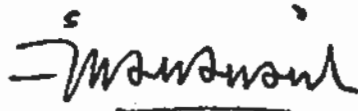
Nama : Trinovita Andraini
NPM : 0706304460
Program Studi : Ilmu Biomedik kekhususan Fisiologi
Judul Tesis : Pengaruh Fruktosa Terhadap Kadar Leptin Serum
Postprandial: dan Dampaknya Terhadap Asupan
Makanan dan Berat Badan Tikus

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : dr. H. M. Djauhari Widjajakusumah, PFK 
Pembimbing II : Dr. dr. Sri Widia A Jusman, MS 
Penguji I : Dr. dr. Ermita I .Ilyas, MS 
Penguji II : dr. Ani Retno Prijanti, MS 
Penguji III : dr. Victor Tambunan, MS, SpGK 

Ditetapkan di : Jakarta
Tanggal : Juni 2010
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik



(Dr. rer. Physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi)

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini, dan dapat memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Magister Ilmu Biomedik kekhususan Fisiologi Program Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa dalam penelitian dan penulisan tesis ini masih banyak sekali keterbatasan dan kekurangannya, tetapi penulis berharap semoga tesis ini dapat memberikan manfaat dan menjadi bahan pertimbangan dan informasi bagi pihak-pihak yang memerlukannya. Penulis menerima masukan dan saran yang berarti untuk perbaikan tulisan ini.

Melalui pengantar ini, saya menyampaikan penghargaan dan ucapan terimakasih kepada:

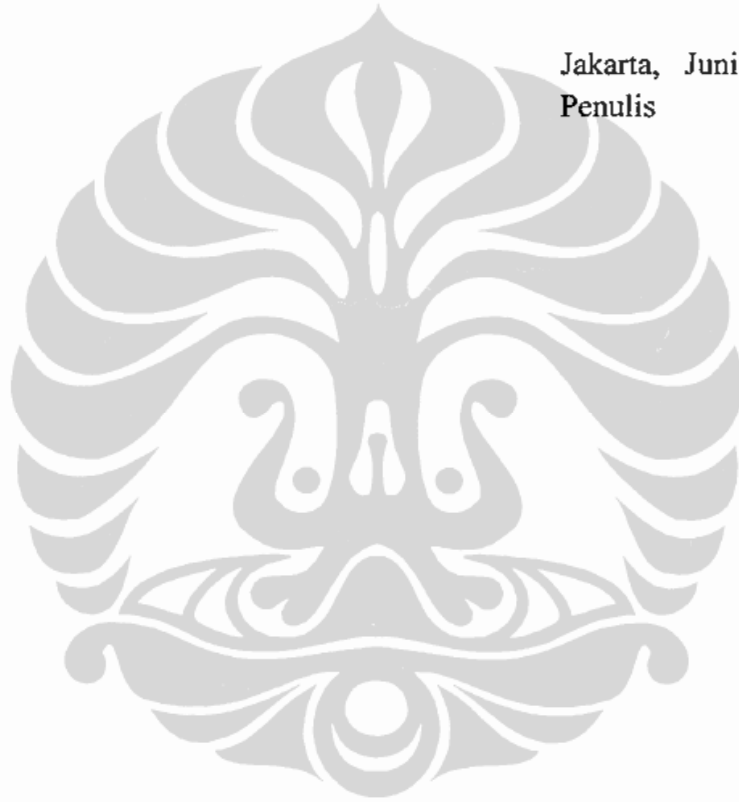
- (1) Dr. H. Muhammad Djauhari Widjajakusumah, PFK sebagai pembimbing I, yang dengan sabar memberikan bimbingan dan arahan kepada saya dalam proses penulisan proposal sampai penyusunan tesis ini dan terus memberikan semangat kepada saya dalam menyelesaikan penelitian ini. Demikian juga kepada dr. Sri Widia A. Jusman, MS sebagai pembimbing II yang telah meluangkan waktu memberikan bimbingan dalam metode pelaksanaan penelitian ini.
- (2) Kepala Laboratorium Hewan Percobaan Badan Litbang Kes Kementrian Kesehatan RI yang telah memberikan kesempatan dan mengijinkan penulis untuk menggunakan semua fasilitas yang digunakan untuk penelitian.
- (3) Kepala Makmal Imunoendokrinologi Terpadu yang telah memberikan kesempatan dan mengijinkan penulis menggunakan fasilitas di laboratorium hormonal untuk melakukan pemeriksaan hormon leptin.

- (4) PT. Genecraftlab yang membantu penulis menyediakan KIT untuk pemeriksaan hormon leptin.
- (5) Laboratorium Departemen Biokimia FK UI, yang telah membantu pengadaan larutan fruktosa dan glukosa.
- (6) Dr. dr. Ermita Ilyas, MS, Ketua Departemen Fisiologi FK UI, atas kesempatan dan bimbingan kepada saya untuk belajar di bagian fisiologi FK UI
- (7) dr. Nurhadi Ibrahim, PhD, ketua kekhususan fisiologi yang senantiasa memperhatikan kemajuan proses pendidikan dan penelitian penulis. Juga kepada seluruh staf akademik Departemen Fisiologi FK UI yang menuntun dan mengarahkan penulis untuk belajar aktif, dan mengantarkan penulis hingga dapat menyelesaikan pendidikan. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada seluruh staf administrasi dan umum yang turut membantu dan memperlancar proses belajar penulis di kekhususan Fisiologi.
- (8) Dekan FK Unsri dan seluruh staf pengajar bagian Fisiologi FK Unsri yang telah memberikan kesempatan dan mengizinkan penulis untuk melanjutkan pendidikan di Departemen Fisiologi FK UI. Tak lupa pula penulis ucapkan terimakasih kepada dr. Irfannudin, SpKO yang senantiasa memberikan arahan dan semangat kepada penulis untuk segera menyelesaikan pendidikan.
- (9) Teman satu angkatan dr. Sophie Yolanda atas diskusi dan dukungannya kepada penulis dalam menyelesaikan pendidikan.
- (10) Kepada suami dan anak-anak tercinta, orang tua dan mertua, yang senantiasa memberikan semangat, mengizinkan dan mendoakan penulis untuk menyelesaikan pendidikan.

(11) Kepada semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu, tidak ada yang dapat saya berikan selain ucapan terimakasih atas bantuan, kerjasama dan doanya selama penulis menyelesaikan pendidikan.

Akhirnya penulis berdoa semoga Allah, SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan ridho-Nya, serta membalas semua kebaikan yang telah diberikan kepada penulis, Amin Ya Robbalamin.

Jakarta, Juni 2010
Penulis



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Trinovita Andraini
NPM : 0607304460
Program Studi : Ilmu Biomedik
Departemen : Fisiologi
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Tesis

Demi mengembangkan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia *Hak Bebas Royalti Noneksklusif (Non-exclusive Royalty-free Right)* atas karya ilmu ilmiah saya yang berjudul:

Pengaruh Fruktosa Terhadap Kadar Leptin Serum *Postprandial*: Dampaknya Terhadap Asupan Makanan dan Berat Badan Tikus

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengolah dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : Juni 2010
Yang menyatakan



(Trinovita Andraini)

ABSTRAK

Nama : Trinovita Andraini
Program studi : Magister Ilmu Biomedik Kekhususan Fisiologi FKUI
Judul : Pengaruh Fruktosa Terhadap Kadar Leptin Serum *Postprandial*:
Dampaknya Terhadap Asupan Makanan dan Berat Badan
Tikus

Latar Belakang: Saat ini, perubahan pola diet, terutama pola diet Barat, yang banyak mengonsumsi makanan siap saji dan minuman ringan menyebabkan peningkatan konsumsi harian fruktosa yang bermakna, bahkan mencapai 85-100 gram per hari. Data di Amerika Serikat, menunjukkan bahwa seiring terus meningkatnya konsumsi HFCS dan sukrosa (terutama dari minuman ringan) juga terjadi peningkatan prevalensi obesitas. Peningkatan konsumsi fruktosa tampaknya merupakan salah satu faktor paling penting yang berkontribusi terjadinya epidemi obesitas karena dua alasan, yaitu proses metabolisme fruktosa terjadi lebih cepat dan menyediakan substrat lipogenik yang lebih banyak pada stadium *postprandial* dan fruktosa dapat menyebabkan *overconsumption* karena konsumsi fruktosa tidak menyebabkan peningkatan hormon leptin dan insulin *postprandial*. Leptin dan insulin merupakan sinyal adiposa jangka panjang yang bekerja pada hipotalamus dan mengatur jumlah asupan makanan dan *energy expenditure* sehingga mempengaruhi berat badan seseorang.

Tujuan: Menganalisis pengaruh diet tinggi fruktosa terhadap kadar leptin serum *postprandial* tikus dan pengaruhnya terhadap asupan makanan dan berat badan.

Metode: Studi eksperimental secara *in vivo* pada tiga kelompok tikus jantan spesies *Sprague-Dawley*, berusia 8-10 minggu dengan berat badan berkisar antara 150-200 gram. Tikus diberikan perlakuan selama 15 hari diberi larutan kontrol atau larutan glukosa 43% dengan dosis 2mL/100 g BB/hari, atau fruktosa 43% dengan dosis 2 mL/100 g BB/hari dan makanan standar. Parameter yang diukur adalah jumlah asupan makanan, penambahan berat badan dan kadar hormon leptin *postprandial* setelah 15 hari perlakuan dengan metode ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Hasil: Kadar leptin serum *postprandial* tikus lebih tinggi secara bermakna pada kelompok perlakuan glukosa tetapi tidak berbeda bermakna pada kelompok perlakuan fruktosa dibanding kelompok kontrol, sedangkan jumlah asupan makanan pada kelompok perlakuan fruktosa lebih rendah daripada kelompok glukosa dan penambahan berat badan pada kelompok perlakuan fruktosa lebih tinggi daripada kelompok perlakuan glukosa tetapi tidak berbeda bermakna

Kesimpulan: Fruktosa memiliki kecenderungan menyebabkan kadar leptin *postprandial* lebih rendah dari glukosa dan memiliki kecenderungan menyebabkan penurunan asupan makanan dan peningkatan berat badan yang lebih besar dibandingkan glukosa.

Kata Kunci: Leptin, asupan makanan, berat badan, fruktosa, glukosa

**EFFECTS OF FRUCTOSE ON POSTPRANDIAL LEPTIN SERUM LEVEL:
ITS EFFECT ON FOOD INTAKE AND BODY WEIGHT IN RAT**

Trinovita Andraini

Magister Programme of Biomedical Science in Physiology

Faculty of Medicine University of Indonesia

Jakarta, June 2010

Abstract

Background: Nowadays, due to changing on diet, especially Western diet which consumes fast food and soft drink cause increasing daily consumption of fructose, even to achieve 85-100 gram per day. In US, data shows that the more to consume HFCS and sucrose (especially soft drink), the more to increase obesity. The increase of fructose consumption appears to be one crucial factor which contributes obesity epidemic due to two reasons as follows: fructose metabolism process happens faster and provides more lipogenic substrate on postprandial stadium and fructose can cause overconsumption because fructose consumption is not the same as glucose which does not cause increasing leptin hormone and insulin postprandial. Leptin and insulin are the long term adiposity signal which work on hipothalamus and manage amount of consumption food and energy expenditure so it will influence body weight.

Objective: To understand the influence of high fructose diet on postprandial level of serum leptin and its influence to daily food intake and body weight in rat.

Method: Invivo experimental study on three groups of male rats of *Sprague-Dawley* species, age between 8-10 weeks with body weight around 150-200 gram. Rats are given treatment for 15 days and given control liquid or glucose liquid 43% with dose of 2 mL/100gr body weight/day or fructose 43% with dose of 2 mL/100 gr body weight/day and standard food. The measured Parameter are amount of daily food intake, increasing of body weight and postprandial serum leptin level after 15 days of treatment with ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) method.

Result: The rats postprandial serum leptin level is higher significantly on glucose treatment groups but it is not different to fructose treatment group compared to control group. In addition, amount of daily food intake on fructose treatment group is lower than that of glucose group and gaining body weight of fructose treatment group is higher than that of glucose treatment but the different between them is not significant.

Conclusion: Fructose tends to cause degree of postprandial serum leptin level lower than glucose and tend to cause decreasing consumption of food and gaining body weight higher than glucose.

Keywords: Leptin, food intake, body weight, fructose and glucose

DAFTAR ISI

| | |
|---|------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS | ii |
| LEMBAR PENGESAHAN | iii |
| KATA PENGANTAR | iv |
| LEMBAR PESETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH | vii |
| ABSTRAK | viii |
| ABSTRACT | ix |
| DAFTAR ISI | x |
| DAFTAR GAMBAR | xiii |
| DAFTAR TABEL | xiv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xv |
| DAFTAR SINGKATAN | xvi |
| | |
| BAB I. PENDAHULUAN | |
| 1. Latar Belakang | 1 |
| 2. Rumusan Masalah | 3 |
| 3. Hipotesis Penelitian | 3 |
| 4. Tujuan Penelitian | 4 |
| 5. Manfaat Penelitian | 4 |
| | |
| BAB II. TINJAUAN PUSTAKA | |
| 1. Fisiologi Pengaturan Perilaku Makan Dan Berat Badan | 5 |
| 1.1 Sinyal Perifer Yang Menentukan Regulasi Perilaku Makan Dan Berat Badan | 5 |
| 1.2 Peran Hipotalamus Pada Regulasi Perilaku Makan Dan Berat Badan | 7 |
| a. Integrasi Sinyal Endokrin..... | 7 |
| b. Integrasi Sinyal Mekanik Dan Kimia Saluran Cerna, Dan Sinyal Metabolik Dari Hati | 10 |
| 1.3 Hormon Leptin | 11 |
| 2. Pengaruh Fruktosa Terhadap Regulasi Nafsu Makan Dan Berat Badan | 17 |
| 2.1 Struktur Kimia Dan Sumber Fruktosa | 17 |
| 2.2 Transporter Fruktosa | 17 |
| 2.3 Proses Pencernaan Dan Absorpsi Fruktosa | 18 |

| | |
|--|----|
| 2.4 Metabolisme Fruktosa | 19 |
| a. Metabolisme Fruktosa Oleh Sel Hati | 20 |
| b. Metabolisme Fruktosa Oleh Sel Adiposa | 22 |
| 3. Pengaruh Konsumsi Fruktosa Terhadap Insulin Dan Leptin | 23 |
| 4. Kerangka Teori Penelitian | 26 |
| 5. Kerangka Konsep Penelitian | 27 |

BAB III. METODE PENELITIAN

| | |
|--|----|
| 1. Design Penelitian | 28 |
| 2. Tempat dan Waktu Penelitian | 28 |
| 3. Variabel dan Sampel Penelitian | 29 |
| 4. Bahan dan Alat Penelitian | 29 |
| 5. Alur Penelitian | 31 |
| 6. Cara Kerja | 32 |
| 6.1 Seleksi Hewan Uji (kriteria Inklusi) | 32 |
| 6.2 Penanganan dan Prosedur Pemeliharaan Hewan Uji | 32 |
| 6.3 Pengambilan darah Tikus | 33 |
| 6.4 Pembuatan Serum..... | 34 |
| 6.5 Pembuatan Larutan Glukosa dan Fruktosa | 34 |
| 6.6 Pemeriksaan Hormon Leptin | 34 |
| 6.7 Batasan Operasional | 36 |

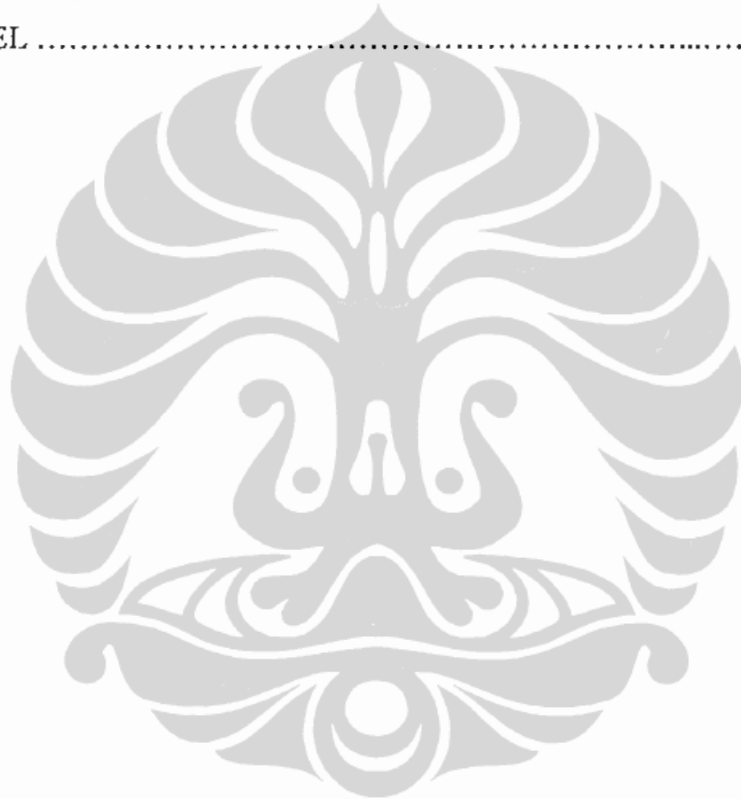
BAB IV. HASIL PENELITIAN

| | |
|---|----|
| 1. Rata-rata Kadar Hormon Leptin Postprandial | 37 |
| 2. Rata-rata Asupan Makanan Perhari | 37 |
| 3. Rata-rata Pertambahan Berat Badan Tikus Setelah 15 hari Perlakuan | 38 |

BAB V. PEMBAHASAN

| | |
|---|----|
| 1. Rata-rata Kadar Hormon Leptin Postprandial | 42 |
| 2. Rata-rata Asupan Makanan Perhari | 45 |
| 3. Rata-rata Pertambahan Berat Badan Tikus Setelah 15 hari Perlakuan | 46 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN | |
| A. Kesimpulan | 49 |
| B. Saran | 50 |
| | |
| DAFTAR PUSTAKA | 51 |
| LAMPIRAN | 55 |
| KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK | 78 |
| DAFTAR RIWAYAT HIDUP | 79 |
| DRAFT ARTIKEL | 80 |



DAFTAR GAMBAR

| | | |
|------------|--|----|
| Gambar 1. | Integrasi sinyal endokrin dalam hipotalamus yg berperan dalam regulasi asupan makan dan berat badan | 10 |
| Gambar 2. | Sinyal perifer dari saluran cerna dan hati ditransmisi melalui nervus vagus atau afferen sistem saraf simpatis servikal ke nukleus traktus solitarius kemudian berintegrasi dengan sinyal dari hipotalamus untuk mengakhiri makan..... | 11 |
| Gambar 3. | Pengaruh ukuran sel adiposa, status nutrisi akut dan hormonal pada simpanan dan sekresi leptin | 13 |
| Gambar 4. | Jalur pensinyalan hormon dan nutrien memodulasi translasi leptin | 16 |
| Gambar 5. | Struktur kimia fruktosa | 17 |
| Gambar 6. | Stimulasi GLUT4 oleh Insulin | 18 |
| Gambar 7. | Proses Absorpsi Karbohidrat | 19 |
| Gambar 8. | Metabolisme fruktosa dalam sel hati dan sel otot | 20 |
| Gambar 9. | Regulasi aktifitas glukokinase | 22 |
| Gambar 10. | Mekanisme sekresi insulin sebagai respon meningkatnya glukosa Darah | 24 |
| Gambar 11. | Ringkasan perbedaan fruktosa dan glukosa terhadap sinyal endokrin regulasi asupan makanan dan berat badan | 25 |
| Gambar 12. | Kerangka Teori Penelitian | 26 |
| Gambar 13. | Kerangka Konsep Penelitian | 27 |
| Gambar 14. | Alur Penelitian | 31 |
| Gambar 15. | Pemeliharaan hewan uji | 33 |
| Gambar 16. | Prosedur pengambilan darah tikus | 34 |
| Gambar 17. | Prinsip pemeriksaan Leptin dengan teknik Sandwich ELISA ... | 35 |
| Gambar 18. | Kurva standar pemeriksaan kadar hormon Leptin | 35 |
| Gambar 19. | Rata-rata kadar hormon pada kelompok hewan uji | 37 |
| Gambar 20. | Rata-rata asupan makanan per hari pada kelompok hewan uji ... | 38 |
| Gambar 21. | Rata-rata pertambahan berat badan pada kelompok hewan uji... | 39 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|---------|---|----|
| Tabel 1 | Perbedaan Rata-rata Kadar Hormon Leptin Postprandial, Asupan Makan, dan Pertambahan Berat Badan Pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan | 39 |
| Tabel 2 | Hasil analisis multicomparison dengan metode tukey kadar leptin postprandial pada kelompok kontrol dan perlakuan | 40 |
| Tabel 3 | Hasil Pemeriksaan Kadar Hormon Leptin Postprandial Dengan Teknik Elisa..... | 80 |



DAFTAR SINGKATAN

1. HFCS : High fructose corn syrup
2. CCK : Cholecystokinin
3. HLA : Hypothalamus lateral area
4. PVN : Paraventricular area
5. NPY : Neuropeptide Y
6. AgRP : Agouti-related peptide
7. POMC : Proopiomelanocortin
8. CART : Cocaine and amphetamine related transcript
9. CRH : Corticotropin releasing hormone
10. TRH : Thyroid releasing hormone
11. CSH : Corticotropin stimulating hormone
12. TSH : Thyroid releasing hormone
13. PI3K : phosphatidylinositol 3 kinase
14. AMPK : AMP-activated protein kinase
15. mTOR : Mammalian target of rapamycin
16. IR : Insulin receptor
17. IRS-1 : Insulin receptor-1
18. TSC : Tuberous sclerosis complex
19. FFA : Free fatty acid
20. PABP : Poly (A)- binding protein
21. 4E-BP1 : 4E-binding protein 1
22. eIF-4E : eukaryotic initiation factor 4E

DAFTAR LAMPIRAN

| | | |
|------------|---|----|
| Lampiran 1 | Uji Normalitas Pada Kadar Leptin, Asupan Makanan Dan Berat Badan | 51 |
| Lampiran 2 | Uji Varian Kadar Leptin, Asupan Makanan Dan Berat Badan. | 53 |
| Lampiran 3 | Uji Anova One Way Terhadap Rerata Kadar Leptin Pada Kelompok Kontrol Dan Kelompok Perlakuan | 54 |
| Lampiran 4 | Uji Anova One Way Terhadap Asupan Makanan Pada Kelompok Kontrol Dan Kelompok Perlakuan | 55 |
| Lampiran 5 | Uji Anova One Way Terhadap Berat Badan Pada Kelompok Kontrol Dan Kelompok Perlakuan | 56 |
| Lampiran 6 | Analisa Post Hoc Terhadap Kadar Leptin Pada Kelompok Kontrol Dan Kelompok Perlakuan | 57 |
| Lampiran 7 | Prosedur Pelaksanaan Pemeriksaan Hormon Leptin | 59 |
| Lampiran 8 | Tabel Hasil Pemeriksaan Kadar Hormon Leptin Postprandial Dengan Teknik Elisa..... | 77 |



BAB I

PENDAHULUAN

1. Latar Belakang

Secara fisiologik, tubuh manusia memiliki mekanisme untuk mempertahankan homeostasis energinya sehingga berat badan dipertahankan konstan. Mekanisme ini melibatkan berbagai sinyal perifer yang akan diintegrasikan pada hipotalamus yang selanjutnya akan mempengaruhi perilaku dan motivasi untuk makan serta *energy expenditure*. Sinyal perifer ini dapat dipengaruhi oleh kandungan jenis makronutrien yang dimakan seseorang, salah satunya fruktosa. Konsumsi fruktosa dalam jumlah berlebihan diduga bertanggung jawab pada perubahan homeostasis energi sehingga turut berkontribusi dalam meningkatkan obesitas.

Fruktosa yang didapatkan dari diet merupakan komponen dari sukrosa atau sebagai gula bebas, terdapat dalam buah-buahan, gula pasir, madu dan dalam *high fructose corn syrup* (HFCS). Sukrosa dan HFCS merupakan pemanis yang paling banyak digunakan pada industri makanan, juga digunakan dalam jumlah yang sangat banyak pada sejumlah besar makanan siap saji, minuman ringan (*soft drink*), baik yang terkarbonasi maupun yang tidak (*fruit drink*).

Dahulu, manusia mengkonsumsi fruktosa hanya sebesar 15-20 gram per hari, dan terutama berasal dari buah-buahan. Tetapi saat ini, perubahan pola diet, terutama pola diet Barat, yang banyak mengkonsumsi makanan siap saji dan minuman ringan, menyebabkan peningkatan konsumsi harian fruktosa yang bermakna bahkan mencapai 85-100 gram per hari.^{1,2} Bahkan satu dari setiap 4 anak di Amerika mengkonsumsi pemanis diatas 25% total energi yang direkomendasikan.¹

Data di Amerika Serikat, menunjukkan bahwa seiring terus meningkatnya konsumsi HFCS dan sukrosa (terutama dari minuman ringan) juga terjadi peningkatan prevalensi obesitas meskipun telah terjadi penurunan konsumsi lemak jenuh.^{1,3} Peningkatan konsumsi HFCS maupun sukrosa

tampaknya merupakan salah satu faktor paling penting yang berkontribusi terjadinya epidemi obesitas.⁴⁻⁶ Bukti yang berkembang saat ini menunjukkan bahwa diet yang tinggi fruktosa berpotensi untuk menimbulkan efek yang tidak diinginkan pada profil lipid darah dan dapat menyebabkan perubahan profil hormon yang berhubungan dengan berat badan sehingga mempromosikan terjadinya *overconsumption*, penambahan berat badan, disregulasi metabolisme lemak, dan resistensi insulin.^{3,4,7-9}

Kontribusi diet tinggi fruktosa dalam menyebabkan penambahan berat badan dan terjadinya asupan energi yang tidak terkontrol (*overconsumption*) amat mungkin terjadi karena fruktosa tidak hanya memiliki fungsi lipogenesis, tetapi fruktosa menyebabkan penekanan nafsu makan yang lebih sedikit dibandingkan karbohidrat lain.^{2,10-12} Fungsi lipogenesis fruktosa lebih besar daripada glukosa karena fruktosa merupakan substrat lipogenesis yang lebih disukai hati daripada glukosa. Fruktosa memasuki sel hati dan langsung difosforilasi oleh enzim fruktokinase menjadi fruktosa 1-fosfat dan jalur metabolisme selanjutnya tidak dibatasi oleh enzim fosfofruktokinase seperti pada glukosa. Dengan demikian proses metabolisme fruktosa terjadi lebih cepat dan menyediakan substrat lipogenik yang lebih banyak pada stadium *postprandia*.^{8,9}

Fruktosa dapat menyebabkan *overconsumption* karena konsumsi fruktosa tidak menyebabkan peningkatan hormon yang menekan nafsu makan (leptin dan insulin) ataupun penurunan hormon yang merangsang nafsu makan (ghrelin). Banyak penelitian, baik pada manusia maupun pada hewan, menunjukkan bahwa jika dibandingkan dengan subjek yang mengkonsumsi glukosa, maka konsumsi fruktosa menyebabkan rendahnya kadar insulin serum *postprandial*, dan rendahnya kadar leptin serum *postprandial* dan diurnal, bahkan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Teff et al, diet tinggi fruktosa juga menumpulkan penurunan kadar ghrelin serum *postprandial*. Hal inilah yang dianggap menjadi faktor potensial penyebab masih meningkatnya masukan makanan setelah mengkonsumsi fruktosa walaupun dalam jumlah kalori yang tinggi.¹⁰

Leptin dan insulin merupakan sinyal adiposa jangka panjang yang menggambarkan jumlah simpanan energi dalam adiposa dan mengatur berat badan seseorang.¹³ Disamping itu kadar kedua hormon ini juga dipengaruhi oleh status energi jangka pendek yaitu keadaan setelah makan sehingga diasumsikan juga berperan dalam menyebabkan sinyal kenyang jangka pendek yang mengatur nafsu makan setelah makan.¹⁴ Leptin dan insulin bekerja pada hipotalamus pada nukleus arkuata yang mempengaruhi aktivitas neuronal pada area hipotalamus lateral dan nukleus paraventricular sehingga mengatur jumlah asupan makan dan peningkatan *energy expenditure* untuk mempertahankan berat badan.¹³ Kadar leptin serum dapat menggambarkan kadar insulin serum karena biosintesis dan sekresi leptin oleh jaringan adiposa distimulasi insulin.¹⁵⁻¹⁷ Rendahnya kadar insulin serum juga menyebabkan rendahnya kadar leptin serum, demikian juga sebaliknya.

Pada penelitian ini ingin diketahui bagaimana pengaruh diet tinggi fruktosa terhadap kadar leptin serum *postprandial* yang secara tidak langsung juga menggambarkan kadar insulin serum *postprandial*-nya, pengaruhnya terhadap jumlah asupan makanan dan pada akhirnya pengaruhnya terhadap berat badan.

2. Rumusan Masalah

Bagaimanakah pengaruh diet tinggi fruktosa terhadap kadar leptin serum *postprandial*, dan pengaruhnya terhadap jumlah asupan makanan dan berat badan dibandingkan dengan diet tinggi glukosa?

3. Hipotesis Penelitian

1. Pemberian diet tinggi fruktosa pada tikus menyebabkan kadar leptin serum *postprandial* yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok tikus yang diberi diet tinggi glukosa
2. Pemberian diet tinggi fruktosa pada tikus menyebabkan jumlah asupan makanan lebih tinggi dibandingkan kelompok tikus yang diberi diet tinggi glukosa

3. Pemberian diet tinggi fruktosa pada tikus lebih meningkatkan selisih berat badan sebelum dan sesudah perlakuan dibandingkan dengan kelompok tikus yang diberi diet tinggi glukosa

4. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Menganalisis pengaruh diet tinggi fruktosa terhadap kadar leptin serum *postprandial* tikus dan pengaruhnya terhadap asupan makanan dan berat badan.

2. Tujuan Khusus

1. Membandingkan kadar leptin serum *postprandial* tikus yang mendapatkan diet tinggi fruktosa, diet tinggi glukosa dan kelompok kontrol
2. Membandingkan jumlah asupan makanan pada tikus yang mendapatkan diet tinggi fruktosa, diet tinggi glukosa dan kelompok kontrol
3. Membandingkan selisih berat badan sebelum dan sesudah perlakuan pada tikus yang mendapatkan diet tinggi fruktosa, diet tinggi glukosa dan kelompok kontrol

5. Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai pengaruh diet tinggi fruktosa terhadap kadar leptin serum *postprandial*, jumlah asupan makanan serta berat badan
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan masukan dalam mengatur diet seseorang untuk membatasi jumlah asupan fruktosa (terutama dari sukrosa) untuk mencegah terjadinya obesitas dan komplikasi yang menyertainya.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

1. FISILOGI PENGATURAN PERILAKU MAKAN DAN BERAT BADAN

Dalam keadaan normal, tubuh manusia memiliki mekanisme pengatur homeostasis energi sehingga masukan energi dan *energy expenditure* selalu dipertahankan dalam keseimbangan netral. Dengan demikian berat badan dipertahankan relatif konstan. Masukan energi berasal dari asupan makanan, sedangkan *energy expenditure* berupa pemakaian untuk metabolisme basal, termogenesis dan aktivitas fisik.

Dengan asumsi bahwa keluaran energi konstan, maka mekanisme untuk mempertahankan berat badan terutama terjadi pada pengaturan asupan makan. Kontrol asupan makanan tergantung dari integrasi berbagai macam sinyal perifer baik yang dimediasi oleh mekanoreseptor maupun kemoreseptor yang memberikan informasi mengenai status energi tubuh. Integrasi sinyal-sinyal perifer ini terjadi di hipotalamus dan menentukan perilaku makan yang selaras dengan kebutuhan energi yang dibutuhkan, baik dalam jangka pendek atau pun dalam jangka panjang. Pengaturan masukan makanan dalam jangka pendek membantu untuk mengontrol jumlah dan frekuensi makan dan dalam jangka panjang membantu mempertahankan jumlah total energi dalam tubuh dan berat badan^{13,18}.

1.1 Sinyal Perifer yang Menentukan Regulasi Perilaku Makan dan Berat Badan

Sinyal perifer yang terlibat dalam homeostasis energi dibagi menjadi dua, yaitu sinyal adiposa jangka panjang (*long-acting adiposity signal*) dan sinyal jangka pendek berupa faktor-faktor dari gastrointestinal. Tetapi pengaturan jangka pendek dan jangka panjang pada hakekatnya tidak dapat dipisahkan secara mutlak, karena pengaturan asupan makan dalam jangka pendek juga dipengaruhi oleh sinyal adiposa jangka panjang yang mempengaruhi status jumlah simpanan energi seseorang.

Sinyal yang dikelompokkan sebagai *long-acting adiposity signal* adalah leptin dan insulin, dan baru-baru ini *ghrelin* juga dimasukkan sebagai *long-acting adiposity signal*. Leptin dan insulin mengatur keseluruhan berat badan dan dikategorikan sebagai *long-acting adiposity signal* karena memenuhi kriteria sebagai *long-acting adiposity signal*, yaitu pertama, kadarnya dalam sirkulasi proporsional dengan jumlah simpanan energi tubuh (trigliserida dalam adiposa) dan berubah-ubah sesuai dengan fluktuasi jumlah simpanan energi tersebut. Kedua, sinyal ini mempengaruhi aktivitas neuronal pada pusat-pusat otak yang diketahui sebagai pengatur berat badan. Ketiga, pemberian insulin atau leptin mempengaruhi asupan makanan dan atau *energy expenditure*, dan peningkatan kronik hormon ini dapat meningkatkan berat badan¹³.

Sinyal yang dikelompokkan sebagai sinyal jangka pendek diantaranya berupa distensi lambung, kolesistokinin (CCK), *ghrelin* dan leptin lambung. CCK merupakan hormon yang disekresi oleh mukosa duodenum, menyebabkan perasaan kenyang dan penuh setelah makan sehingga membantu seseorang untuk menghentikan makan dan membatasi jumlah makanan. CCK tidak dikelompokkan sebagai *long-acting adiposity signal* karena pemberian kronik CCK hanya mempengaruhi pola makan tetapi tidak menyebabkan perubahan jumlah asupan makanan secara keseluruhan dan berat badan.

Ghrelin, merupakan hormon yang disekresikan oleh kelenjar oksintik (*oxyntic gland*) pada fundus lambung yang kemudian masuk ke dalam sirkulasi darah dan memiliki efek yang berlawanan dengan CCK. Hormon ini menyebabkan perasaan lapar sebelum makan dan keinginan untuk mencari makan, menginisiasi makan dan mengatur frekuensi makan. *Ghrelin*, disamping sebagai sinyal jangka pendek, juga memenuhi kriteria sebagai *long-acting adiposity signal* karena juga berpartisipasi pada pengaturan berat badan jangka panjang, yang memiliki efek yang berlawanan dengan leptin dan insulin¹³.

Leptin dan insulin walaupun dikelompokkan sebagai *long-acting adiposity signal*, tetapi kadarnya dipengaruhi pada keadaan setelah makan atau puasa sehingga diasumsikan juga berperan dalam menyebabkan sinyal kenyang jangka pendek yang mengatur nafsu makan setelah makan, diantara dua waktu makan atau starvasi.

1.2. Peran Hipotalamus pada Regulasi Perilaku Makan dan Berat Badan

Regulasi perilaku makan dan keseimbangan energi terutama terjadi pada hipotalamus, tetapi juga melibatkan sistem saraf secara luas meliputi batang otak, korteks serebri, area olfaktori, dan lainnya.

Sinyal perifer dapat masuk ke hipotalamus baik melalui aliran darah menembus *blood brain barrier* atau melalui persarafan. Sinyal perifer yang mempengaruhi asupan makan dan keseimbangan energi yang langsung diintegrasikan pada hipotalamus adalah sinyal endokrin berupa leptin, insulin dan *ghrelin (long-acting adiposity signal)* sedangkan sinyal lainnya akan disampaikan melalui persarafan dan diintegrasikan di nukleus traktus solitarius. Sinyal pada nukleus traktus solitarius juga berintegrasi dengan sinyal dari hipotalamus, yaitu HLA dan PVN (yang dipengaruhi oleh *adiposity signals*) dan mempengaruhi perilaku makan.

a. Integrasi Sinyal Endokrin

Sinyal endokrin dalam sirkulasi darah akan masuk ke hipotalamus melalui *blood brain barrier* dan akan mempengaruhi aktivitas neuron dalam nukleus arkuata. Kemudian mempengaruhi neuron kedua dalam area hipotalamus lainnya yang menimbulkan efek perubahan perilaku makan, otonom atau endokrin^{18,19}.

Nukleus arkuata memiliki dua kelompok neuron yang memiliki fungsi yang berlawanan dalam mengatur masukan makanan dan *energy expenditure*. Kelompok pertama adalah kelompok neuron yang melepaskan NPY (neuropeptida Y) dan AgRP (*agouti-related peptide*) yang merupakan peptida oreksigenik yang meningkatkan perilaku makan. Kelompok kedua adalah kelompok neuron pada subdivisi lateral nukleus arkuata, yang

melepas POMC (*proopiomelanocortin*) dan peptida CART (*cocaine and amphetamine related transcript*) yang merupakan peptida anorektik yang menghambat perilaku makan. Kelompok neuron pada nukleus arkuata akan menuju neuron kedua dalam nukleus lainnya pada hipotalamus, yaitu area hipotalamus lateral (HLA) dan nukleus paraventriculer (PVN).

HLA merupakan *feeding centre*. Neuron-neuron pada area ini mensekresikan neurotransmitter peptida *melanin concentrating hormone* (MCH) dan oreksin yang merupakan peptida oreksigenik. Kedua peptida ini meningkatkan masukan makan (menimbulkan perasaan lapar) dan menurunkan kecepatan metabolisme.

Nukleus paraventriculer (PVN) terdiri dari dua jenis sel, yaitu *parvocellular* dan *magnocellular*. Sel yang berperan dalam pengaturan asupan makanan dan *energy expenditure* adalah sel *parvocellular*. Sel *parvocellular* bagian medial mensekresikan *hypothalamic releasing hormone* seperti *Corticotropine releasing hormone* (CRH) dan *thyroid releasing hormone* (TRH). CRH menyebabkan meningkatnya sekresi *corticotropin stimulating hormone* (CSH) dan pada akhirnya meningkatkan sekresi kortisol sedangkan TRH menyebabkan meningkatnya sekresi *thyroid stimulating hormone* (TSH) dan pada akhirnya akan meningkatkan produksi T3 dan T4. Hasil akhirnya menyebabkan meningkatnya lipolisis trigliserida menjadi *free fatty acid* dan gliserol, meningkatkan pembentukan energi expenditure, dan meningkatkan termogenesis sehingga membantu menurunkan berat badan. Sel *parvocellular* bagian dorsal dan ventral menuju ke batang otak (nukleus dorsalis medulla oblongata) yang mengontrol sistem saraf parasimpatis dan menuju langsung ke nukleus preganglion sistem saraf simpatis pada medula spinalis untuk mempengaruhi sistem syaraf otonom. Neuron nukleus dorsalis batang otak akan mengeksitasi nervus vagus efferen yang mempersarafi sel B pankreas dan sel A pankreas yang turut mempengaruhi sekresi hormon insulin dan glukagon yang pada akhirnya juga meningkatkan lipolisis trigliserida. Sedangkan neuron pada nukleus preganglion sistem saraf simpatis pada

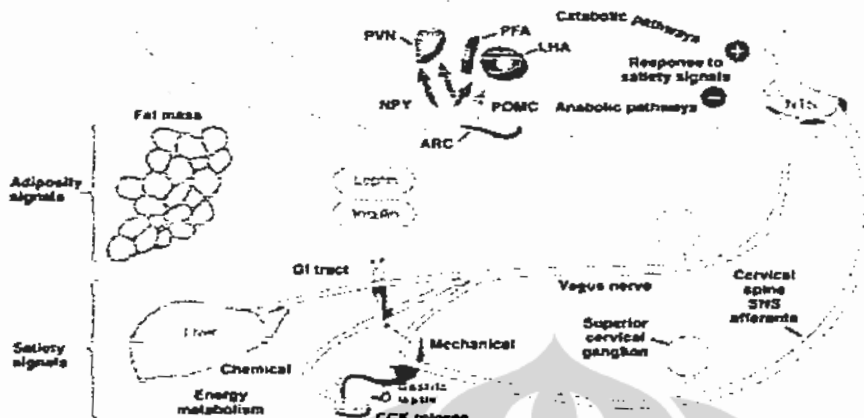
medula spinalis akan menuju ke medula adrenal sehingga meningkatkan sekresi epinefrin juga menuju ke hepar sehingga meningkatkan glikolisis hati dan pada akhirnya meningkatkan metabolisme dan energi expenditure.

Pada HLA, Neuron NPY dan AgRP mengeksitasi neuron yang mensekresi MCH dan oreksin sehingga menginduksi perilaku makan. Sedangkan neuron POMC dan CART menginhibisi neuron MCH dan oreksin sehingga menurunkan perilaku makan.

Pada PVN, Neuron NPY dan AgRP menginhibisi neuron *parvocellular* bagian medial yang mensekresikan TRH dan CRH, dan menginhibisi neuron *parvocellular* bagian dorsal ventral yang menuju serta mengeksitasi neuron yang menuju ke batang otak yang mengontrol sistem syaraf parasimpatis dan neuron yang menuju ke medula spinalis sistem saraf simpatis sehingga menurunkan kecepatan metabolisme dan termogenesis yang menurunkan *energy expenditure*. Sedangkan neuron POMC dan CART mengeksitasi neuron *parvocellular* bagian medial yang mensekresikan TRH dan CRH dan mengeksitasi neuron yang menuju ke batang otak yang mengontrol sistem syaraf parasimpatis dan neuron yang menuju ke medula spinalis sistem saraf simpatis sehingga terjadi peningkatan kecepatan metabolisme dan termogenesis sehingga meningkatkan *energy expenditure*.

Leptin dan insulin pada nukleus arkuata mengaktivasi neuron POMC dan CART serta menginhibisi neuron NPY dan AgRP. Neuron POMC, CART, NPY dan AgRP ini kemudian menuju HLA dan PVN dan memberikan efek berupa penurunan perilaku makan (timbul perasaan kenyang), peningkatan sekresi TSH dan ACH dan *energy expenditure*.

Sebaliknya, *ghrelin* memiliki efek yang berlawanan dengan leptin dan insulin, hormon ini pada nukleus arkuata akan mengaktivasi neuron NPY dan AgRP. Neuron NPY dan AgRP ini kemudian juga memberikan efek inhibisi terhadap neuron POMC dan CART. Neuron POMC, CART, NPY dan AgRP kemudian menuju HLA dan PVN dan memberikan efek



Gambar 2. Sinyal perifer dari saluran cerna dan hati ditransmisi melalui nervus vagus atau afferen sistem saraf simpatis servikal ke nukleus traktus solitarius kemudian berintegrasi dengan sinyal dari hipotalamus untuk mengakhiri makan⁸

1.3. Hormon Leptin

Leptin merupakan hormon peptida, produk dari gen *Ob* yang terdiri dari 146 asam amino dengan berat molekul 16 kDa. Leptin terutama diekspresikan dan disekresikan oleh sel jaringan adiposa dan kadarnya dalam sirkulasi menggambarkan status simpanan energi dalam adiposa. Dalam jumlah kecil leptin juga disekresi oleh jaringan lainnya, seperti mukosa fundus lambung, plasenta, otot rangka, otot jantung, dan epitel mammae.^{22,23}

Leptin gastrik disekresi oleh *chief cell* dan sel endokrin lambung.^{24,25} Leptin yang disekresi *chief cell* akan masuk ke dalam lumen lambung, sedangkan yang disekresi oleh sel endokrin lambung akan masuk ke sirkulasi lambung. Kadar leptin dalam lambung meningkat dalam waktu singkat setelah makan, juga meningkat saat kadar CCK meningkat dan kadar insulin meningkat. Peningkatan leptin dalam gaster setelah makan karbohidrat atau protein tidak menunjukkan perbedaan bermakna.^{24,25}

Peningkatan level leptin dalam lumen gaster ini memberikan sinyal kenyang secara langsung dengan dimediasi oleh nervus vagus dan sinyalnya diintegrasikan dalam nukleus traktus solitarius. Sedangkan Leptin gastrik yang masuk ke sirkulasi tidak menyebabkan peningkatan bermakna level leptin sirkulasi dan tidak cukup untuk menyebabkan perubahan regulasi nafsu

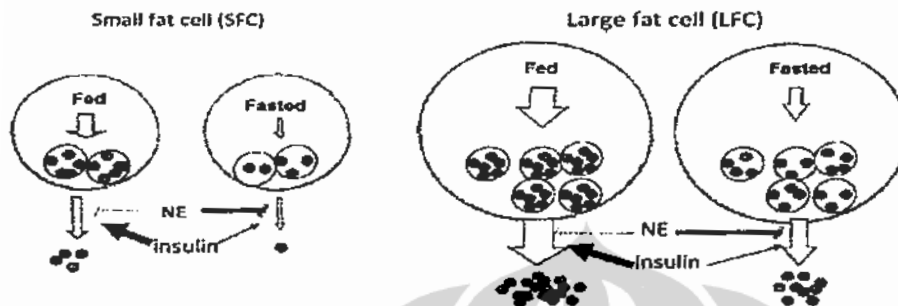
makan seperti jika terjadi perubahan sekresi leptin oleh sel adiposa yang distimulasi oleh makan (nutrisi) atau insulin.

Jumlah leptin yang dilepaskan oleh sel adiposa ke sirkulasi darah diatur dalam beberapa tingkatan, yaitu proses transkripsi, dan pasca-transkripsi, yaitu translasi dan sekresi.^{14,15,17,26} Regulasi pada level transkripsi terjadi secara kronik yang menentukan produksi leptin basal sedangkan pada level pasca-transkripsi pengaturan dapat dimodulasi secara akut yang menentukan variasi akut produksi leptin dalam waktu tertentu dari menit ke menit dan dari jam ke jam. Pengaturan pada level pasca transkripsi inilah yang bertanggungjawab terhadap perubahan level leptin pada keadaan setelah makan atau puasa (jangka pendek).

Produksi leptin (adiposa) basal proporsional dengan status simpanan energi, yaitu ukuran sel adiposa, yang terutama diatur oleh perubahan level mRNA leptin (level transkripsi). Hal inilah yang menyebabkan adanya variasi konsentrasi serum leptin antara individu yang gemuk dan yang kurus. Banyak penelitian telah membuktikan bahwa ekspresi mRNA leptin meningkat pada obesitas, sebaliknya pada starvasi jangka panjang (>24 jam) terjadi penurunan level mRNA leptin, dan terdapat korelasi positif antara jumlah mRNA leptin, jumlah leptin pada jaringan adiposa dan dalam sirkulasi darah.^{14,15,17,26} Tetapi sampai saat ini, mekanisme yang mengatur perubahan jangka panjang ekspresi gen leptin sebagai respon terhadap perubahan level obesitas atau ukuran sel adiposa atau karena perubahan kronik lingkungan hormonal yang menyertainya masih belum diketahui dengan jelas. Sedangkan Regulasi sintesis (level translasi) dan sekresi leptin saat ini lebih banyak diteliti. Saat ini diketahui bahwa pada tahap translasi dan sekresi leptin dipengaruhi oleh hormon insulin dan katekolamin juga dipengaruhi status energi akut dan keberadaan substrat energi.

Jumlah kandungan leptin dalam sel adiposa (*pool leptin*) hasil dari sintesis leptin berhubungan erat dengan ukuran sel adiposa (obesitas) dan juga status nutrisi jangka pendek.^{14,15,17} Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Lee et al, kandungan leptin lebih banyak pada jaringan

adiposa dari tikus yang gemuk dibandingkan tikus yang lebih kurus, dan lebih banyak pada tikus dalam status setelah makan (*fed state*) dibandingkan pada status puasa diantara dua waktu makan (*fasted state*) (gambar 3).



Gambar 3. Pengaruh ukuran sel adiposa, status nutrisi akut dan hormonal pada simpanan dan sekresi leptin¹⁴

Insulin meningkatkan biosintesis leptin dalam jaringan adiposa (leptin de novo) juga meningkatkan kecepatan sekresi leptin yang telah terbentuk, sebaliknya katekolamin (eg. norepinefrin/NE) menyebabkan penurunan biosintesis dan sekresi leptin. Starvasi jangka pendek (14 jam) menyebabkan penurunan relatif kecepatan biosintesis leptin sedangkan pada keadaan setelah makan terjadi peningkatan kecepatan biosintesis dan sekresi leptin.

Pool leptin dalam sel adiposa yang telah terbentuk merupakan simpanan leptin yang dengan cepat dapat dilepaskan dan berkontribusi untuk mengubah konsentrasi leptin serum yang terjadi setelah makan. Pada sel adiposa dengan ukuran yang kecil maupun yang besar, sekresi leptin dari *pool* leptin yang telah dibentuk dimodulasi oleh insulin dan katekolamin (seperti norepinefrin). Pada *fasted state*, baik pada sel adiposa yang besar maupun yang kecil, kecepatan sekresi simpanan leptin yang telah terbentuk dibatasi oleh meningkatnya input simpatis pada jaringan adiposa dan meningkatnya norepinefrin serta menurunnya insulin serum. Pada *fed state*, meningkatnya insulin dan menurunnya norepinefrin, menstimulasi sekresi leptin dari simpanan leptin yang telah terbentuk. Mekanisme ini memungkinkan perubahan sirkulasi leptin yang lebih cepat (dalam 30 menit) dibandingkan perubahan sirkulasi leptin yang terjadi karena sintesis

de novo. Variasi penglepasan simpanan leptin ini mungkin berkontribusi terhadap variasi pulsatif level leptin serum.¹⁴

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Braun et al, insulin juga dapat meningkatkan sedangkan isoproterenol (agonis norepinefrin) juga dapat menurunkan sekresi leptin yang baru disintesis (*de novo*) dari jaringan adiposa manusia dan tikus antara waktu 30 sampai 60 menit.¹⁴ Pada penelitiannya pada tikus, insulin meningkatkan sekresi leptin dari jaringan adiposa dalam keadaan setelah makan, tetapi tidak meningkatkan sekresi leptin pada keadaan puasa semalaman selama 14 jam (starvasi). Hal ini kemungkinan disebabkan starvasi menyebabkan menurunnya pool leptin yang telah terbentuk yang sebenarnya merupakan subjek yang diatur insulin. Pengisian kembali pool ini dengan cara memberi tikus tersebut makan memungkinkan insulin untuk meningkatkan serum leptin kembali yang membantu mempertahankan keseimbangan energi.

Pentingnya pengisian pool leptin setelah starvasi jangka pendek (14 jam) dalam sekresi leptin menunjukkan bahwa ketersediaan substrat energi juga merupakan faktor penentu yang penting dalam mengatur sintesis dan sekresi leptin. seperti yang dibuktikan pada penelitian yang dilakukan oleh Cammisotto *et al*, Lee *et al* dan Mueller *et al*. Pada penelitian yang dilakukan Cammisotto, inkubasi sel adiposa pada medium yang mengandung glukosa (5mM) selama empat jam menyebabkan peningkatan sekresi leptin sebesar dua kali lipat, kemudian dengan penambahan insulin peningkatan sekresi leptin menjadi empat kali lipat, sedangkan pada medium yang tidak mengandung glukosa sekresi leptin basal menurun bermakna dan penambahan insulin tidak menstimulasi sekresi leptin. Hal yang sama juga terjadi pada medium yang mengandung fruktosa tetapi pada konsentrasi tinggi.

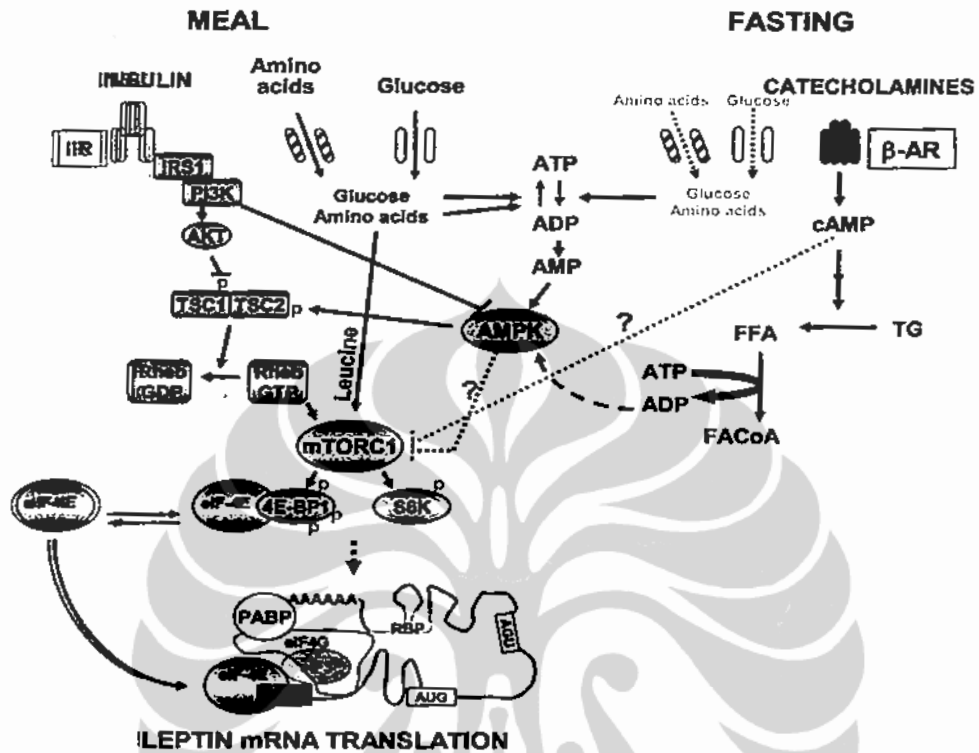
Pada keadaan ada atau tidak ada insulin, keberadaan substrat energi (dalam medium tempat diinkubaskannya adiposa) seperti glukosa, juga substrat glikolitik lainnya seperti fruktosa, laktat dan piruvat juga menyebabkan peningkatan sekresi leptin.^{14,27,28} Hal ini menunjukkan bahwa

sebenarnya transpor dan metabolisme glukosa menjadi bentuk triosa atau ATP merupakan faktor yang berperan penting dalam menginduksi sintesis dan sekresi leptin dibandingkan glukosa itu sendiri. Didukung juga oleh penelitian Mueller *et al*, yang menginkubasi adiposa pada medium glukosa dengan penambahan inhibitor transpor glukosa atau inhibitor glikolisis memberikan hasil inhibisi sekresi leptin meskipun pada medium juga ditambahkan insulin.

Pengetahuan saat ini mengenai jalur yang memediasi kontrol jangka pendek translasi leptin oleh hormon, nutrisi dan status energi diringkas pada gambar 4. Pada keadaan setelah makan, insulin dan nutrisi menstimulasi produksi leptin dengan cara meningkatkan translasi leptin. Efek insulin meningkatkan produksi leptin pada sel adiposa melalui jalur phosphoinositide (PI) 3-kinase/mTOR^{14,29}. Ikatan insulin dan reseptornya (IR/insulin reseptor) akan mengaktifkan PI3K yang kemudian mengaktifasi AKT. AKT menyebabkan meningkatnya aktivitas mTOR1 melalui aktivasi Rheb atau penghambatan yang dominan terhadap AMPK (AMPK menghambat aktivitas mTOR1 dan secara tonik dapat menghambat translasi leptin pada kultur sel). Dengan meningkatnya aktivitas mTOR1 maka terjadi peningkatan translasi leptin. Selain dapat dipengaruhi oleh insulin, AMPK juga dipengaruhi oleh ketersediaan sumber energi dalam sel tersebut. Keberadaan zat nutrisi seperti glukosa, asam amino (leucine) dan kemungkinan nutrisi lain (contohnya fruktosa) dan dimetabolisme dalam sel untuk menghasilkan ATP pada akhirnya dapat menyebabkan penghambatan terhadap AMPK sehingga juga meningkatkan aktivasi mTOR1.

Pada keadaan status energi seluler rendah, contohnya pada keadaan puasa, maka terjadi aktivasi AMPK yang menghambat aktivitas mTOR1 sehingga menurunkan translasi leptin. Pada keadaan puasa atau starvasi juga terjadi aktivasi reseptor beta oleh katekolamin sehingga terjadi peningkatan cAMP intraseluler. cAMP dapat secara langsung menghambat aktivitas mTOR1 dan secara tidak langsung menghambatnya melalui peningkatan

level AMP atau ADP (karena meningkatnya penggunaan ATP untuk lipolisis) yang akan mengaktifkan AMPK.

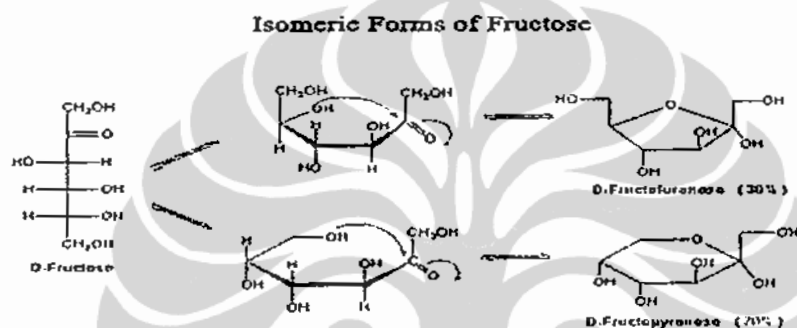


Gambar 4. Jalur pensinyalan hormon dan nutrien memodulasi translasi leptin¹⁴

2. PENGARUH FRUKTOSA TERHADAP REGULASI NAFSU MAKAN DAN BERAT BADAN

2.1. Struktur Kimia Dan Sumber Fruktosa

Fruktosa merupakan salah satu bentuk monosakarida, terdiri dari enam karbon polihidroksiketon (D-fruktosa). D-fruktosa dapat membentuk cincin segi lima yang disebut D-fruktofuranosa atau membentuk cincin segi enam yang disebut D-Fruktopiranos. Dalam larutan, fruktosa berupa campuran yang terdiri dari 70% fruktopiranos dan 30% fruktofuranosa (gambar 5).



Gambar 5. Struktur kimia fruktosa

Fruktosa yang didapatkan dari diet merupakan komponen dari sukrosa, yang terdapat dalam buah-buahan dan gula pasir, atau sebagai monosakarida bebas dalam madu dan dalam *high fructose corn syrup* (HFCS). Sukrosa dan HFCS merupakan pemanis yang paling banyak digunakan pada industri makanan, juga digunakan dalam jumlah yang sangat banyak pada sejumlah besar makanan siap saji, minuman ringan (*soft drink*) baik yang berkarbonasi maupun yang tidak (*fruit drink*).

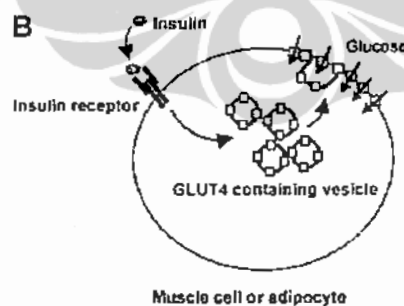
2.2. Transporter Fruktosa

Fruktosa ditranspor secara pasif melintasi membran melalui transporter glukosa terfasilitasi (GLUT), terutama GLUT5 juga dapat melalui GLUT2 dan kemungkinan melalui GLUT4^{30,31,32}

GLUT5 merupakan transporter khusus fruktosa, terdapat pada usus halus (terutama pada duodenum dan yeyunum proksimal), juga terdapat pada ginjal,

otak dan sel yang sensitif insulin, yaitu sel adiposa dan sel otot³⁰. GLUT2 merupakan transporter untuk glukosa, galaktosa dan fruktosa. GLUT2 diekspresikan pada membran basolateral usus halus, otak, hati, dan pankreas. Transporter ini memfasilitasi masuknya heksosa ke jaringan ini dengan mudah tanpa memerlukan stimulasi insulin. Peran GLUT2 dalam mentranspor fruktosa diketahui pada membran basolateral usus halus yang membantu absorpsi fruktosa dan pada sel hati yang meningkatkan ambilan fruktosa oleh sel hati.

GLUT4 sebenarnya merupakan transporter utama untuk glukosa. GLUT4 diekspresikan pada jaringan yang peka insulin, yaitu otot rangka, otot jantung dan jaringan adiposa. Ekspresi GLUT4 pada membran sel jaringan tersebut distimulasi oleh insulin. Pada keadaan inaktif, GLUT4 berada pada kompartemen tubulo-vesikuler intraseluler. Saat insulin berikatan dengan reseptornya pada sel adiposa maupun otot, maka akan terjadi translokasi GLUT4 dari vesikel ke membran serum sehingga mengaktifkan GLUT4 (gambar 6)³³. Khusus pada sel adiposa, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hajduch et al, GLUT4 pada sel ini diduga juga dapat mentranspor fruktosa dan bertanggung jawab sebesar 21% terhadap ambilan fruktosa oleh sel adiposa. Peran GLUT4 dalam ambilan fruktosa meningkat jika distimulasi insulin dan pada keadaan tidak ada glukosa.



Gambar 6. Stimulasi GLUT4 oleh Insulin³³

2.3. Proses Pencernaan dan Absorpsi Fruktosa

Fruktosa dari diet dalam bentuk bebas akan langsung diabsorpsi di usus halus. Sedangkan jika dalam bentuk sukrosa (disakarida) akan dicerna terlebih

dahulu oleh disakaridase pada *brush border* usus halus menjadi bentuk monosakaridanya, yaitu fruktosa dan glukosa.

Glukosa ditranspor masuk enterosit melalui SGLT1 dengan cara difusi aktif sekunder sedangkan fruktosa oleh GLUT5 dengan cara difusi terfasilitasi. Kedua monosakarida ini meninggalkan membran basolateral usus halus melalui GLUT2 dengan cara difusi terfasilitasi, berdifusi melalui ruang interstitial masuk ke kapiler dan ditranspor melalui vena portal menuju hati untuk diproses dan dilepaskan ke sirkulasi (gambar 7).

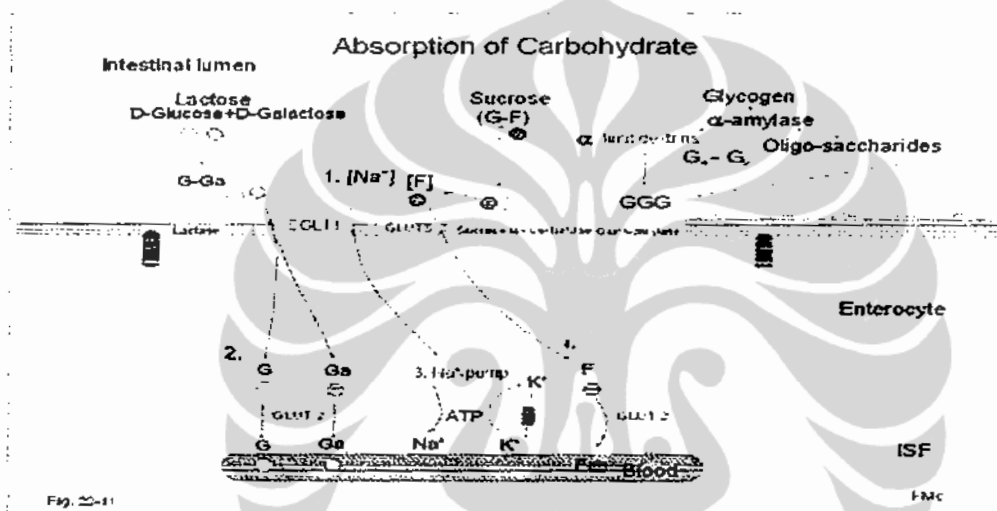


Fig. 20-11

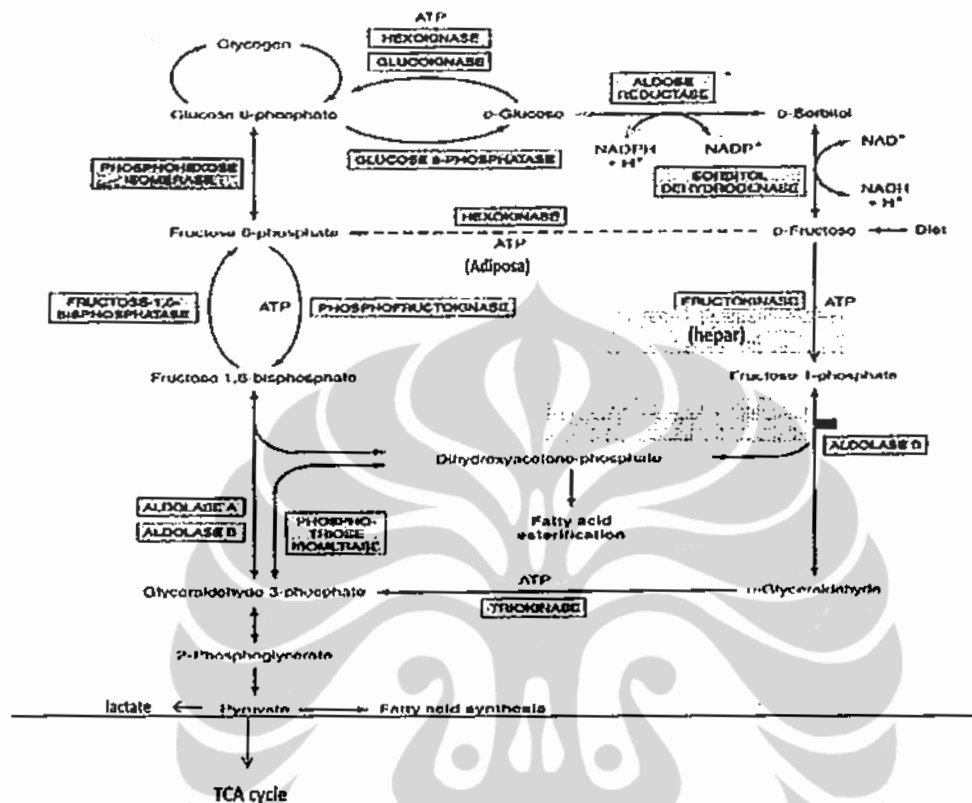
Gambar 7. Proses Absorpsi karbohidrat³⁴

2.4. Metabolisme Fruktosa

Sebanyak 50-70% fruktosa dalam sirkulasi dengan cepat akan di-*uptake* dan dimetabolisme oleh hati. Organ lain yang juga dapat meng-*uptake* dan memetabolisme fruktosa adalah adiposa, otot, ginjal, dan usus halus. Pada tikus, telah dibuktikan bahwa adiposa dapat meng-*uptake* fruktosa dalam jumlah yang bermakna dan merupakan organ kedua yang terpenting dalam metabolisme fruktosa setelah hati¹⁵.

Jalur metabolisme fruktosa yang terjadi di sel hati berbeda dengan yang terjadi pada sel adiposa atau sel otot. Perbedaan jalur ini terjadi karena adanya perbedaan enzim yang terlibat pada metabolisme fruktosa yang tersedia pada jaringan tersebut. Pada sel hati, fosforilasi fruktosa dimediasi oleh enzim

fruktokinase. Sedangkan pada sel otot atau adiposa, fosforilasi fruktosa dimediasi oleh enzim heksokinase (gambar 8).



Gambar 8. Metabolisme fruktosa dalam sel hati dan sel otot³⁵

a. Metabolisme Fruktosa Oleh Sel Hati

Fruktosa memasuki sel hati melalui transporter GLUT5 dan sedikit melalui GLUT2. Aktivitas GLUT5 di sel hati tidak dipengaruhi oleh insulin tetapi diregulasi oleh ketersediaan fruktosa dalam sirkulasi.

Setelah memasuki sel hati, fruktosa dengan cepat akan difosforilasi oleh fruktokinase menjadi fruktosa 1-fosfat. Enzim ini spesifik bekerja pada fruktosa dan tidak bekerja pada glukosa dan aktivitasnya tidak dipengaruhi oleh insulin. Fruktosa 1-fosfat kemudian dipecah oleh adolase B menjadi Dihidroksiaseton fosfat (senyawa antara glikolisis) dan gliseraldehid. Gliseraldehid kemudian difosforilasi oleh triose kinase menjadi gliseraldehid 3-fosfat. Dihidroksiaseton fosfat dan gliseraldehid 3-fosfat merupakan senyawa

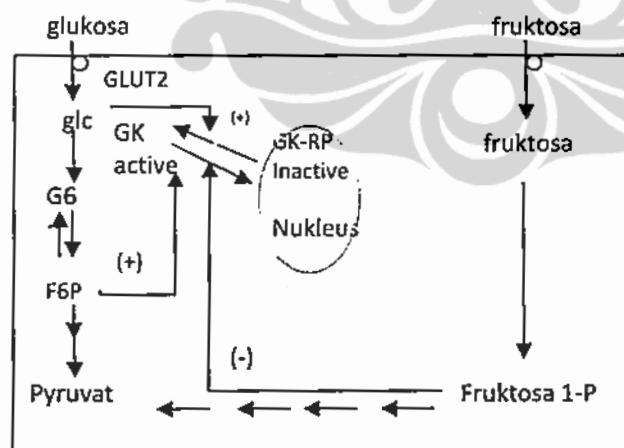
antara dari jalur glikolisis dan dapat menjalani proses lebih lanjut menjadi piruvat. Nasib piruvat selanjutnya dapat masuk siklus *tricarboxylic acid* (TCA) untuk menghasilkan ATP, atau piruvat dapat dikonversi menjadi sitrat dan masuk pada sintesis asam lemak dan bersama gliserol 3-P membentuk trigliserida atau piruvat juga dapat dikonversi menjadi laktat. Sebagai alternatif, senyawa antara tersebut juga dapat dikonversi menjadi glukosa melalui proses glukoneogenesis atau dikonversi menjadi glikogen^{7,36,37} (gambar 8). Dengan kata lain, nasib fruktosa sebenarnya paralel dengan glukosa.

Saat jalur metabolisme dan karakteristik fruktosa dipelajari lebih lanjut, terdapat perbedaan metabolisme tertentu antara glukosa dan fruktosa, dan perbedaan tersebut membuktikan bahwa fruktosa dapat mencetuskan dislipidemia dan obesitas. Metabolisme fruktosa oleh sel hati terjadi lebih cepat dibandingkan dengan glukosa dan fruktosa merupakan substrat lipogenik yang lebih disukai hati daripada glukosa.

Hati kaya akan enzim fruktokinase yang dengan cepat memfosforilasi fruktosa menjadi fruktosa 1-fosfat kemudian jalur metabolisme fruktosa selanjutnya pada level triosa fosfat tidak melewati kontrol oleh enzim fosfofruktokinase (PFK) seperti pada jalur metabolisme glukosa. Dengan demikian proses metabolisme fruktosa terjadi lebih cepat dan menyediakan substrat lipogenik yang lebih banyak pada stadium *postprandial*. fruktosa dapat secara terus-menerus memasuki jalur glikolitik sehingga fruktosa dapat tanpa terkontrol menghasilkan piruvat, glikogen, laktat, dan menyediakan baik gliserol maupun gugus asil dari molekul asilgliserol untuk membentuk trigliserida. Substrat ini menyebabkan peningkatan sintesis asam lemak (FA), meningkatkan esterifikasi FA dan meningkatkan sekresi VLDL, yang kemudian meningkatkan serum TAG yang pada akhirnya meningkatkan kadar LDL kolesterol. Banyak penelitian menunjukkan bahwa sel hati lebih cepat menggunakan fruktosa daripada glukosa dan lebih banyak yang dikonversi menjadi trigliserida dan glikogen hati^{1,38}.

Berbeda dengan fruktosa, fosforilasi glukosa di hati diregulasi oleh enzim glukokinase yang berfungsi sebagai *buffer* gula darah sehingga *uptake* glukosa oleh hati tidak bisa secepat fruktosa. Enzim ini berperan penting dalam proses glikolisis yang berfungsi untuk memfosforilasi glukosa 6-fosfat menjadi fruktosa 6-fosfat. Fruktosa 6-fosfat memiliki efek inhibisi terhadap glukokinase karena mempromosikan translokasi glukokinase ke inti sel dan mempromosikan berikatnya glukokinase dengan protein pengaturnya (*glucokinase inhibitory protein*) sehingga glukokinase menjadi inaktif (gambar 9). Dengan demikian jika fosforilasi glukosa pada titik tertentu dinilai telah berlebihan maka aktivitas enzim glukokinase untuk memfosforilasi glukosa dihambat dan pada akhirnya *uptake* glukosa oleh hati (melalui GLUT2) juga berkurang.

Selanjutnya, *uptake* dan metabolisme glukosa di hati lebih lambat daripada fruktosa karena jalur glikolisis glukosa terutama dikontrol oleh enzim (*Phosphofruktokinase*) PFK. Enzim ini dikontrol secara negatif oleh produknya sendiri, yaitu sitrat dan adenosin trifosfat (ATP) yang selanjutnya mencegah *uptake* glukosa oleh hepar secara berlebihan.



Gambar 9. Regulasi aktivitas glukokinase³⁹

b. Metabolisme fruktosa oleh sel adiposa

Fruktosa memasuki sel adiposa melalui dua jalur, yaitu melalui GLUT5 (sebanyak 80%) dan sisanya kemungkinan melalui GLUT4. Setelah memasuki

sel adiposa, isoform heksokinase yang terdapat pada jaringan adiposa dapat memfosforilasi fruktosa menjadi fruktosa 6-fosfat. Tetapi sebenarnya enzim ini bereaksi lebih efisien terhadap glukosa. Sebagai hasilnya, fosforilasi fruktosa berjalan lambat pada keberadaan kadar fisiologis glukosa dan glukosa 6-fosfat intraseluler. Tetapi jika kadar fruktosa cukup tinggi dan jika tanpa keberadaan glukosa, maka uptake dan metabolisme fruktosa oleh sel adiposa dapat meningkat secara bermakna.

Fruktosa 6-fosfat selanjutnya dikonversi menjadi fruktosa 1,6 bifosfat oleh enzim PFK. Kemudian fruktosa 1,6 bifosfat dapat dikonversi menjadi dihidroksiaseton fosfat dan gliseraldehyde 3-fosfat. Sama seperti di dalam sel hati, kedua substrat ini dapat menjalani proses lebih lanjut menjadi piruvat. Nasib piruvat selanjutnya sama seperti metabolisme yang terjadi di hati. (gambar 8).

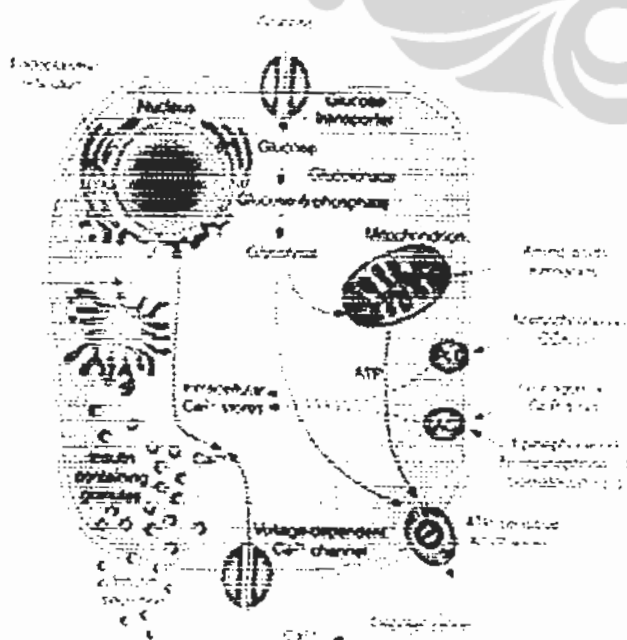
3. Pengaruh Konsumsi Fruktosa terhadap Insulin dan Leptin

Fruktosa diduga dapat menyebabkan peningkatan asupan makan dan *overconsumption* yang pada akhirnya dapat menyebabkan peningkatan berat badan dibandingkan dengan glukosa berdasarkan teori bahwa fruktosa tidak menyebabkan peningkatan insulin dan leptin serum, dan menghambat penurunan kadar *ghrelin* serum. Sedangkan pengaruhnya terhadap CCK dan leptin gastrik tidak terlalu bermakna. Ringkasan perbedaan konsumsi fruktosa dan glukosa terhadap profil hormon yang berperan dalam regulasi asupan makanan dan berat badan dapat dilihat pada gambar 11.

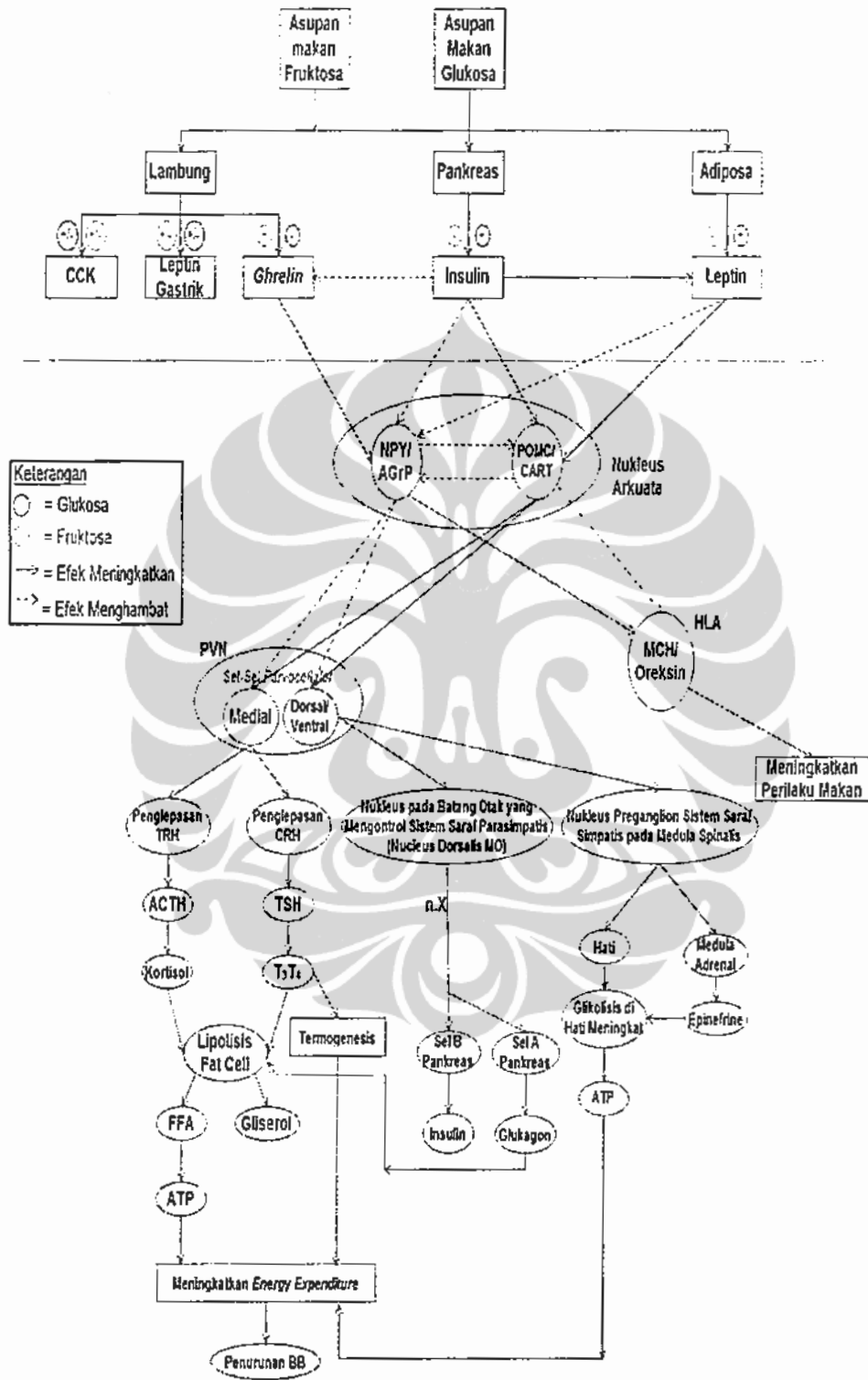
Fruktosa memiliki pengaruh yang lebih kecil terhadap kadar insulin serum dibandingkan glukosa. Sedangkan peningkatan glukosa darah dengan cepat dapat meningkatkan kadar insulin serum. Pankreas hanya sensitif terhadap peningkatan glukosa darah karena pankreas memiliki transporter GLUT2 dengan afinitas yang tinggi terhadap glukosa (gambar 10). Fruktosa tidak menyebabkan peningkatan bermakna level insulin karena pankreas tidak memiliki transporter fruktosa GLUT5^{2,33}. Dengan demikian *uptake* fruktosa ke sel pankreas menjadi terbatas.

Insulin disekresi dari sel beta pankreas terutama sebagai respon meningkatnya gula darah. Mekanisme yang menginduksi disekresikannya insulin sebagai respon meningkatnya glukosa darah dijelaskan berikut ini. Saat glukosa darah meningkat, glukosa memasuki sel beta pankreas melalui GLUT2. Metabolisme intraseluler glukosa meningkatkan ATP yang menginhibisi *ATP-sensitive K⁺ channel* sehingga menghambat effluks kalium. Hal ini mendepolarisasi sel beta sehingga membuka *voltage-gated calcium channel* sehingga terjadi influk kalsium. Masuknya kalsium ke dalam sel menyebabkan terjadinya peningkatan kalsium intrasel dan menstimulasi eksositosis ganula sekretori insulin dan pelepasan insulin ke ruang ekstraseluler masuk ke aliran darah⁴⁰.

Konsumsi fruktosa juga tidak menyebabkan peningkatan kadar hormon leptin serum. Hal ini terjadi kemungkinan karena dua alasan, pertama fruktosa tidak menyebabkan peningkatan sekresi insulin, padahal telah diketahui bahwa insulin dapat meningkatkan biosintesis dan sekresi leptin dari sel adiposa. Kedua, kemungkinan proses *uptake* dan metabolisme fruktosa yang menghasilkan substrat yang turut berperan dalam proses translasi dan sekresi leptin pada sel adiposa terbatas karena terbatasnya hormon insulin setelah mengkonsumsi fruktosa.

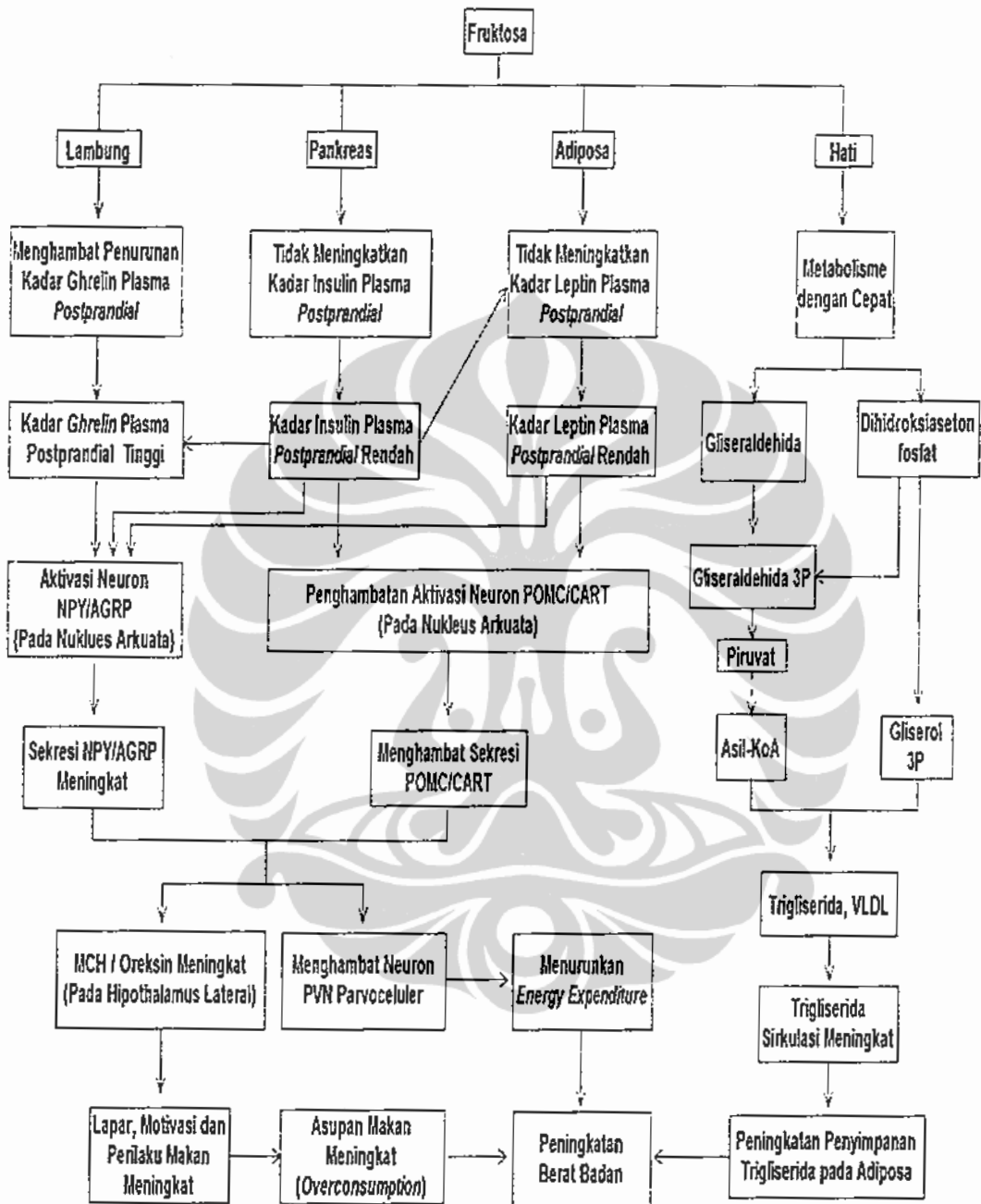


Gambar 10. Mekanisme sekresi insulin sebagai respon meningkatnya glukosa darah⁴⁰



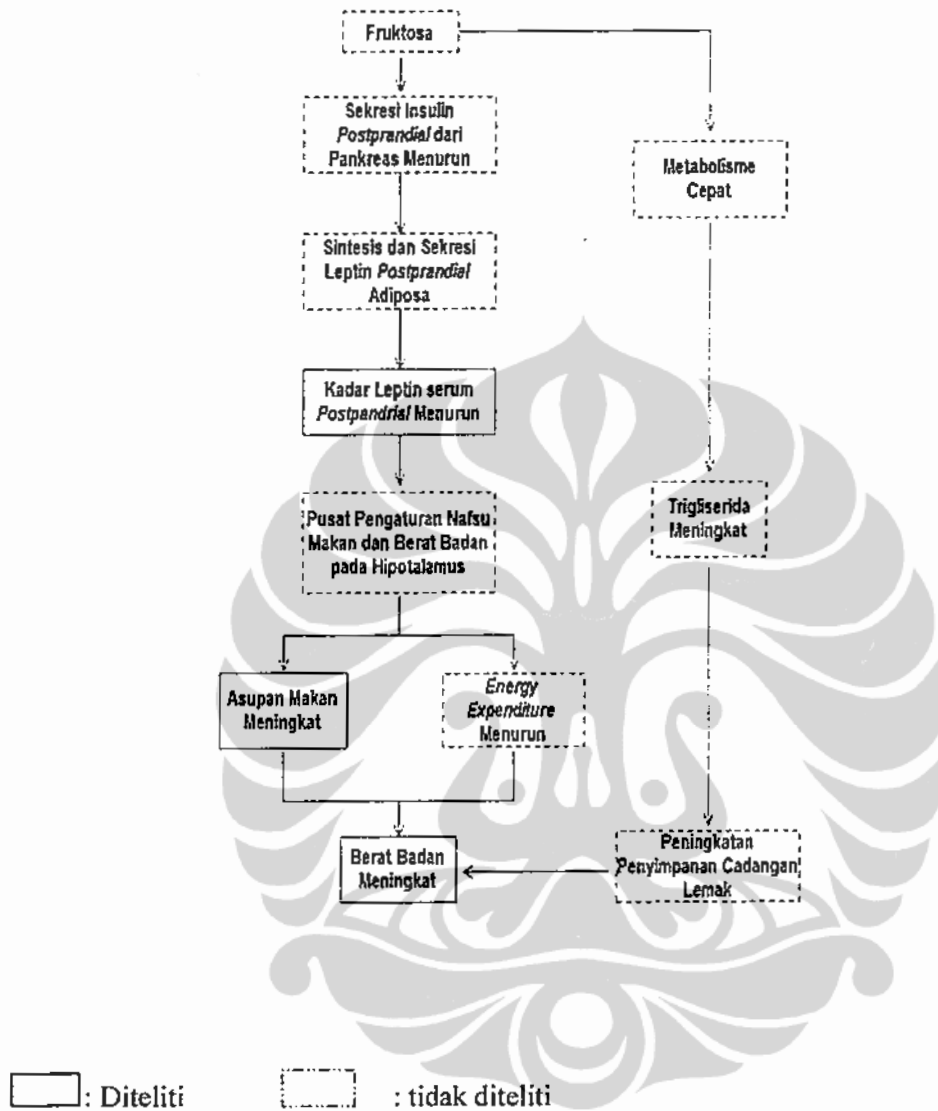
Gambar 11. Ringkasan perbedaan fruktosa dan glukosa terhadap sinyal endokrin regulasi asupan makanan dan berat badan

4. Kerangka Teori Penelitian



Gambar 12. Pengaruh fruktosa terhadap long-acting adiposity signal dan berat badan

5. Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 13. Kerangka Konsep Penelitian

BAB III METODE PENELITIAN

1. Design Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental secara *in vivo* pada tiga kelompok tikus jantan spesies *Sprague-Dawley* sehat yang berusia 8-10 minggu dengan berat badan berkisar antara 150-200 gram. Kelompok I adalah kelompok kontrol, kelompok II diberikan larutan glukosa 43% dengan dosis 2mL/100 g BB/hari, kelompok III diberikan larutan fruktosa 43% dengan dosis 2 mL/100 g BB/hari. Parameter yang diukur adalah jumlah asupan makanan, penambahan berat badan dan kadar hormon leptin *postprandial* dalam serum tikus yang telah mendapatkan perlakuan selama 15 hari. Pemeriksaan hormon leptin pada serum tikus menggunakan metode ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Hasil pengukuran merupakan data dengan skala numerik untuk membandingkan kadar hormon leptin *postprandial*, jumlah asupan makanan, dan berat badan tikus pada tiga kelompok. Pengolahan data akan dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS versi 13. Sebelum dilakukan uji analisis data, semua data hasil penelitian dilakukan uji normalitas dengan *Kolmogorov – Smirnov*. Jika hasil uji normalitas menunjukkan distribusi data normal, maka uji statistik yang digunakan adalah uji Anova – 1 arah (*one-Way Anova*). Kemudian, bila dengan uji Anova diperoleh nilai yang bermakna maka dilakukan analisis Pasca Hoc dengan metode Tukey. Tetapi, jika dengan uji normalitas didapatkan hasil distribusi data tidak normal, dan setelah dilakukan transformasi data tetap menunjukkan distribusi data tidak normal maka uji statistik yang digunakan adalah uji Kruskal–Wallis yang akan dilanjutkan dengan analisa Pasca Hoc Mann-Whitney.⁴¹

2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Hewan Percobaan Badan Litbang Kes Kementrian Kesehatan RI. Pemeriksaan hormon leptin dilakukan di laboratorium Makmal Terpadu Imunoendokrinologi FKUI. Waktu penelitian kurang lebih 6

bulan (Desember 2009 – Mei 2010). Lolos kaji etik didapat dari Panitia Tetap Etik Penelitian Kedokteran/Kesehatan FKUI/RSCM.

3. Variabel dan Sampel Penelitian

Variabel yang diukur adalah kadar hormon leptin *postprandial* serum tikus, jumlah asupan makanan perhari dan perubahan berat badan. Sampel adalah tikus jantan *Sprague-Dawley* berusia 8-10 minggu dengan berat badan berkisar 150-200 gram, didapat dari Laboratorium Hewan Percobaan Badan Litbang Kes Kementrian Kesehatan RI.

Banyaknya ulangan pada 3 kelompok perlakuan dihitung dengan rumus Federer berikut:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

$$(3-1)(n-1) \geq 15$$

$$2(n-1) \geq 15$$

$$2n-1 \geq 15$$

$$n \geq 8$$

Dengan demikian jumlah sampel minimal per kelompok sebanyak 8 ekor tikus. Penelitian ini menggunakan 10 ekor tikus untuk setiap perlakuan sehingga total sampel untuk 3 perlakuan ialah 30 sampel.

4. Bahan dan Alat Penelitian

4.1 Bahan Penelitian

- Serum yang diambil dari darah jantung tikus *Sprague-Dawley* sehat yang berusia 8-10 minggu.
- Larutan glukosa 43% dan larutan fruktosa 43%.
- Makanan tikus standar
- Air minum tikus
- KIT untuk pemeriksaan leptin (millipore Inc. USA), terdiri dari:
 1. Rat leptin ELISA plate yang telah dilapisi dengan antibodi (Rat/Mouse Leptin ELISA Plate Coated with pre-titered capture antibodies) terdiri dari 96 well
 2. *Adhesive plate sealer*
 3. Antiserum leptin tikus (*pre-titered anti rodent leptin serum*)

4. Larutan bufer pencuci 50 mM *tris buffered saline* yang mengandung Tween-20
5. Larutan standard leptin tikus dalam bufer dengan konsentrasi 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30 ng/mL
6. *Quality controls* 1 dan 2 (yang mengandung berbagai peptida termasuk leptin dalam *buffer quality control*).
7. *Rat leptin matrix solution* (mengandung 0,08% sodium azida)
8. Larutan *assay buffer*, yaitu 0,05 M phosphosaline, pH 7,4, mengandung 0,025 M EDTA, 0,08% sodium azida, 0,05% triton X-100 dan 1% BSA.
9. *Rat leptin detection antibody: biotinylated anti mouse leptin antibody*
10. Larutan enzim: *streptavidin-horseradish peroxidase conjugate* dalam bufer.
11. Substrat: 3,3',5,5' - *tetramethylbenzidine* dalam bufer
12. *Stop solution*: 0,3 M HCl

4.2 Alat Penelitian

- a. Pada proses pemeliharaan tikus dibutuhkan alat:
 1. Laminar air flow, untuk menjaga area kerja tetap steril
 2. Kandang gantung aluminium (satu buah kandang per tikus)
 3. Timbangan hewan (*Triple beam balance* OHAUS)
 4. Tempat pakan tikus
 5. Botol air kapasitas 500 mL.
 6. oven pengering
 7. Sonde tikus

- b. Pada proses pengambilan sampel serum tikus dibutuhkan alat:
 1. Bejana tertutup berisi uap eter untuk anestesi tikus
 2. meja bedah dan alat fiksasi tikus
 3. gunting
 4. Pinset
 5. Spuit 3 cc
 6. Tabung sentrifuse 5 mL

7. Boks pendingin

7. Alat sentrifuse dingin ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$)

c. Pada proses pengukuran kadar leptin dengan metode ELISA dibutuhkan alat:

1. pipet dan ujung pipet: 10 μL -20 μL dan 20 μL - 100 μL

2. Pipet dan ujung pipet *multichannel*: 0-50 μL dan 50-300 μL

3. reservoir untuk buffer dan regansia

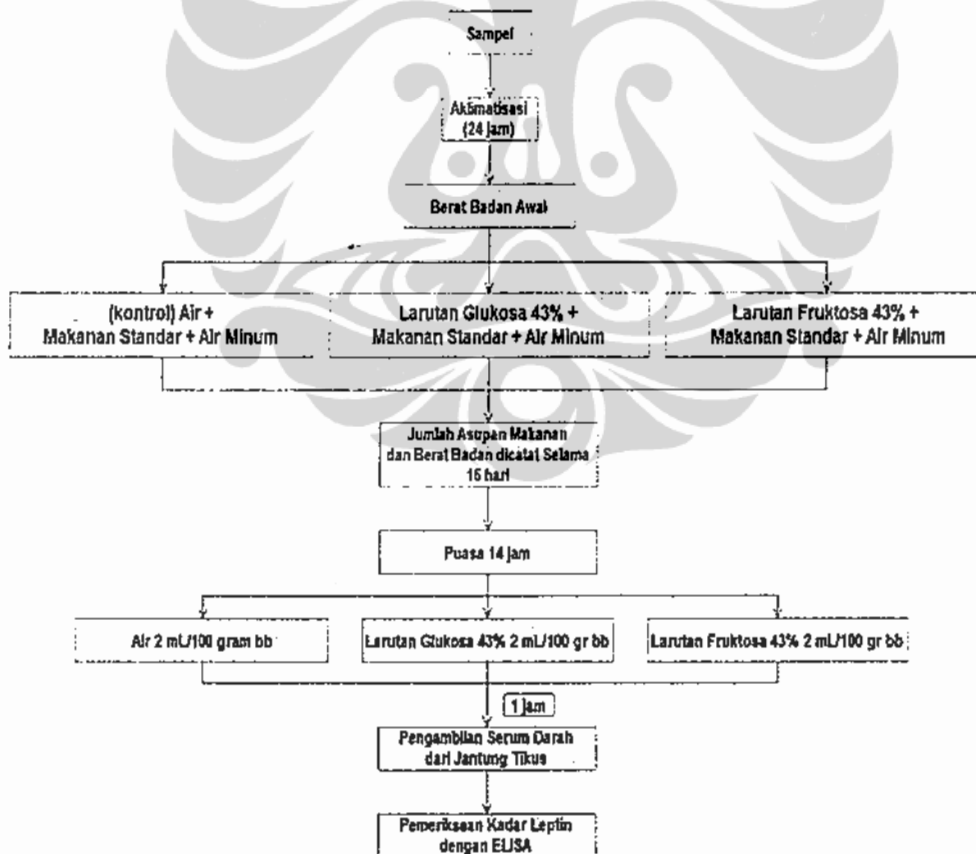
4. Vortex mixer

5. spektrofotometer yang dapat membaca absorbency pada panjang gelombang 450 nm dan 540 nm

6. Orbital microtiter plate shaker

7. Absorbent paper

5. Alur Penelitian



Gambar 14. Alur Penelitian

6. Cara Kerja

6.1 Seleksi Hewan Uji (kriteria Inklusi)

Hewan uji berupa tikus *Sprague-Dawley* sehat jantan berumur 8-10 minggu dengan berat badan berkisar 150-200 gram dari Laboratorium Hewan Percobaan Badan Litbang Kes Kementerian Kesehatan RI, kemudian dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan. Tiap kelompok terdiri dari 10 ekor tikus dengan rata-rata berat badan kelompok kontrol $178,81 \pm 12,34$ gram, kelompok perlakuan dengan larutan tinggi glukosa $178,52 \pm 11,61$ gram dan kelompok perlakuan dengan larutan tinggi fruktosa $175,45 \pm 13,27$ gram

6.2 Penanganan dan Prosedur Pemeliharaan Hewan Uji

Hewan uji dipelihara dalam kandang secara individual, dengan ventilasi cukup dalam suhu ruangan antara 18-26°C dengan kelembaban 30-70%. Penerangan ruangan 12 jam gelap dan 12 jam terang. Tikus diberi makanan standar yang mengandung serat 5%, protein 21-23%, dan lemak 5% (dari jumlah total makanan), diletakkan dalam pot makanan dengan jumlah yang sama yang telah ditentukan untuk setiap tikus. Untuk air minum digunakan air yang sudah disaring dan diletakkan dalam botol dengan volume 500 mL. Kandang tikus dibersihkan setiap hari dan tikus dipelihara kesehatannya.

Setiap hari dilakukan penimbangan jumlah sisa makanan dan berat badan tikus pagi hari (pukul 07.00 Wib). Jumlah asupan makanan tikus perhari dicatat dan dihitung dengan mengurangi jumlah makanan yang disediakan pada hari sebelumnya dengan jumlah makanan sisa (baik yang tersisa pada pot ataupun yang tercecer pada kandang).

Kelompok kontrol diberikan larutan kontrol (air), kelompok perlakuan pertama diberikan glukosa 43%-2 mL/100 g BB/hari sebanding dengan diet tinggi glukosa 1,5 g/kg BB/hari pada manusia, dan kelompok perlakuan 2 diberikan fruktosa 43%-2 mL/100 g BB/hari sebanding dengan diet tinggi fruktosa 1,5 g/kg BB/hari pada manusia. Larutan kontrol (air), larutan glukosa atau larutan fruktosa diberikan secara per oral dengan sonde sesuai dengan berat badan tikus setiap hari

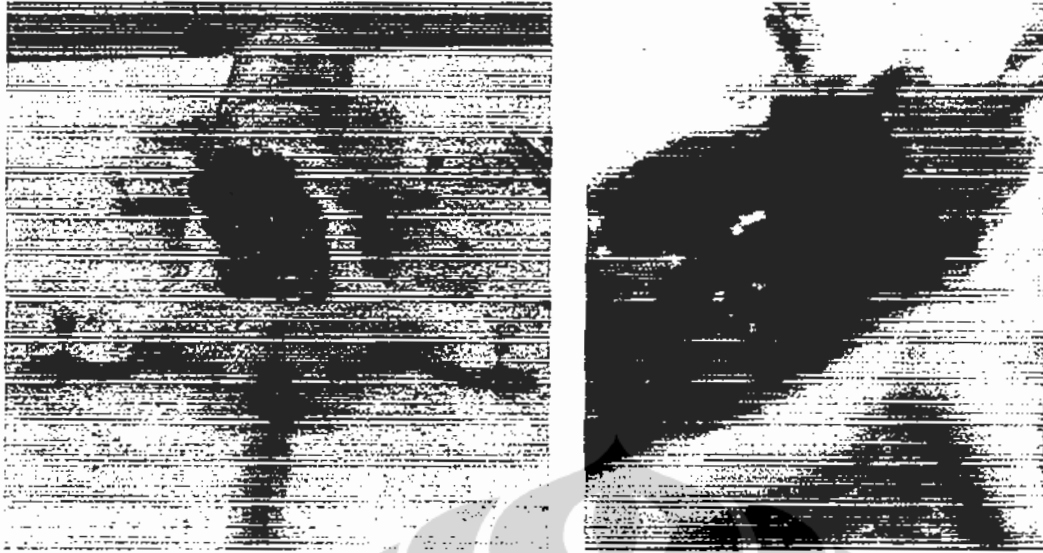
dibagi menjadi dua dosis, diberikan pada pukul 09.00 wib dan pukul 17.00 wib. Perlakuan dilaksanakan selama 15 hari.



Gambar 15 . Pemeliharaan hewan uji

6.3 Pengambilan darah Tikus

Empat belas jam sebelum dilakukan pengambilan darah, tikus dipuaskan. Keesokan harinya tikus kelompok kontrol diberikan diberikan larutan kontrol (air), kelompok perlakuan pertama diberikan glukosa 43%-2 mL/100 g BB dan kelompok perlakuan 2 diberikan fruktosa 43%-2 mL/100 g BB secara per oral dengan sonde sesuai dengan berat badan tikus. Satu jam kemudian dilakukan prosedur pengambilan darah tikus dari jantung, yaitu tikus dimasukkan ke dalam bejana yang telah dijenuhkan dengan uap eter selama ± 5 menit sampai tikus kehilangan kesadaran. Kemudian, tikus difiksasi pada meja bedah dan dilakukan pembedahan sampai jantung tikus terlihat. Darah diambil dari jantung tikus dengan spuit 3 mL sebanyak 2-3 mL dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus 5 mL tanpa mengandung antikoagulan. Kemudian darah dalam tabung dibiarkan berkoagulasi pada suhu ruangan minimal selama 30 menit.



Gambar 16. Prosedur pengambilan darah tikus

6.4 Pembuatan Serum

Darah yang telah mengalami clotting dalam tabung sentrifus diputar dengan sentrifus dingin dengan kecepatan 2000 sampai 3000 x g selama 15 menit pada suhu $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Serum diambil dengan pipet pasteur dipindahkan dalam tabung lain dan disimpan pada suhu -20°C . Masing-masing tabung diberi tanggal dan identitas.

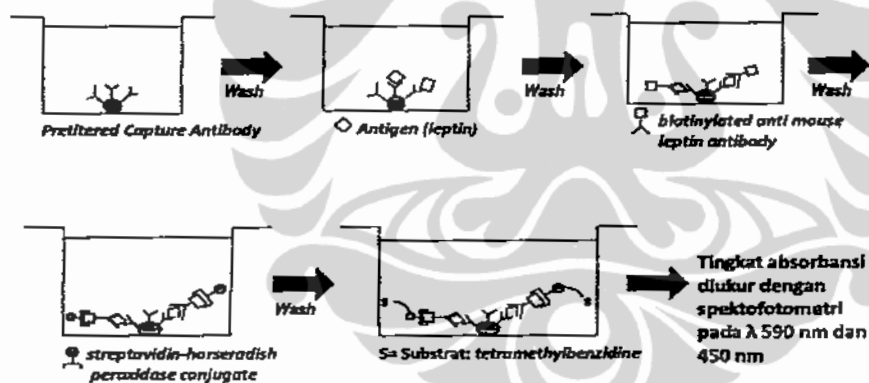
6.5 Pembuatan Larutan Glukosa dan Fruktosa

Larutan glukosa 43% didapat dengan cara melarutkan kristal glukosa (Merc. Inc USA) sebanyak 43 gram dalam air sampai volume total larutan menjadi 100 mL. Sedangkan larutan fruktosa 43% didapat dengan cara melarutkan kristal fruktosa (Merc. Inc USA) sebanyak 43 gram dalam air sampai volume total larutan menjadi 100 mL. Larutan disimpan dalam lemari es dengan suhu 4°C .

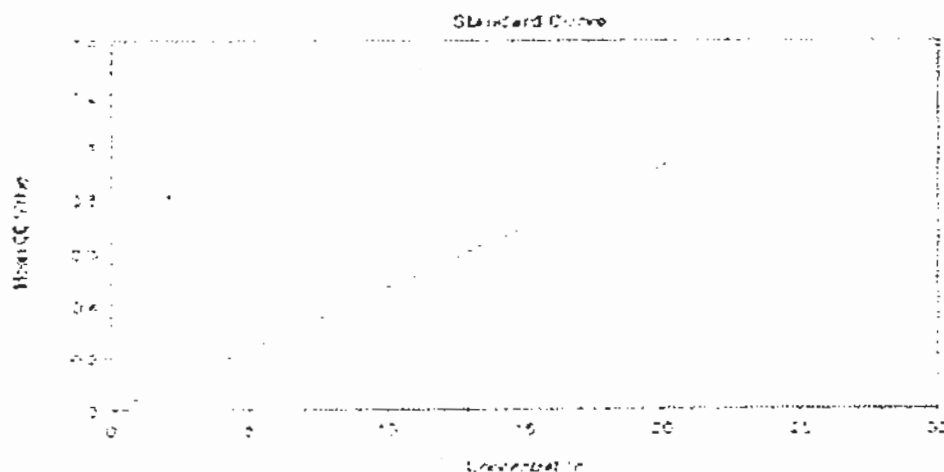
6.6. Pemeriksaan Hormon Leptin

Pemeriksaan hormon leptin berdasarkan pada teknik pemeriksaan *Sandwich* ELISA (gambar 17). Prinsip prosedur pemeriksaan ini adalah: (1) ikatan leptin dengan *pretiter antibody-coated well* yang menghasilkan kompleks antigen antibodi yang diimobilisasi pada sumur plate mikrotiter, (2) Ikatan antara *biotinylated antimouse leptin antibody* dengan leptin yang telah diimobilisasi

tersebut setelah dilakukan pencucian (3) Ikatan antara enzim *Streptavidine-horseradish peroxidase conjugate* dengan *biotinylated anti mouse leptin antibody* yang diimmobilisasi setelah dicuci untuk menghilangkan sisa *biotinylated antibody* yang bebas, (4) Pencucian untuk menghilangkan semua konjugat enzim yang bebas, (5) Ikatan antara substrat 3,3',5,5'-*tetramethylbenzidine* dengan enzim sehingga dapat dilakukan perhitungan konjugat *immobilized antibody-enzyme* dengan memonitor aktivitas *horseradish peroksidase* dalam keadaan adanya substrat tersebut. Aktivitas enzim ini diukur dengan spektrofotometri untuk melihat tingkat absorbansinya pada panjang gelombang 590 nm dan dikoreksi pada panjang gelombang 450 nm setelah dilakukan pengasaman produk yang terbentuk. Tingkat penyerapan pada panjang gelombang tersebut secara langsung proporsional dengan jumlah leptin yang terkandung dalam sampel yang dapat diinterpolasikan dari referensi kurva standar yang dihasilkan dari larutan standar yang telah diketahui konsentrasinya (gambar 18).



Gambar 17. Prinsip pemeriksaan Leptin dengan teknik Sandwich ELISA



Gambar 18. Kurva standar pemeriksaan kadar hormon Leptin

7. Batasan Operasional

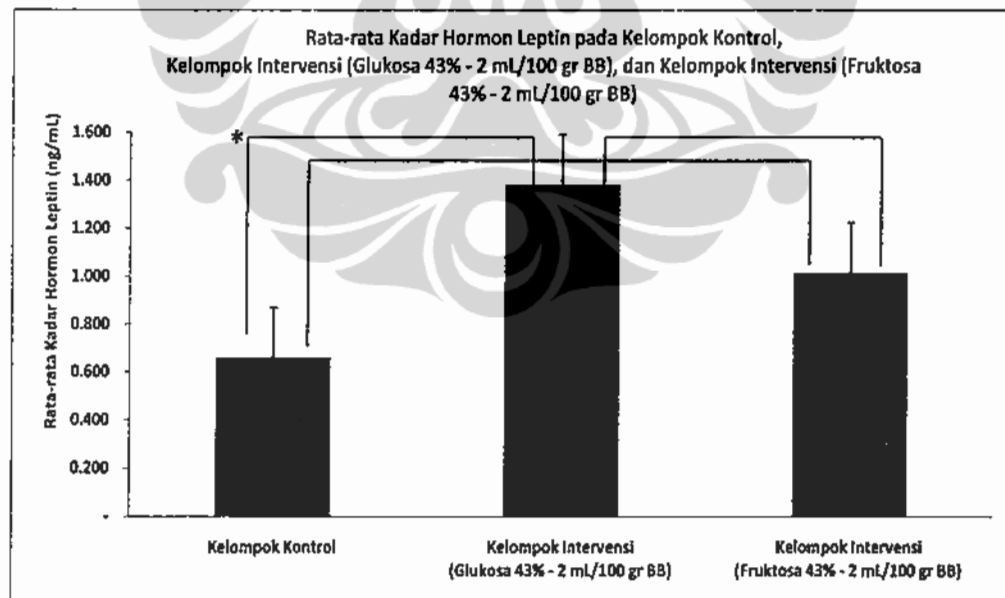
1. Kadar leptin *postprandial* serum: kadar leptin serum tikus yang diukur dengan teknik ELISA dalam satuan ng/mL setelah satu jam tikus diberi larutan kontrol, larutan glukosa atau larutan fruktosa (setelah sebelumnya tikus dipuaskan 14 jam) yang diukur pada hari ke 15 setelah perlakuan.
2. Asupan makanan: jumlah total makanan standar yang dimakan tikus dalam 24 jam dalam satuan gram yang dihitung dari pengurangan jumlah makanan yang disediakan dalam pot pada pukul 09.00 WIB hari sebelumnya dengan dengan jumlah makanan yang tersisa pada pukul 09.00 WIB hari berikutnya
3. Pertambahan berat badan: Selisih (pertambahan) berat badan tikus sebelum perlakuan dengan berat badan tikus pada hari ke-15 dalam satuan gram.
4. Larutan glukosa 43%: larutan yang dibuat dari campuran 43 gram serbuk glukosa dan air sampai volumenya mencapai 100 mL
5. Larutan fruktosa 43%: larutan yang dibuat dari campuran 43 gram kristal fruktosa dengan air aquadesr sampai volume larutan mencapai 100 mL
6. Makanan standar: makanan tikus standar berupa pelet dihaluskan mengandung serat 5%, protein 21-23%, dan lemak 5% dari jumlah total makanan.

BAB IV HASIL PENELITIAN

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Hewan Percobaan Badan Litbang Kes. Kementrian Kesehatan RI dan laboratorium Makmal Terpadu Imunoendokrinologi FK UI pada Februari 2010 – Maret 2010. Parameter yang diukur adalah jumlah asupan makanan, penambahan berat badan dan kadar hormon leptin *postprandial* serum tikus yang telah mendapatkan perlakuan selama 15 hari.

1. Rata-rata Kadar Hormon Leptin *Postprandial*

Rata-rata kadar hormon leptin *postprandial* pada kelompok kontrol adalah $0,662 \pm 0,38$ ng/mL, rata-rata pada kelompok perlakuan dengan glukosa 43%-2 mL/100 g BB/hari adalah $1,383 \pm 0,49$ ng/mL, dan rata-rata pada kelompok perlakuan dengan fruktosa 43%-2 mL/100 g BB/hari adalah $1,016 \pm 0,67$ ng/mL (tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa rata-rata kadar hormon leptin *postprandial* lebih tinggi pada kelompok perlakuan dengan glukosa 43%-2 mL/100 g BB/hari (gambar 19).

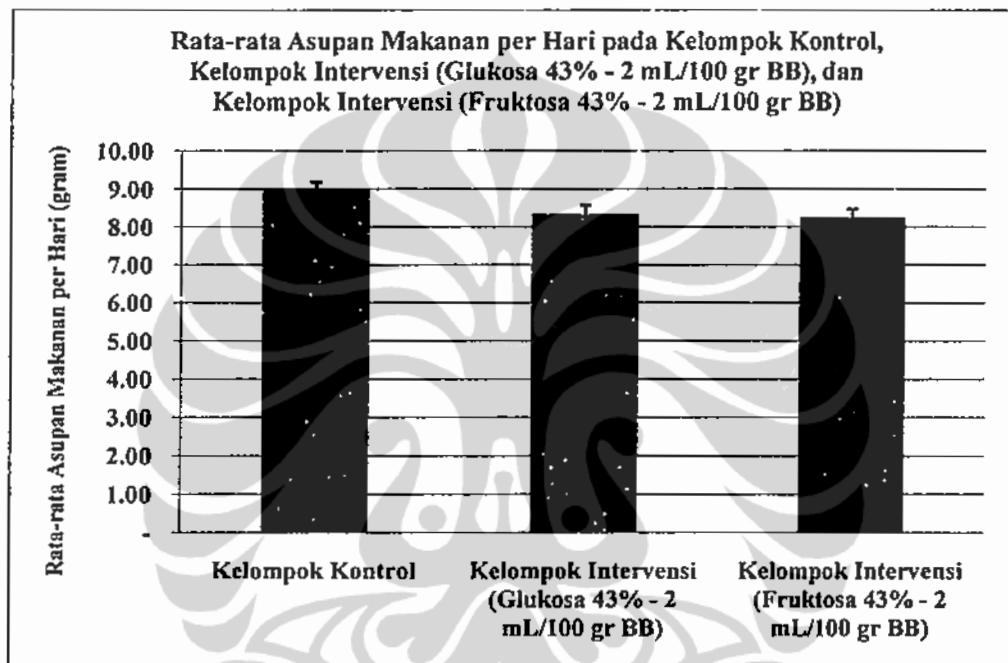


Ket. * $P < 0,05$

Gambar 19. Rata-rata kadar hormon Leptin pada kelompok hewan uji

2. Rata-rata Asupan Makanan Perhari

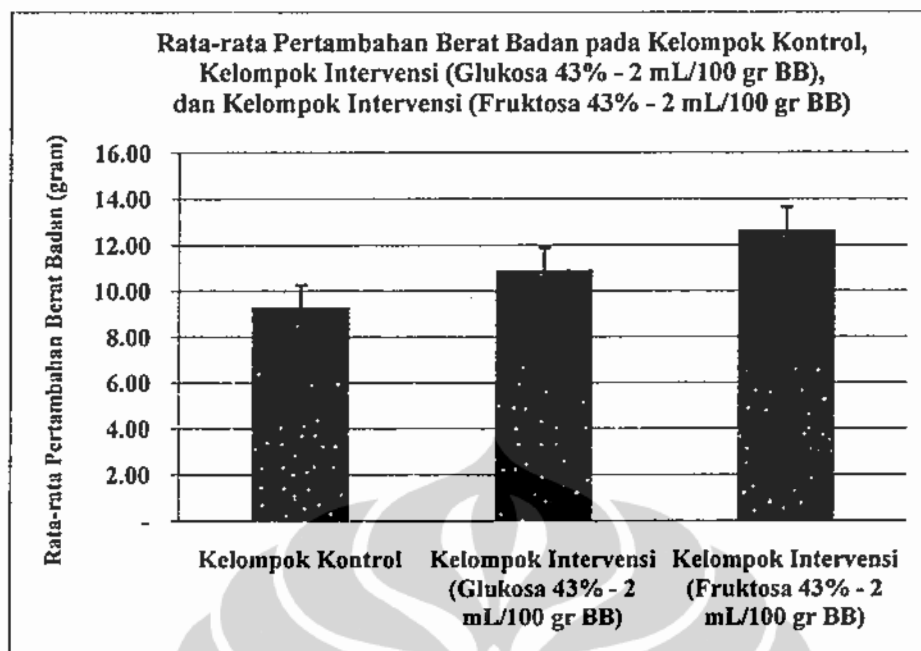
Rata-rata asupan makanan tikus per hari pada kelompok kontrol adalah $8,98 \pm 0,79$ gram, rata-rata pada kelompok perlakuan glukosa 43% adalah $8,35 \pm 0,71$ gram, dan rata-rata pada kelompok perlakuan fruktosa 43% adalah $8,26 \pm 0,97$ gram (tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa rata-rata asupan makanan per hari lebih besar pada kelompok kontrol (gambar 20).



Gambar 20. Rata-rata asupan makanan per hari pada kelompok hewan uji

3. Rata-rata Pertambahan Berat Badan Tikus Setelah 15 hari Perlakuan

Rata-rata pertambahan berat badan pada kelompok kontrol adalah $9,29 \pm 5,90$ gram, rata-rata pada kelompok perlakuan dengan glukosa 43% adalah $10,92 \pm 6,23$ gram, dan rata-rata pada kelompok perlakuan dengan fruktosa 43% adalah $12,66 \pm 4,41$ gram. Hal ini menunjukkan bahwa rata-rata pertambahan berat badan lebih tinggi pada kelompok perlakuan fruktosa 43% (gambar 21).



Gambar 21. Rata-rata pertambahan berat badan pada kelompok hewan uji

Tabel 1. Perbedaan Rata-rata Kadar Hormon Leptin *Postprandial*, Asupan Makanan, dan Pertambahan Berat Badan Pada Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan

| Variabel | Mean \pm (SD) | | | Hasil Uji Statistik |
|-------------------------|------------------|---|--|------------------------|
| | Kelompok Kontrol | Kelompok Intervensi (Glukosa 43% - 2 mL/100 g BB) | Kelompok Intervensi (Fruktosa 43% - 2 mL / 100 g BB) | |
| Kadar Leptin | 0,662 \pm 0,38 | 1,383 \pm 0,49 | 1,016 \pm 0,67 | F = 4,693 p = 0,018 |
| Asupan Makanan | 8,98 \pm 0,79 | 8,35 \pm 0,71 | 8,26 \pm 0,97 | F = 2,288 p = 0,121 |
| Pertambahan Berat Badan | 9,29 \pm 5,90 | 10,92 \pm 6,23 | 12,66 \pm 4,41 | F = 0,915 p = 0,413 |

Dari tabel di atas dapat dilihat bahwa kadar hormon leptin *postprandial* antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan secara statistik berbeda bermakna, hal ini terlihat dari hasil uji statistik $p = 0,018$ ($p < 0,05$). Dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan bermakna rata-rata kadar hormon leptin *postprandial* antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Untuk melihat perbedaan antar kelompok mana yang berbeda bermakna secara statistik maka dilakukan analisis

multicomparison dengan metode Tukey (tabel 2). Dari tabel dapat dilihat bahwa perbedaan kadar hormon leptin *postprandial* secara statistik bermakna antar kelompok kontrol dan kelompok dengan intervensi glukosa 43%, hal ini terlihat dari nilai $p=0,013$ ($p<0,05$). Sedangkan tidak terdapat perbedaan bermakna rata-rata kadar leptin antar kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan fruktosa 43% tikus/hari maupun antar kelompok perlakuan dengan glukosa 43% dan kelompok perlakuan dengan fruktosa 43%. Hal ini menunjukkan bahwa kadar leptin *postprandial* akan meningkat secara bermakna setelah tikus mengkonsumsi glukosa, sedangkan setelah mengkonsumsi fruktosa atau larutan kontrol tidak meningkat secara bermakna. Kadar hormon leptin *postprandial* setelah mengkonsumsi fruktosa lebih rendah daripada kadar leptin *postprandial* setelah mengkonsumsi glukosa.

Tabel 2. Hasil analisis multicomparison dengan metode Tukey kadar leptin *postprandial* pada kelompok kontrol dan perlakuan

| Variabel | Variabel | P |
|--|---|--------------------|
| Klp kontrol | Klp intervensi (glukosa 43%-2 mL/100 g BB) | 0,013 [*] |
| | Klp intervensi (fruktosa 43%-2 mL/100 g BB) | 0,304 |
| Klp Intervensi (glukosa 43%-2 mL/100 g BB) | Klp kontrol | 0,013 [*] |
| | Klp. Intervensi (fruktosa 43%-2mL/100 g BB) | 0,281 |
| Intervensi (fruktosa 43%-2mL/100 g BB) | Klp kontrol | 0,304 |
| | Klp intervensi (glukosa 43%-2mL/100 g BB) | 0,281 |

Dari tabel 1 terlihat bahwa jumlah asupan makanan antar kelompok kontrol dan kelompok perlakuan secara statistik tidak menunjukkan perbedaan bermakna, hal ini dapat dilihat dari nilai $p=0,121$ ($p>0,05$). Tetapi secara deskriptif dapat dilihat kecenderungan bahwa jumlah asupan makanan pada kelompok kontrol paling tinggi, kemudian diikuti kelompok intervensi dengan glukosa 43% dan terakhir kelompok intervensi dengan fruktosa glukosa 43%.

Dari tabel 1 terlihat bahwa penambahan berat badan antar kelompok kontrol dan kelompok perlakuan secara statistik tidak menunjukkan perbedaan bermakna, hal ini dapat dilihat dari nilai $p=0,415$ ($p>0,05$). Tetapi secara deskriptif dapat dilihat kecenderungan bahwa penambahan berat badan pada

kelompok perlakuan dengan fruktosa 43% paling tinggi, kemudian diikuti kelompok perlakuan dengan glukosa 43% dan terakhir kelompok kontrol.



BAB V

PEMBAHASAN

Akhir-akhir ini banyak *review* yang menelaah hasil publikasi penelitian, baik pada manusia dan hewan, yang meneliti peran potensial fruktosa pada penyebab obesitas dan penyakit metabolik, seperti *review* yang ditulis oleh Bray *et al.*,⁴ Malik *et al.*,⁵ Lee Ka *et al.*⁶ dan Bantle *et al.*⁷. Hasil telaah pustaka tersebut menunjukkan bahwa peningkatan konsumsi fruktosa kemungkinan berhubungan dengan peningkatan prevalensi obesitas dalam dua sampai tiga dekade terakhir ini. Diduga bahwa konsumsi fruktosa menyebabkan terjadinya keseimbangan energi positif sehingga berkontribusi dalam peningkatan berat badan dibandingkan monosakarida lainnya.

Hubungan sebab akibat diet fruktosa dan obesitas serta mekanisme patofisiologi penyebabnya secara tepat belum diketahui. Tetapi penelitian terbaru oleh Teff *et al.* telah mengidentifikasi pengaruh konsumsi fruktosa terhadap sistem endokrin yang terlibat dalam regulasi asupan makanan dan berat badan pada manusia, dan menunjukkan bahwa konsumsi fruktosa dibandingkan dengan konsumsi glukosa menyebabkan lebih rendahnya sekresi insulin dan produksi leptin dan melemahkan penekanan kadar *ghrelin* serum *postprandial* setelah dilakukan observasi selama 24 jam. Data ini memberikan penjelasan dengan pendekatan endokrin bahwa diet fruktosa berkontribusi untuk meningkatkan asupan makanan dan berat badan yang akhirnya menyebabkan obesitas.

Berdasarkan data tersebut maka penelitian ini dilakukan yang bertujuan untuk mengetahui perbandingan pengaruh diet tinggi fruktosa dan diet tinggi glukosa terhadap kadar leptin *postprandial* serum tikus dan pengaruhnya terhadap asupan makanan dan berat badan setelah dilakukan perlakuan selama 15 hari. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental secara *in vivo* dengan menggunakan desain paralel, acak pada tiga kelompok tikus jantan spesies *Sprague-Dawley*.

1. Kadar Hormon Leptin *Postprandial*

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kadar leptin serum *postprandial* tikus setelah 15 hari perlakuan lebih tinggi secara bermakna pada tikus yang mengkonsumsi glukosa 43%-2 mL/100 kg BB/hari dibandingkan kelompok kontrol, sedangkan kadar leptin serum *postprandial* setelah mengkonsumsi fruktosa 43%-2 mL/100 g BB/hari lebih tinggi dari kelompok kontrol tetapi tidak berbeda bermakna dan lebih rendah dalam kelompok perlakuan glukosa 43%-2 mL/100 g BB/hari. Hasil ini sejalan dengan hipotesis bahwa jumlah leptin *postprandial* yang dilepaskan ke sirkulasi darah diatur pada tingkat pasca transkripsi (translasi dan sekresi) yang dimodulasi secara akut dan dipengaruhi oleh kadar insulin serta ketersediaan substrat energi.^{14,15,27,28}

Meningkatnya kadar leptin *postprandial* secara bermakna setelah tikus diberi larutan glukosa kemungkinan disebabkan oleh dua hal. Pertama, pemberian larutan glukosa menyebabkan peningkatan glukosa darah yang kemudian di *uptake* oleh sel beta pankreas melalui GLUT2 sehingga meningkatkan sintesis dan sekresi insulin dari sel beta pankreas. Dengan demikian terjadi peningkatan kadar insulin darah. Peningkatan kadar insulin darah kemudian akan meningkatkan sintesis (translasi) dan sekresi leptin dari jaringan adiposa dalam waktu 30 menit, dengan demikian terjadi peningkatan kadar leptin darah dalam jangka pendek (1-2 jam) *postprandial*. Kedua, glukosa darah juga akan di *uptake* oleh sel adiposa dengan bantuan insulin. Glukosa ini menyediakan substrat energi bagi adiposa yang membantu meningkatkan translasi leptin dalam sel adiposa.

Peningkatan insulin darah yang diikuti oleh meningkatnya kadar leptin darah dapat dilihat pada penelitian sebelumnya, yang dilakukan oleh Teff *et al.*¹⁰ Akhavan *et al.*,¹² Stanhope *et al.*¹¹ dan Adam *et al.*³ Sedangkan bagaimana mekanisme insulin dapat meningkatkan kadar insulin darah baru-baru ini telah diungkapkan dalam penelitian Lee *et al.*¹⁴

Sebaliknya, peningkatan kadar leptin *postprandial* yang tidak bermakna setelah tikus diberi larutan fruktosa pada penelitian ini kemungkinan karena fruktosa tidak menyebabkan peningkatan kadar insulin karena pankreas tidak

memiliki transporter fruktosa GLUT5.^{2,23} Dengan demikian, tidak seperti glukosa, sintesis dan sekresi leptin oleh sel adiposa pada tikus yang diberi larutan fruktosa tidak dibantu oleh insulin.

Pada penelitian ini kadar leptin darah kelompok perlakuan fruktosa memiliki kecenderungan yang lebih tinggi daripada kelompok kontrol. Mekanisme fruktosa yang menyebabkan peningkatan kadar leptin darah yang lebih tinggi dari kelompok kontrol diantaranya, pertama, kemungkinan pemberian fruktosa dosis tinggi pada penelitian ini cukup untuk menyediakan substrat energi pada sel adiposa untuk meningkatkan sintesis leptin. Pada keadaan tidak ada glukosa maka *uptake* fruktosa oleh sel adiposa akan meningkat sampai dua kali lipat melalui GLUT5 dan kemungkinan GLUT4.⁴² Dengan demikian maka sintesis leptin dalam sel adiposa *postprandial* meningkat pada kelompok perlakuan fruktosa, sehingga kadar leptin *postprandialnya* lebih tinggi daripada kelompok kontrol tetapi tidak lebih tinggi dari kelompok perlakuan glukosa.

Kedua, pada penelitian ini, meskipun pengukuran kadar leptin darah dilakukan satu jam *postprandial* yang menggambarkan pengaruh akut keadaan setelah makan (*postprandial*) terhadap kadar leptin, tetapi perlu diingat bahwa pengukuran kadar leptin ini dilakukan setelah 15 hari tikus mendapat perlakuan, sehingga pengaruh kronik perlakuan tersebut juga turut mempengaruhi jumlah kadar leptin *postprandialnya*. Hal ini disebabkan oleh adanya pengaruh perlakuan pada level transkripsi yang turut berkontribusi mempengaruhi hasil kadar leptin yang diukur pada penelitian ini. Perlakuan jangka panjang menyebabkan terjadinya perbedaan ukuran sel adiposa yang proporsional dengan level m-RNA leptin sehingga turut mempengaruhi jumlah leptin yang dilepas dalam sirkulasi. Pada penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa terdapat korelasi positif antara jumlah mRNA leptin, dengan jumlah leptin pada jaringan adiposa dan dalam sirkulasi darah.^{14,19,43} Maka, karena pada penelitian ini berat badan tikus kelompok perlakuan fruktosa lebih tinggi dari kelompok lainnya maka produksi leptin basal kelompok tikus yang mendapatkan perlakuan fruktosa lebih besar daripada kelompok kontrol yang proporsional dengan ukuran sel adiposanya. Sedangkan pada kelompok tikus yang mendapatkan perlakuan glukosa

pertambahan berat badannya lebih kecil dibandingkan kelompok perlakuan fruktosa tetapi kadar leptin darahnya paling tinggi karena dipengaruhi oleh insulin.

2. Rata-rata Asupan Makanan Per hari

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat kecenderungan jumlah asupan makanan per hari pada kelompok kontrol lebih tinggi dibandingkan kelompok lainnya, kemudian diikuti kelompok perlakuan dengan glukosa 43%-2 mL/100 g BB dan terakhir kelompok perlakuan dengan fruktosa 43%-2 mL/100 g BB. Jadi, kelompok tikus dengan perlakuan fruktosa justru jumlah asupan makanan per harinya paling kecil. Hasil ini tidak sesuai dengan hipotesis awal yang menyebutkan bahwa fruktosa dapat menyebabkan *overconsumption* karena pemberian fruktosa tidak menyebabkan peningkatan kadar insulin dan leptin darah. Dengan demikian penekanan nafsu makan atau sinyal kenyang yang terbentuk setelah mengkonsumsi fruktosa menjadi terhambat.

Sebenarnya, penelitian sebelumnya mengenai perbandingan pengaruh konsumsi glukosa dan fruktosa terhadap jumlah asupan makanan masih kontroversial.⁴⁴⁻⁴⁷ Hal ini dipengaruhi oleh protokol penelitian yang berbeda-beda, diantaranya dipengaruhi oleh jenis perlakuan yang diberikan dalam bentuk padat atau cairan, dosis, waktu dan cara pemberian.

Kelompok perlakuan memiliki jumlah asupan makanan yang lebih kecil daripada kelompok kontrol karena kelompok perlakuan melakukan kompensasi dengan mengurangi asupan makan karena beberapa hal. Pertama, kelompok perlakuan telah mendapatkan tambahan energi dari cairan yang diberikan. Kedua, cairan yang diberikan memiliki rasa yang manis sehingga juga turut berperan dalam menimbulkan rasa kenyang. Ketiga, kemungkinan berhubungan dengan faktor gastrointestinal dan sinyal kenyang yang berhubungan dengan perlakuan tersebut. Error! Bookmark not defined..

Jumlah asupan makanan kelompok perlakuan glukosa lebih kecil dari kelompok kontrol kemungkinan disebabkan oleh konsumsi glukosa yang

meningkatkan kadar gula darah, yang diikuti oleh meningkatnya kadar insulin dan leptin darah sehingga menekan nafsu makan.

Sedangkan faktor yang menyebabkan fruktosa memiliki efek yang relatif lebih kuat dalam menekan nafsu makan dibandingkan glukosa kemungkinan adalah faktor gastrointestinal.⁴⁸ Fruktosa diabsorpsi lebih lambat daripada glukosa, sehingga memungkinkan waktu kontak yang lebih lama dengan reseptor gastrointestinal dan menghasilkan sinyal kenyang yang lebih lama. Kontak nutrisi dengan usus halus dipascaulatkan merupakan sumber utama rasa kenyang pasca-gastrik yang dapat merangsang peptida kenyang. Peptida tersebut diantaranya glukagon, bombesin, gastrin, somatostatin, neurotensin, dan *glucagon-like peptide1*. Disamping itu, fruktosa diabsorpsi secara tidak lengkap sehingga menyebabkan lingkungan yang hiperosmolar pada usus besar. Cairan hiperosmolar ini dapat menyebabkan perasaan malaise dan dapat menurunkan asupan makanan.

Ditinjau dari indeks glikemik, fruktosa dan glukosa juga menyebabkan penekanan asupan makanan yang berbeda. Indeks glikemik sebenarnya ditentukan secara empiris, dan umum digunakan untuk membedakan dan membandingkan berbagai jenis nutrisi dan makanan yaitu untuk menggambarkan efek 50 gram karbohidrat pada suatu makanan terhadap kadar gula darah dibandingkan dengan 50 gram glukosa. GI berkisar antara 100 untuk glukosa dan 20 untuk fruktosa. Makanan dengan GI yang tinggi dilaporkan dapat menurunkan nafsu makan hanya dalam jangka pendek, sedangkan makanan dengan GI yang rendah efek kontrol asupan energinya lebih lambat tetapi lebih lama.

3. Pertambahan Berat Badan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pertambahan berat badan kelompok tikus yang mendapatkan perlakuan fruktosa lebih tinggi daripada kelompok lainnya meskipun jumlah asupan makanan per hari kelompok perlakuan fruktosa justru lebih rendah dari kelompok lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa keseimbangan energi positif yang terjadi pada kelompok perlakuan fruktosa bukan disebabkan karena peningkatan asupan energi melalui asupan makanan tetapi

disebabkan oleh faktor lainnya. Tetapi, kemungkinan faktor lainnya pada penelitian ini tidak dieksplorasi lebih lanjut karena keterbatasan penelitian.

Kemungkinan peningkatan berat badan yang lebih besar pada kelompok perlakuan fruktosa berdasarkan teori yang ada dapat diduga disebabkan oleh beberapa hal. Pertama, kelompok perlakuan fruktosa kemungkinan memiliki *energy expenditure* yang lebih rendah daripada kelompok perlakuan glukosa.⁴⁹ Hal ini amat mungkin terjadi karena kelompok tikus perlakuan fruktosa memiliki kadar leptin darah yang lebih rendah dari kelompok glukosa sehingga *energy expenditure*-nya juga lebih rendah. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk membuktikan hal ini dengan cara mengukur *energy expenditure* pada kedua kelompok tikus secara langsung.

Kemungkinan kedua, dibandingkan glukosa, fruktosa merupakan substrat yang lebih disukai hati untuk dibentuk menjadi trigliserida sehingga proses adipogenesis lebih tinggi dari kelompok glukosa. Penelitian yang dilakukan oleh Teff *et al.*,¹⁰ Stanhope *et al.*,¹¹ Chang *et al.*,⁸ menunjukkan bahwa konsumsi fruktosa dalam dosis tinggi menyebabkan terjadinya peningkatan trigliserida darah. Dan, berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Jurgens *et al.*,⁴⁹ pada kelompok tikus yang mendapatkan perlakuan fruktosa terjadi proses adipogenesis yang lebih tinggi dibandingkan kelompok lainnya karena proses metabolisme fruktosa terjadi lebih cepat dan menyediakan substrat lipogenik yang lebih banyak sehingga ukuran sel adiposanya menjadi lebih besar. Tetapi, karena keterbatasan penelitian, variabel jumlah lemak tubuh (*body fat*) pada tikus secara langsung tidak dilakukan pada penelitian ini.

Kemungkinan ketiga, pada kelompok perlakuan fruktosa seperti yang telah dijelaskan di atas, terjadi peningkatan kadar trigliserida darah.^{8,9} Peningkatan kadar trigliserida ini dapat menyebabkan menurunnya transpor leptin menembus *blood brain barrier* yang dapat menginduksi resistensi leptin.^{50,51} Dengan demikian, walaupun kadar leptin cukup tinggi pada kelompok perlakuan fruktosa dibandingkan kelompok kontrol, namun tidak cukup untuk mempertahankan berat badan tikus tersebut dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Oleh karena itu, untuk mengungkap keterlibatan langsung faktor-faktor di atas yang turut berkontribusi meningkatkan berat badan pada kelompok perlakuan fruktosa, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan pemeriksaan yang lebih lengkap seperti pemeriksaan *energy expenditure*, jumlah lemak tubuh tikus, dan kadar trigliserida darah tikus.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

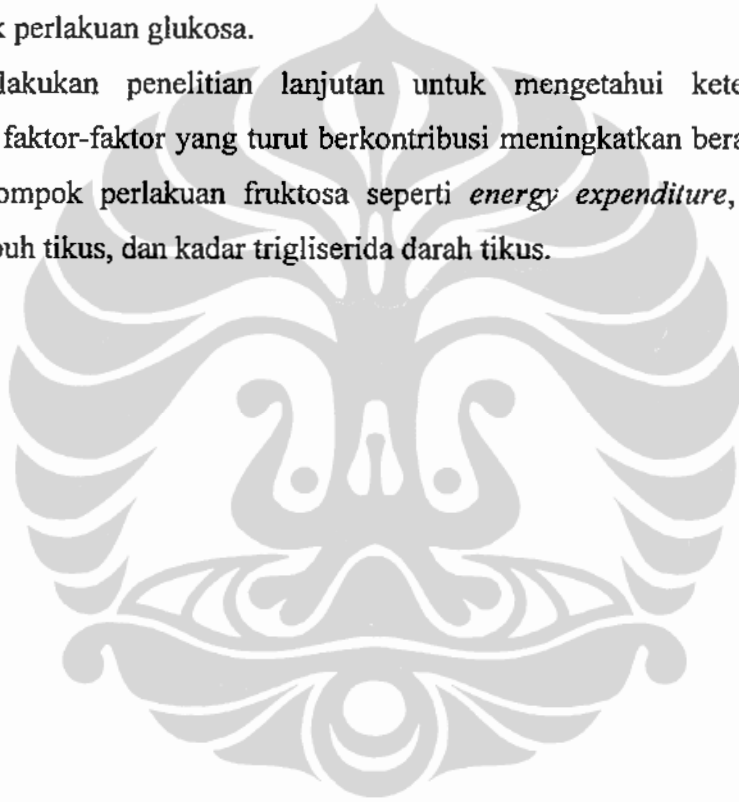
A. KESIMPULAN

1. Pemberian fruktosa 43%-2 mL/100 g BB pada tikus menyebabkan kadar leptin serum *postprandial* yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok tikus yang diberi glukosa 43%-2 mL/100 g BB.
2. Pemberian fruktosa 43%-2 mL/100 g BB pada tikus menyebabkan kecenderungan jumlah asupan makanan yang lebih rendah dibandingkan kelompok tikus yang diberi glukosa 43%-2 mL/100 g BB.
3. Pemberian fruktosa 43%-2 mL/100 g BB pada tikus menyebabkan kecenderungan peningkatan berat badan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok tikus yang diberi glukosa 43%-2 mL/100 g BB.

Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa pemberian fruktosa 43%-2 mL/100 g BB menyebabkan kecenderungan peningkatan berat badan yang lebih tinggi dibandingkan pemberian glukosa 43%-2 mL/100 g BB tetapi bukan disebabkan oleh peningkatan asupan makanan melainkan kemungkinan disebabkan faktor lainnya yang berhubungan dengan rendahnya kadar leptin serum *postprandial* pada kelompok tikus yang diberi fruktosa 43%-2 mL/100 g BB.

B. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan waktu yang lebih lama agar perbedaan peningkatan berat badan dan jumlah asupan makanan akibat perlakuan dengan fruktosa dan glukosa dapat terlihat lebih jelas.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui faktor-faktor yang menyebabkan fruktosa memiliki kecenderungan menyebabkan jumlah asupan makanan per hari yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan glukosa.
3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui keterlibatan langsung faktor-faktor yang turut berkontribusi meningkatkan berat badan pada kelompok perlakuan fruktosa seperti *energy expenditure*, jumlah lemak tubuh tikus, dan kadar trigliserida darah tikus.



DAFTAR PUSTAKA

1. Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition&metabolism*. 2005; 2: 5-10.
2. Douard V, Ferraris RP. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.2008; 295: E227–E37
3. Adams S.H, Stanhope K.L, Gant R.W, Cummings B.P, Havel P.J. Metabolic and endocrine profiles in response to systemic infusion of fructose and glucose in rhesus macaques. *Endocrinology*. June 2008; 149(6): 3002-8
4. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 537-43
5. Malik VS, Schulze MB, Hu FB. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2006; 84: 274-88
6. Le KA, Tappy L. Metabolic effect of fructose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9: 469-75
7. Bantle J.P. Dietary fructose and metabolic syndrome and diabetes. *J. Nutr*. 2009; 139: 1263S-8S
8. Chang F.M, Fielding B.A, Frayn K.N. Mechanism for the acute effect of fructose on postprandial lipemia. *Am J Clin Nutr*. 2007; 85: 1511-20
9. Schaefer E.J, Gleason J.A, Dansinger M.L. Dietary fructose and glucose differentially affect lipid and glucose homeostasis. *J Nutr*. 2009; 139: 1257S-62S
10. Teff KL, Elliott SS, Tschop M, et al. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2963–72
11. Stanhope K.L, Havel P.J. Endocrine and metabolic effects of consuming beverages sweetened with fructose, glucose, sucrose or high-fructose corn syrup. *Am J Clin Nutr*. 2008; 88: 1733S-37S
12. Akhavan T, Anderson G.H. Effects of glucose to fructose ratio in solutions on subjective satiety, food intake, and satiety hormones in young man. *Am J Clin Nutr*. Juli 2007; 86: 1354-63
13. Cummings D.E. Ghrelin and the short-term and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiology & Behavior*.2006; 89: 71–84

14. Lee M.J, Fried S.K. Integration of hormonal and nutrient signals that regulate leptin synthesis and secretion (review). *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296: E1230-38
15. Lee M.J, Fried S.K. Multilevel regulation of leptin storage, turnover, and secretion by feeding and insulin in rat adipose tissue. *Journal of lipid research.*2006; 47: 1984-93
16. Singh K.A, Boozer C.N, Vasselli J.R. Acute insulin-induced elevation of circulating leptin and feeding inhibition in lean but not obese rats. *Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol.*2005; 289: R373-R79
17. Lee M.J, Wang Y, Ricci M.R, Sullivan S, Russel C.D, Fried S.K. Acute and chronic regulation of leptin synthesis, storage, and secretion by insulin and dexamethason in human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*2006; 292: E858-E864
18. Carlson NR. *Physiology of behavior.* London: Allyn and bacon; 2010
19. Bear FM, Connors BW, Paradiso MA. *Neuroscience exploring the brain.* Philadelphia: Lippincott williams and wilkins; 2007
20. Voet D, Voet JG. *Biochemistry.* USA:John Wiley & Sons, Inc; 2004
21. Woods S.C. Gastrointestinal Satiety Signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 286: G7-G13
22. Rexford S, Ahima, Flier S. Leptin. *Annual review of physiology.*2000; 62: 413-37.
23. Bray, GaBC. *Handbook of Obesity:* Marcel Dekker Inc; 2004.
24. Pico C, Oliver P, Sanchez J, Palou A. Gastric leptin: a putative role in the short-term regulation of food intake. *British Journal of Nutrition.* 2003; 90: 735-41
25. Berthoud H.R. A new role for leptin as a direct satiety signal from the stomach. *Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol.* 2005; 288: 796-7
26. Fried SK, Ricci MR, Russell CD, Laferre`re B. Regulation of Leptin Production in Humans. *J. Nutr.* 2000; 130: 3127S-31S
27. Mueller WM, Gegoire FM, Stanhope KL, MoBBs CV, Mizuno TM, Warden CH, et al. Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology.*1998; 139: 551-58.
28. Cammisotto PG, Gelinias Y, Deshaies Y, Bukowiecki LJ. Regulation of leptin secretion from white adipocytes by insulin, glycolytic substrates, and amino acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*2005; 289: E166-E71

29. Zeigerer A, Rodeheffer M.S, McGaw T.E, Friedman J.M. Insulin regulates leptin secretion from 3T3-L1 adipocytes by a PI 3 kinase independent mechanism. *Experimental Cell Research*. 2008; 314: 2249-2256
30. Hajduch E, Darakhshan F, Hundal HS. Fructose uptake in rat adipocytes: GLUT5 expression and the effects of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 1998; 41: 821-8
31. Froesch ER, Ginsberg JL. Fructose metabolism of adipose tissue. I. Comparison of fructose and glucose metabolism in epididymal adipose tissue of normal rats. *J Biol Chem*. 1962; 237: 3317-24
32. Litherland GJ, Hajduch E, Gould GW, Hundal HS. Fructose transport and metabolism in adipose tissue of Zucker rats: diminished GLUT5 activity during obesity and insulin resistance. *Mol Cell Biochem*. 2004; 261: 23-33
33. Uldry M, Thorens B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Eur J Physiol*. 2004; 447: 480-9
34. Mulrone S Myers. *Anetter's essential physiology*. New york: Elsevier; 2009
35. Muray KM, Ganner DK, Rodwell VW. *Harper's illustrated biochemistry*. New York: Mc. Gaw Hill Lange; 2006
36. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. USA: John Wiley & Sons Inc; 2004
37. Lieberman M, Mark AD. *Mark's basic medical biochemistry a clinical approach*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009
38. Michael E. Bizeau, Michael J. Pagliassotti T. Hepatic adaptations to sucrose and fructose. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2005; 54: 1189- 201
39. Devlin T.M (ed). *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. USA: Willey-Liss; 2006
40. Molina E.P. *Endocrine physiology*. New York: Lange Medical Books; 2006
41. Sastroasmoro S, Sofyan I. *Dasar-dasar metodologi penelitian klinis*. 2 ed. Jakarta: CV Sagung Seto; 2002
42. Froesch E.R, Ginsberg J.L. Fructose metabolism of adipose tissue. I. comperative of fructose and glucose metabolism in epididymal adipose tissue of normal rat. *J. Biol Chem*. 1962; 237: 3317-24
43. Fried SK, Ricci MR, Russell CD, Laferre're B. Regulation of Leptin Production in Humans. *J. Nutr*. 2000; 130: 3127S-31S
44. Moran T.H. Fructose and satiety. *J. Nutr*. 2009; 139: 1253-56

45. Lindqvist A, Baelemans A, Albertsson C.E. Effect of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regulatory peptides*. 2008; 150: 26-32
46. Kanarek R.B, Grambill O.N. Different effect of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. *J. Nutr.*1982; 112:1546-54
47. Tappy L, Kim A.L. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev*. 2010; 90: 23-46
48. Anderson G.H, Woodend D. Consumption of sugars and the regulation of short-term satiety and food intake. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2003;78 (4): 843S-9S
49. Jurgens H, Haass W, Castaneda T.R, Schurmann A.S, Koebnick C, Dombrowski F, et al. Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obesity research*. 2005; 13(7): 1146-56
50. Banks WA, Coon AB, Robinson SM, Moinuddin A, Shultz JM, Nakaoke R, Morley JE. Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes*. 2004; 53: 1253-60
51. Saphiro A, et al. Fructose induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high fat diet. *Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol*.2008; 295: 1370-75

LAMPIRAN 1

UJI NORMALITAS PADA KADAR LEPTIN, ASUPAN MAKANAN DAN BERAT BADAN

1. Tujuan

Untuk mengetahui apakah data kadar Leptin, asupan makanan dan berat badan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan mempunyai distribusi normal

2. Hipotesis

H_0 : Data kadar Leptin, asupan makanan dan berat badan berdistribusi normal

H_1 : Data kadar leptin, asupan makanan dan berat badan tidak berdistribusi normal

3. Kriteria Pengujian

Tolak H_0 bila asym. Sig (2 tailed) lebih kecil dari 0,05

4. Hasil perhitungan

N par Test

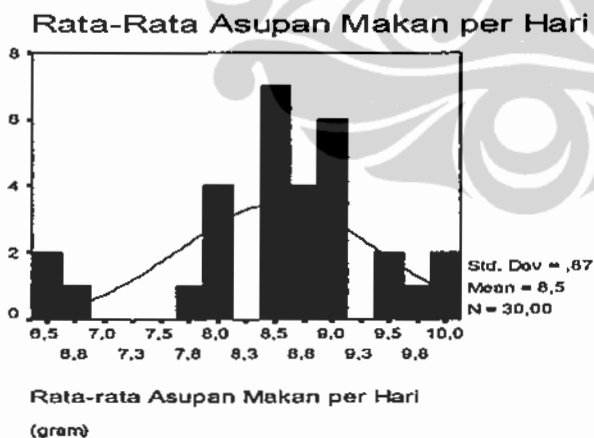
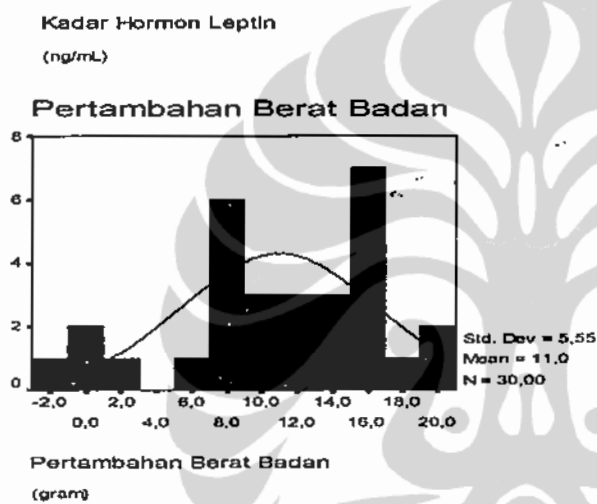
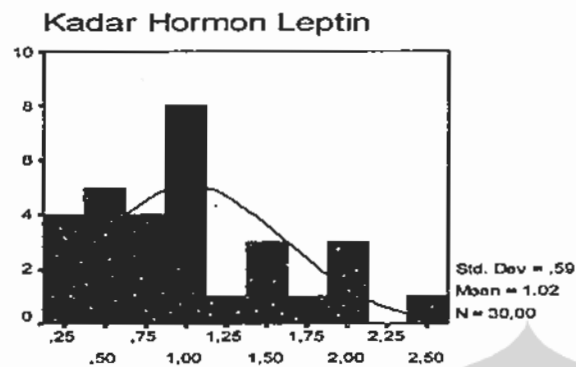
One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | Kadar Hormon Leptin | Pertambahan Berat Badan | Rata-rata Asupan Makan per Hari |
|--------------------------|----------------|---------------------|-------------------------|---------------------------------|
| N | | 30 | 30 | 30 |
| Normal Parameters(a,b) | Mean | 1,02043 | 10,957 | 8,523 |
| | Std. Deviation | ,589334 | 5,5550 | ,8661 |
| Most Extreme Differences | Absolute | ,142 | ,101 | ,177 |
| | Positive | ,142 | ,069 | ,132 |
| | Negative | -,069 | -,101 | -,177 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | ,779 | ,552 | ,968 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | ,578 | ,921 | ,306 |

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

Histogram



Rata-rata Asupan Makan per Hari
(gram)

5. Kesimpulan

Dari uji normalitas, variabel kadar hormon leptin, asupan makanan, dan berat badan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan menunjukkan distribusi yang normal ($p > 0,05$), sehingga tidak perlu dilakukan transformasi data.

LAMPIRAN 2

UJI VARIAN KADAR LEPTIN, ASUPAN MAKANAN DAN BERAT BADAN

1. Tujuan

Untuk mengetahui apakah data kadar leptin, asupan makanan dan berat badan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan mempunyai kesamaan varian

2. Hipotesis

H_0 : Variansi kadar leptin, asupan makanan dan berat badan mempunyai kesamaan varian

H_1 : Variansi kadar leptin, asupan makanan dan berat badan tidak mempunyai kesamaan varian

3. Kriteria Pengujian

Tolak H_0 bila Asym. Sig (2 tailed) lebih kecil dari 0,05

4. Hasil Perhitungan

Test of Homogeneity of Variances

| | Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|---------------------------------|------------------|-----|-----|------|
| Kadar Hormon Leptin | 1,489 | 2 | 27 | ,244 |
| Pertambahan Berat Badan | ,568 | 2 | 27 | ,573 |
| Rata-rata Asupan Makan per Hari | ,933 | 2 | 27 | ,406 |

5. Kesimpulan

Data kadar leptin, asupan makanan, dan berat badan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan mempunyai variansi yang sama karena mempunyai nilai $p > 0,05$

LAMPIRAN 3

UJI ANOVA ONE WAY TERHADAP RERATA KADAR LEPTIN PADA KELOMPOK KONTROL DAN KELOMPOK PERLAKUAN

1. Tujuan

Mengetahui apakah kelompok kontrol dan kelompok perlakuan mempunyai rerata kadar leptin berbeda secara bermakna

2. Hipotesis

H_0 : Rata-rata kadar leptin pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna

H_1 : Rata-rata kadar leptin pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan berbeda secara bermakna

3. Kriteria Pengujian

Tolak H_0 bila sig kurang dari 0,05

4. Hasil Perhitungan

- Kadar leptin
- Uji Anova (beda rata-rata kadar leptin antar kelompok)

Descriptives

Kadar Hormon Leptin

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|--|----|---------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Kip Kontrol | 10 | ,66210 | ,377094 | ,119248 | ,39234 | ,93186 | ,147 | 1,407 |
| Kip Intervensi (Glukosa 43% - 2 mL/100 gr BB) | 10 | 1,38290 | ,486265 | ,153771 | 1,03505 | 1,73075 | ,778 | 2,051 |
| Kip Intervensi (Fruktosa 43% - 2 mL/100 gr BB) | 10 | 1,01630 | ,672161 | ,212556 | ,53546 | 1,49714 | ,253 | 2,475 |
| Total | 30 | 1,02043 | ,589334 | ,107597 | ,80037 | 1,24049 | ,147 | 2,475 |

ANOVA

Kadar Hormon Leptin

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | 2,598 | 2 | 1,299 | 4,693 | ,018 |
| Within Groups | 7,474 | 27 | ,277 | | |
| Total | 10,072 | 29 | | | |

5. Kesimpulan

Terlihat bahwa terdapat perbedaan bermakna pada rata-rata kadar leptin pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ($p = 0,018$)

LAMPIRAN 4

UJI ANOVA ONE WAY TERHADAP ASUPAN MAKANAN PADA KELOMPOK KONTROL DAN KELOMPOK PERLAKUAN

1. Tujuan

Mengetahui apakah kelompok kontrol dan kelompok perlakuan mempunyai rata-rata asupan makanan berbeda secara bermakna

2. Hipotesis

H_0 : Rata-rata asupan makanan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna

H_1 : Rata-rata asupan makanan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan berbeda secara bermakna

3. Kriteria Pengujian

Tolak H_0 bila sig kurang dari 0,05

4. Hasil Perhitungan

Descriptives

Rata-rata Asupan Makan per Hari

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|--|----|-------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Klp Kontrol | 10 | 8,980 | ,7899 | ,2498 | 8,415 | 9,545 | 7,9 | 10,1 |
| Klp Intervensi (Glukosa 43% - 2 mL/100 gr BB) | 10 | 8,330 | ,7025 | ,2221 | 7,827 | 8,833 | 6,6 | 8,9 |
| Klp Intervensi (Fruktosa 43% - 2 mL/100 gr BB) | 10 | 8,260 | ,9743 | ,3081 | 7,563 | 8,957 | 6,6 | 9,6 |
| Total | 30 | 8,523 | ,8661 | ,1581 | 8,200 | 8,847 | 6,6 | 10,1 |

ANOVA

Rata-rata Asupan Makan per Hari

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | 3,153 | 2 | 1,576 | 2,288 | ,121 |
| Within Groups | 18,601 | 27 | ,689 | | |
| Total | 21,754 | 29 | | | |

5. Kesimpulan

Terlihat bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna pada rata-rata asupan makanan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ($p=0,121$)

LAMPIRAN 5

UJI ANOVA ONE WAY TERHADAP BERAT BADAN PADA KELOMPOK KONTROL DAN KELOMPOK PERLAKUAN

1. Tujuan

Mengetahui apakah kelompok kontrol dan kelompok perlakuan mempunyai rata-rata berat badan berbeda secara bermakna

2. Hipotesis

H_0 : Rata-rata berat badan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna

H_1 : Rata-rata berat badan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan berbeda secara bermakna

3. Kriteria Pengujian

Tolak H_0 bila sig kurang dari 0,05

4. Hasil Perhitungan

Descriptives

Pertambahan Berat Badan

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|--|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Kip Kontrol | 10 | 9,290 | 5,9036 | 1,8669 | 5,067 | 13,513 | ,4 | 19,0 |
| Kip Intervensi (Glukosa 43% - 2 mL/100 gr BB) | 10 | 10,920 | 6,2329 | 1,9710 | 6,461 | 15,379 | -2,3 | 19,7 |
| Kip Intervensi (Fruktosa 43% - 2 mL/100 gr BB) | 10 | 12,660 | 4,4066 | 1,3935 | 9,508 | 15,812 | 2,6 | 17,2 |
| Total | 30 | 10,957 | 5,5550 | 1,0142 | 8,882 | 13,031 | -2,3 | 19,7 |

ANOVA

Pertambahan Berat Badan

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|------|------|
| Between Groups | 56,805 | 2 | 28,402 | ,915 | ,413 |
| Within Groups | 838,069 | 27 | 31,040 | | |
| Total | 894,874 | 29 | | | |

5. Kesimpulan

Terlihat bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna pada rata-rata berat badan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ($p=0,413$)

LAMPIRAN 6
ANALISA PASCA HOC TERHADAP KADAR LEPTIN PADA
KELOMPOK KONTROL DAN KELOMPOK PERLAKUAN

1. Tujuan

Mengetahui apakah kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dan atau antar kelompok perlakuan mempunyai rata-rata kadar kormon leptin yang berbeda bermakna (melihat perbedaan antar kelompok)

2. Hipotesis

H_0 : kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dan atau antar kelompok perlakuan tidak berbeda secara bermakna

H_1 : kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dan atau antar kelompok perlakuan berbeda secara bermakna

3. Kriteria Pengujian

Tolak H_0 bila sig kurang dari 0,05

4. Hasil Perhitungan

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kadar Hormon Leptin
 Tukey HSD

| (i) Kelompok Kontrol dan Perlakuan (Glukosa & Fruktosa) | (j) Kelompok Kontrol dan Perlakuan (Glukosa & Fruktosa) | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|---|---|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Kjp Kontrol | Kjp Intervensi (Glukosa 43% - 2 mL/100 gr BB) | -.72080* | .235295 | .013 | -1,30419 | -.13741 |
| | Kjp Intervensi (Fruktosa 43% - 2 mL/100 gr BB) | -.35420 | .235295 | .304 | -.93759 | .22919 |
| Kjp Intervensi (Glukosa 43% - 2 mL/100 gr BB) | Kjp Kontrol | .72080* | .235295 | .013 | .13741 | 1,30419 |
| | Kjp Intervensi (Fruktosa 43% - 2 mL/100 gr BB) | .36660 | .235295 | .281 | -.21679 | .94999 |
| Kjp Intervensi (Fruktosa 43% - 2 mL/100 gr BB) | Kjp Kontrol | .35420 | .235295 | .304 | -.22919 | .93759 |
| | Kjp Intervensi (Glukosa 43% - 2 mL/100 gr BB) | -.36660 | .235295 | .281 | -.94999 | .21679 |

*. The mean difference is significant at the .05 level.

5. Kesimpulan

- Terlihat bahwa terdapat perbedaan bermakna rata-rata kadar leptin pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan glukosa 43% -2 mL/100 g BB tikus/hari

- Terlihat bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna rata-rata kadar leptin pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan fruktosa 43% -2 mL/100 g BB tikus/hari
- Terlihat bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna rata-rata kadar leptin pada kelompok perlakuan dengan glukosa 43% -2 mL/100 g BB tikus/hari dan kelompok perlakuan dengan fruktosa 43% -2 mL/100 g BB tikus/hari



LAMPIRAN 7

PROSEDUR PELAKSANAAN PEMERIKSAAN HORMON LEPTIN

Adapun prosedur pemeriksaan hormon leptin secara rinci adalah sebagai berikut:

1. Baca protokol sebelum penggunaan
2. Siapkan larutan buffer pencuci HRP dengan cara mengencerkan larutan tersebut 10 kali dengan menambahkan air destilata *de-ionized*.
3. Siapkan plate mikrotiter pada *plate holder*. Cuci masing-masing sumur pada plate sebanyak 3 kali dengan 300 μL larutan buffer pencuci HRP. Buang sisa larutan buffer pencuci setiap kali mencuci dan balikkan plate dan ujungnya diketuk-ketuk pada tisu *absorbent* beberapa kali. Jangan biarkan sumur mengering sampai prosedur selanjutnya.
4. Tambahkan 30 μL larutan *assay buffer* pada sumur blanko, sumur standar, QC1 dan QC2. Tambahkan 40 μL larutan *assay buffer* pada masing-masing sumur sampel
5. Tambahkan 10 μL *Matrix Solution* pada sumur blanko, sumur standar, sumur QC1 dan QC2.
6. Tambahkan 10 μL *assay buffer* pada sumur blanko dan tambahkan secara duplo 10 μL *Rat Leptin standard* dengan urutan konsentrasi yang semakin meningkat pada sumur yang sesuai.
7. Tambahkan 10 μL QC1 dan 10 μL QC2 pada sumur yang sesuai secara duplo
8. Selanjutnya secara berurutan tambahkan 10 μL sampel secara duplo pada sumur-sumur selanjutnya yang sesuai.
9. Pindahkan larutan antiserum pada tempat penampung, kemudian ambil larutan ini dengan *multichannel pipette* dan tambahkan 50 μL larutan ini pada masing-masing sumur. Tutup plate dengan *plate sealer* inkubasi pada suhu ruangan selama dua jam pada *orbital microtiter plate shaker set* yang berputar pada kecepatan menengah sekitar 400 sampai 500 rpm.

10. Lepaskan *plate sealer* dan buang sisa larutan dari plate. Balikkan dan ketuk-ketuk ujung plate pada tisu *absorbent*.
11. Cuci sumur 3 kali dengan larutan buffer pencuci, 300 μL per sumur (Balikkan dan ketuk-ketuk ujung plate pada tisu *absorbent* setiap kali dicuci.)
12. Tambahkan 100 μL antibodi pendeteksi pada masing-masing sumur. Tutup plate dengan *plate sealer* dan inkubasi pada suhu ruangan selama satu jam pada *orbital microtiter plate shaker set* yang berputar pada kecepatan menengah sekitar 400 sampai 500 rpm.
13. Lepaskan *plate sealer* dan buang sisa larutan dari plate. Balikkan dan ketuk-ketuk ujung plate pada tisu *absorbent*.
14. Cuci setiap sumur 3 kali dengan larutan buffer pencuci 300 μL (Balikkan dan ketuk-ketuk ujung plate pada tisu *absorbent* setiap kali dicuci.)
15. Tambahkan 100 μL larutan enzim pada setiap sumur. Tutup plate dengan *plate sealer* dan inkubasi pada suhu ruangan selama 30 menit pada *orbital microtiter plate shaker set* yang berputar pada kecepatan menengah sekitar 400 sampai 500 rpm.
16. Lepaskan *plate sealer* dan buang sisa larutan dari plate. Balikkan dan ketuk-ketuk ujung plate pada tisu *absorbent*.
17. Cuci setiap sumur 6 kali dengan larutan buffer pencuci 300 μL (Balikkan dan ketuk-ketuk ujung plate pada tisu *absorbent* setiap kali dicuci.)
18. Tambahkan 100 μL larutan substrat pada setiap sumur. Tutup *plate* dengan *plate sealer* dan putar pada *plate shaker* selama kurang lebih 10-15 menit dalam ruang gelap. Warna biru akan terbentuk pada sumur leptin standar dengan intensitas yang proporsional dengan peningkatan konsentrasi leptin.
19. Lepaskan *plate sealer* dan tambahkan 100 μL *stop solution* dan goyangkan *plate* dengan tangan untuk memastikan pencampuran yang sempurna pada semua sumur. Warna biru akan berubah menjadi kuning.
20. Baca penyerapan pada panjang gelombang 450 nm dan 560 nm dengan *plate reader* (spektrofotometri) dalam waktu < lima menit.

RAT LEPTIN ELISA KIT
96-Well Plate (Cat. #EZRL-83K)

I. INTENDED USE

This kit is used for the non-radioactive quantification of leptin in rat sera. Plasma samples may also be used but application to samples of other biological fluids may need validation by the user. One kit is sufficient to measure 37 unknown samples in duplicate. *This kit is for research purpose only.*

II. PRINCIPLES OF PROCEDURE

This assay is a Sandwich ELISA based, sequentially, on: 1) binding of leptin in the sample by a pre-titered antiserum and immobilization of the resulting complexes in the wells of a microtiter plate, 2) after washing purified biotinylated detection antibody is allowed to bind to the immobilized leptin, 3) binding of horseradish peroxidase to the immobilized biotinylated antibodies after free detection antibodies are washed off, 4) wash away of free enzyme conjugates, and 5) quantification of immobilized antibodyenzyme conjugates by monitoring horseradish peroxidase activities in the presence of the substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. The enzyme activity is measured spectrophotometrically by the increased absorbency at 450 nm, corrected from the absorbency at 590nm, after acidification of formed products. Since the increase in absorbency is directly proportional to the amount of captured leptin in the unknown sample, the latter can be derived by interpolation from a reference curve generated in the same assay with reference standards of known concentrations of rat leptin.

III. REAGENTS SUPPLIED

Each kit is sufficient to run one 96-well plate and contains the following reagents:

A. Rat/Mouse Leptin ELISA Plate

Coated with pre-titered capture antibodies

Quantity: 1 plate

Preparation: Ready to use.

Note: Unused strips should be resealed in the foil pouch with the desiccant provided and stored at 2-8°C.

B. Adhesive Plate Sealer

Quantity: 2 sheets

Preparation: Ready to use.

C. Rat/Mouse Leptin Antiserum

Pre-titered anti-rodent leptin serum

Quantity: 6 mL

Preparation: Ready to use.

III. REAGENTS SUPPLIED (continued)

D. 10X HRP Wash Buffer Concentrate

10X concentrate of 50 mM Tris Buffered Saline containing Tween-20.

Quantity: Two bottles containing 50 mL each

Preparation: Dilute 1:10 with distilled or de-ionized water.

E. Rat Leptin Standards

Rat leptin in buffer: 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 and 30 ng/mL.

Quantity: 0.5 mL/vial

Preparation: Ready to use.

F. Quality Controls 1 and 2

Various peptides including leptin in QC buffer.

Quantity: 0.5 mL/vial

Preparation: Ready to use.

G. Rat/Mouse Leptin Matrix Solution

Matrix containing 0.08% Sodium Azide

Quantity: 0.5 mL/vial

Preparation: Ready to use.

H. Assay Buffer

0.05 M phosphosaline, pH 7.4, containing 0.025 M EDTA, 0.08% sodium azide, 0.05% Triton X-100 and 1% BSA.

Quantity: 20 mL/vial

Preparation: Ready to use.

I. Rat/Mouse Leptin Detection Antibody

Pre-titered biotinylated anti-mouse leptin antibody.

Quantity: 12 mL/vial

Preparation: Ready to use.

J. Enzyme Solution

Pre-titered streptavidin-horseradish peroxidase conjugate in buffer.

Quantity: 12 mL/vial

Preparation: Ready to use.

K. Substrate (Light Sensitive: avoid unnecessary exposure to light)

3, 3',5,5'-tetramethylbenzidine in buffer.

Quantity: 12 mL/vial

Preparation: Ready to use.

L. Stop Solution (Caution: Corrosive Solution)

0.3 M HCl

Quantity: 12 mL/vial

Preparation: Ready to use.

IV. STORAGE AND STABILITY

All components of the kit can be stored up to two weeks at 2-8°C. For longer storage (>2 weeks), freeze antiserum, standards, quality controls, and matrix solution at -20°C and avoid repeated freeze and thaw. Unused strips should be resealed in the foil pouch with the desiccant provided and stored at 2-8°C. Refer to expiration dates on all reagents prior to use. Do not mix reagents from different kits unless they have the same lot numbers.

V. REAGENT PRECAUTIONS

A. Sodium Azide

Sodium Azide has been added to certain reagents as a preservative at a concentration of 0.08%. Although it is at a minimum concentration, Sodium Azide may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. On disposal, flush with large volume of water to prevent azide build up.

B. Hydrochloric Acid

Hydrochloric Acid is corrosive and can cause eye and skin burns. It is harmful if swallowed and can cause respiratory and digestive tract burns. Avoid contact with skin and eye. Do not swallow or ingest.

VI. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Pipettes and pipette tips: 10 μ L ~ 20 μ L and 20 μ L ~ 100 μ L
2. Multi-channel Pipettes and pipette tips: 0 ~ 50 μ L and 50 ~ 300 μ L
3. Buffer and Reagent Reservoirs
4. Vortex Mixer
5. De-ionized Water
6. Microtiter Plate Reader capable of reading absorbency at 450 nm and 590nm
7. Orbital Microtiter Plate Shaker
8. Absorbent Paper or Cloth

VII. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

1. To prepare serum samples, whole blood is directly drawn into a centrifuge tube that contains no anti-coagulant. Let blood clot at room temperature for 30 min.
2. Promptly centrifuge the clotted blood at 2,000 to 3,000 x g for 15 minutes at 4 \pm 2°C.
3. Transfer and store serum samples in separate tubes. Date and identify each sample.
4. Use freshly prepared serum or aliquot and store samples at -20°C for later use. Avoid multiple (> 3) freeze/thaw cycles.

VII. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE (continued)

5. To prepare plasma sample, whole blood should be collected into centrifuge tubes containing enough K3EDTA to achieve a final concentration of 1.735 mg/mL and centrifuge immediately after collection. Observe the same precautions in the preparation of serum samples.
6. If heparin is to be used as anti-coagulant, the effect on the assay outcome at the dose of heparin used should be pre-determined.
7. Avoid using samples with gross hemolysis or lipemia.

VIII. ASSAY PROCEDURE

Pre-warm all reagents to room temperature immediately before setting up the assay.

1. Dilute the 10X concentrated HRP Wash Buffer 10 fold by mixing the entire contents of both buffer bottles with 900 mL de-ionized or distilled water.
2. Remove the required number of strips from the Microtiter Assay Plate. Unused strips should be resealed in the foil pouch and stored at 2-8°C. Assemble strips in an empty plate holder and wash each well 3 times with 300 µL of diluted Wash Buffer per wash. Decant Wash Buffer and remove the residual amount from all wells by inverting the plate and tapping it smartly onto absorbent towels several times. **Do not let wells dry before proceeding to the next step. If automated machine is used for assay, follow the manufacturer's instructions for all washing steps described in this protocol.**
3. Add 30 µL Assay Buffer to Background wells, Standard wells, and QC1 and QC2 wells. Add 40 µL Assay Buffer to sample wells.
4. If samples to be assayed are serum or plasma, add 10 µL Matrix Solution to the Background wells, Standard wells, and QC1 and QC2 wells. If samples are free of significant serum matrix components, add 10 µL Assay Buffer instead.
5. Add 10 µL Assay Buffer to the Background wells and add in duplicates 10 µL Rat Leptin Standards in the order of ascending concentration to the appropriate wells.
6. Add 10 µL QC1 and 10 µL QC2 to the appropriate wells.
7. Add sequentially 10 µL of the unknown samples in duplicate to the remaining wells.
8. Transfer Antiserum Solution to a reagent reservoir and add 50 µL of this solution to each well with a multi-channel pipette. Cover the plate with plate sealer and incubate at room temperature for 2 hours on an orbital microtiter plate shaker set to rotate at moderate speed, about 400 to 500 rpm.

VIII. ASSAY PROCEDURE (continued)

9. Remove plate sealer and decant solutions from the plate. Tap as before to remove residual solutions in well.
10. Wash wells 3 times with diluted Wash Buffer, 300 μ l per well per wash. Decant and tap after each wash to remove residual buffer.
11. Add 100 μ l Detection Antibody to each well. Cover plate with sealer and incubate with moderate shaking at room temperature for 1 hour on an orbital microtiter plate shaker set to rotate at moderate speed, approximately 400-500 rpm.
12. Remove plate sealer and decant solutions from the plate. Tap as before to remove residual solutions in well.
13. Wash wells 3 times with diluted Wash Buffer, 300 μ l per well per wash. Decant and tap after each wash to remove residual buffer.
14. Add 100 μ l Enzyme Solution to each well. Cover plate with sealer and incubate with moderate shaking at room temperature for 30 minutes on the micro-titer plate shaker.
15. Remove plate sealer and decant solutions from the plate. Tap as before to remove residual solutions in well.
16. Wash wells 6 times with diluted Wash Buffer, 300 μ l per well per wash. Decant and tap after each wash to remove residual buffer.
17. Add 100 μ l of Substrate solution to each well, cover plate with sealer and shake in the plate shaker for approximately 10 to 15 minutes. Blue color should be formed in wells of Leptin standards with intensity proportional to increasing concentrations of Leptin.

NOTE: Please be aware that the color may develop more quickly or more slowly than the recommended incubation time depending on the localized room temperature. Please visually monitor the color development to optimize the incubation time. One can monitor color development using 370 nm filter, if available on the spectrophotometer. When the absorbance is between 1.2 and 1.8 at 370 nm, the stop solution can be added to terminate the color development.

18. Remove sealer and add 100 μ l Stop Solution [**CAUTION: CORROSIVE SOLUTION**] and shake plate by hand to ensure complete mixing of solution in all wells. The blue color should turn into yellow after acidification. Read absorbance at 450 nm and 590 nm in a plate reader within 5 minutes and ensure that there is no air bubbles in any well. Record the difference of absorbance units.

Assay Procedure for Rat Leptin ELISA kit (Cat # EZRL-83K)

| Well # | Step 1 | Step 2 | Step 3 | Step 4 | Step 5-7 | Step 8 | Step 9-10 | Step 11 | Step 12-13 | Step 14 | Step 15-16 | Step 17 | Step 18 | |
|-----------|--|---|--------------|------------|----------------------------------|------------|--|--------------------|---|-----------------|---|-------------|--|---------------|
| | Dilute both bottles of 10X Wash Buffer with 990mL Deionized Water. | Wash plate 2X with 300 μ L Wash Buffer. Remove residual buffer by tapping gently on absorbent towels. | Assay Buffer | Matrix | Standards/ Controls/ Samples | Antibody | Seal, Agitate, Incubate 2 hours at Room Temperature. Wash 2X with 300 μ L Wash Buffer. | Detection Antibody | Seal, Agitate, Incubate 1 hour at Room Temperature. Remove residual buffer by tapping gently on absorbent towels. Wash 2X with 300 μ L Wash Buffer. | Enzyme Solution | Seal, Agitate, Incubate 30 minutes at Room Temperature. Wash 2X with 300 μ L Wash Buffer. | Substrate | Seal, Agitate, Incubate 10-15 minutes at Room Temperature. | Stop Solution |
| A1, B1 | | | 40 μ L | 10 μ L | ----- | 50 μ L | | 100 μ L | | 100 μ L | | 100 μ L | 100 μ L | |
| C1, C1 | | | 30 μ L | 10 μ L | 10 μ L of 0.2 ng/mL Standard | 50 μ L | | | | | | | | |
| E1, F1 | | | 30 μ L | 10 μ L | 10 μ L of 0.5 ng/mL Standard | 50 μ L | | | | | | | | |
| G1, F1 | | | 30 μ L | 10 μ L | 10 μ L of 1 ng/mL Standard | 50 μ L | | | | | | | | |
| A2, B2 | | | 30 μ L | 10 μ L | 10 μ L of 2 ng/mL Standard | 50 μ L | | | | | | | | |
| C2, C2 | | | 30 μ L | 10 μ L | 10 μ L of 5 ng/mL Standard | 50 μ L | | | | | | | | |
| E2, F2 | | | 30 μ L | 10 μ L | 10 μ L of 10 ng/mL Standard | 50 μ L | | | | | | | | |
| G2, F2 | | | 30 μ L | 10 μ L | 10 μ L of 20 ng/mL Standard | 50 μ L | | | | | | | | |
| A3, B3 | | | 30 μ L | 10 μ L | 10 μ L of 30 ng/mL Standard | 50 μ L | | | | | | | | |
| C3, C3 | | | 30 μ L | 10 μ L | 10 μ L of QC 1 | 50 μ L | | | | | | | | |
| E3, F3 | | | 30 μ L | 10 μ L | 10 μ L of QC 2 | 50 μ L | | | | | | | | |
| G3, F3 | | | 40 μ L | ----- | 10 μ L of Sample | 50 μ L | | | | | | | | |
| A4, B4... | | | 40 μ L | ----- | 10 μ L of Sample | 50 μ L | | | | | | | | |

* See Section VIII, Assay Procedure Step 4: If samples are free of significant matrix components, add 10 μ L assay buffer instead.

IX. MICROTITER PLATE ARRANGEMENT

Rat Leptin ELISA

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----------|-----------|----------|----------|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | Blank | 2.0 ng/mL | 30 ng/mL | Sample 2 | | | | | | | | |
| B | Blank | 2.0 ng/mL | 30 ng/mL | Sample 2 | | | | | | | | |
| C | 0.2 ng/mL | 5.0 ng/mL | QC 1 | Etc. | | | | | | | | |
| D | 0.2 ng/mL | 5.0 ng/mL | QC 1 | | | | | | | | | |
| F | 0.5 ng/mL | 10 ng/mL | QC 2 | | | | | | | | | |
| F | 0.5 ng/mL | 10 ng/mL | QC 2 | | | | | | | | | |
| G | 1.0 ng/mL | 20 ng/mL | Sample 1 | | | | | | | | | |
| H | 1.0 ng/mL | 20 ng/mL | Sample 1 | | | | | | | | | |

X. CALCULATIONS

Graph a reference curve by plotting the absorbance unit of 450nm, less unit at 590nm, on the Y-axis against the concentrations of rat leptin standard on the X-axis. The dose-response curve of this assay fits best to a sigmoidal 4- or 5-parameter logistic equation. The results of unknown samples can be calculated with any computer program having a 4- or 5-parameter logistic function.

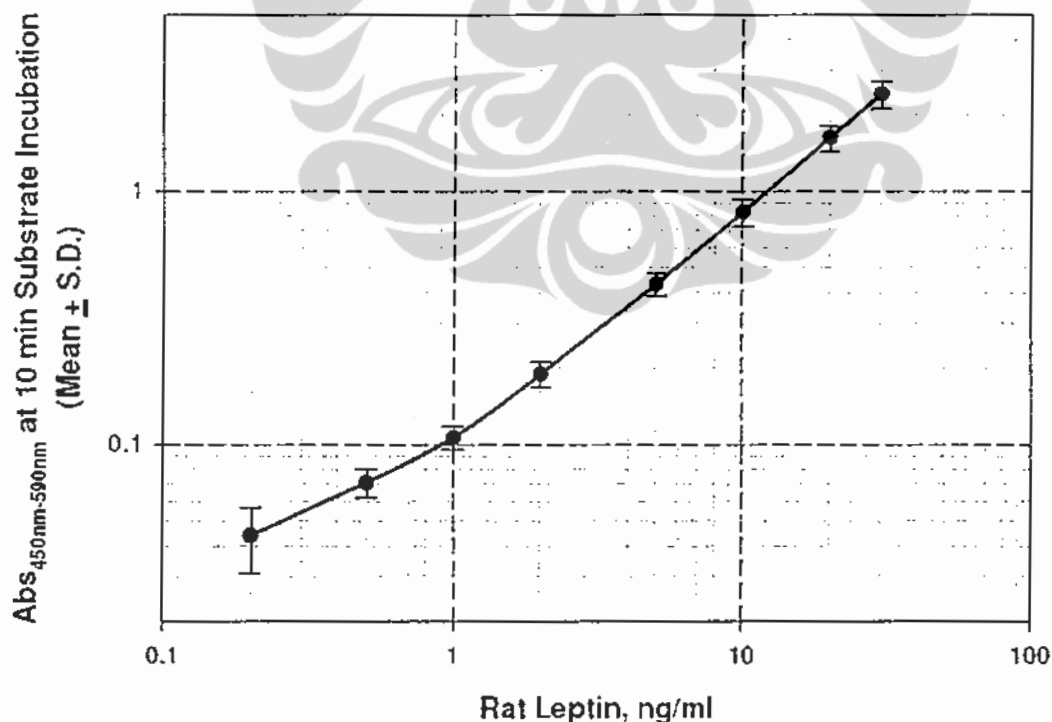
Note: When sample volumes assayed differ from 10 μL , an appropriate mathematical adjustment must be made to accommodate for the dilution factor (e.g., if 5 μL of sample is used, then calculated data must be multiplied by 2). When sample volume assayed is less than 10 μL , compensate the volume deficit with either matrix solution or assay buffer, whichever is appropriate.

XI. INTERPRETATION

1. The assay will be considered accepted when all Quality Control values fall within the calculated Quality Control Range; if any QC's fall outside the control range, review results with the supervisor.
2. If the difference between duplicate results of a sample is $>15\%$ CV, repeat the sample.
3. The limit of sensitivity of this assay is 0.04 ng/mL (~ 2.5 pM) leptin (10 μL sample size).
4. The appropriate range of this assay is 0.2 ng/mL to 30 ng/mL leptin (10 μL sample size). Any result greater than 30 ng/mL in a 10 μL sample assayed should be repeated on dilution using either matrix solution or assay buffer, whichever is appropriate, as diluents until it falls within range.

XII. GRAPH OF TYPICAL REFERENCE CURVE

(n = 9 assays)

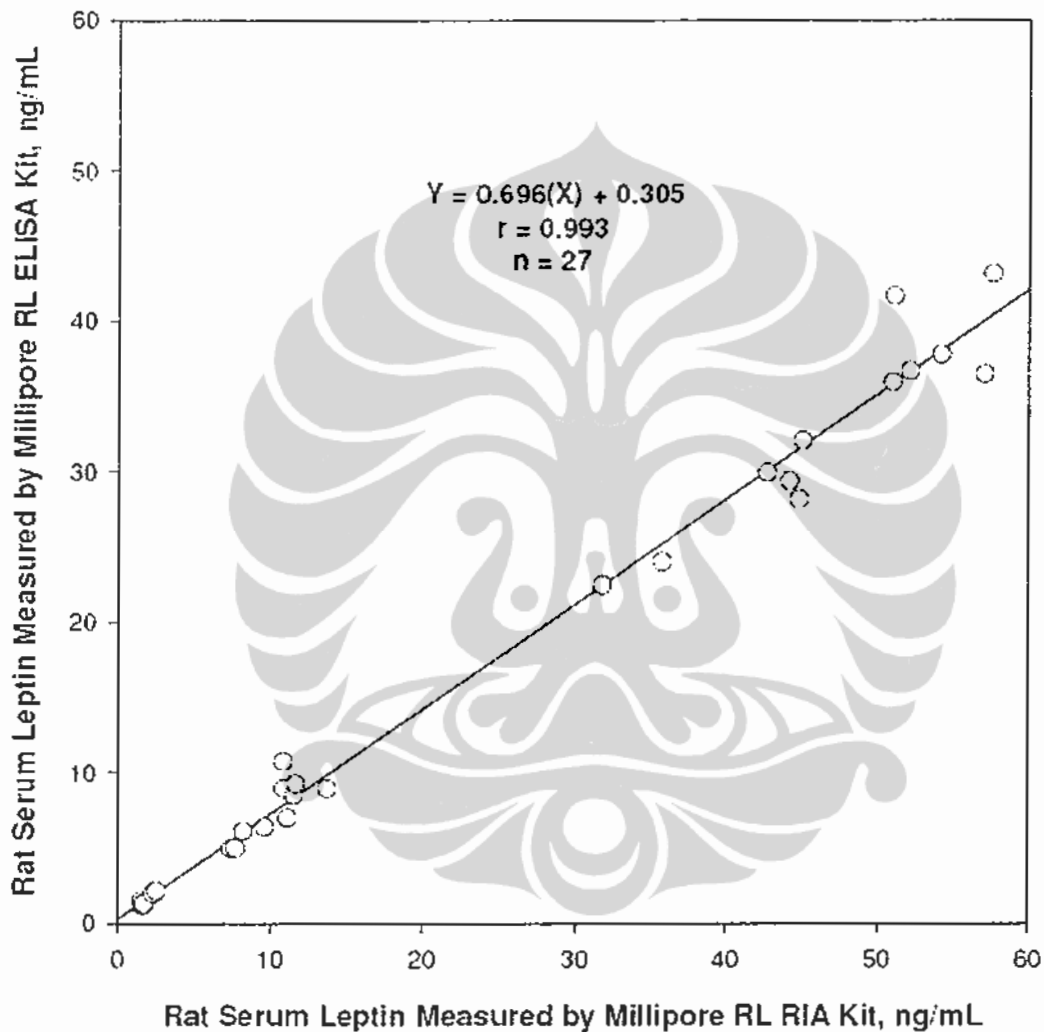


For Demonstration Only - Do not use for calculations

XIII. CORRELATION GRAPH

Rat Leptin Assays:

Correlation of Results by RIA and ELISA Methods



Serum samples from 27 rats were assayed for leptin using both Millipore Rat Leptin RIA Kit (Cat# RL-83K) and Rat Leptin ELISA Kit (Cat# EZRL-83K). Correlation of the two kits are derived by linear regression analysis of paired results from each sample.

XIV. ASSAY CHARACTERISTICS

A. Sensitivity

The lowest level of rat leptin that can be detected by this assay is 0.04 ng/mL using a 10 μ L sample size.

B. Specificity

The specificity (also known as selectivity) of the analytical test is its ability to selectively measure the analytes in the presence of other like components in the sample matrix.

Rat Leptin 100%
Mouse Leptin 143%
Human Leptin 15%
Porcine Leptin < 0.1%
Ovine Leptin < 0.1%
Chicken Leptin < 0.1%
Rat Insulin 0%
Rat C-peptide 0%
Human Proinsulin 0%
Porcine Proinsulin 0%
Bovine Proinsulin 0%
Glucagon 0%
Human Ghrelin 0%

C. Precision

| Sample Number | Mean Leptin Level (ng/mL) | Assay Variation (CV) | |
|---------------|---------------------------|----------------------|-------------|
| | | Intra-assay | Inter-assay |
| 1 | 1.26 | 2.49 % | 3.93 % |
| 2 | 5.19 | 1.88 % | 3.31 % |
| 3 | 16.56 | 2.13 % | 2.95 % |

The assay variations of Millipore Rat Leptin ELISA kit were studied on three rat serum samples with varying concentrations of spiked analyte. The intra-assay variations are calculated from eight duplicate determinations in an assay. The interassay variations are calculated from results of 6 separate assays with duplicate samples in each assay.

XIV. ASSAY CHARACTERISTICS (continued)

D. Recovery

Spike and Recovery of Rat Leptin in Rat Serum

| Serum Sample # | Rat Leptin | | Recovery (%) of Spiked Insulin |
|----------------|---------------|------------------|--------------------------------|
| | Added (ng/mL) | Observed (ng/mL) | |
| Rat Serum # 1 | 0 | 5.00 | -- |
| | 0.5 | 5.61 | 122 |
| | 2.0 | 7.29 | 115 |
| | 10.0 | 16.17 | 112 |
| Rat Serum # 2 | 0 | 5.85 | -- |
| | 0.5 | 6.36 | 102 |
| | 2.0 | 8.20 | 118 |
| | 10.0 | 16.93 | 111 |

Rat leptin at indicated levels was added to two rat serum samples and the resulting leptin content of each sample was assayed by ELISA. The % of recovery = [(observed leptin level after spike - observed leptin level before spike) / spiked level of leptin] x 100%. Mean recovery rate at spiked leptin level of 0.5, 2, and 10 ng/mL is 112%, 117%, and 112%, respectively.

E. Linearity

Effect of Serum Dilution

| Serum Sample # | Dilution Factor | Leptin Level | | |
|----------------|-----------------|------------------|------------------|---------------|
| | | Observed (ng/mL) | Expected (ng/mL) | % Of Expected |
| Rat Serum # 1 | -- | 21.18 | 21.18 | 100 |
| | 2x | 19.56 | | 92 |
| | 5x | 19.20 | | 91 |
| | 10x | 18.40 | | 87 |
| | 20x | 19.20 | | 91 |
| Rat Serum # 2 | -- | 21.39 | 21.39 | 100 |
| | 2x | 20.92 | | 98 |
| | 5x | 21.00 | | 98 |
| | 10x | 21.10 | | 99 |
| | 20x | 20.80 | | 97 |

Two rat serum samples are diluted each with matrix solution to various degrees as indicated and assayed for leptin levels along with neat samples of each serum. Measured leptin levels are corrected for dilution factors and reported as observed leptin level.

XV. QUALITY CONTROLS

The ranges for Quality Control 1 and 2 are provided on the card insert or can be located at the Millipore website www.millipore.com/bmia.

XVI. TROUBLESHOOTING GUIDE

1. To obtain reliable and reproducible results the operator should carefully read this manual and fully understand all aspects of each assay step before attempting to run the assay.
2. Throughout the assay the operator should adhere strictly to the procedures with good laboratory practice.
3. Have all necessary reagents and equipment ready on hand before starting. Once the assay has been started all steps should be completed with precise timing and without interruption.
4. Avoid cross contamination of any reagents or samples to be used in the assay.

5. Make sure that all reagents and samples are added to the bottom of each well.
6. Careful and complete mixing of solutions in the well is critical. Poor assay precision will result from incomplete mixing or cross well contamination due to inappropriate mixing.
7. Remove any air bubble formed in the well after acidification of substrate solution because bubbles interfere with spectrophotometric readings.
8. Do not let the absorbance reading of the highest standard fall beyond the limit of your microtiterplate reader's capacity. Adjust the length of substrate incubation time accordingly.
9. High absorbance in background or blank wells could be due to 1) cross well contamination by standard solution or sample and 2) inadequate washing of wells with wash buffer.

XVII. REPLACEMENT REAGENTS

| Reagents | Cat# |
|---|-------------|
| Rat/Mouse Leptin ELISA Plates | EP83 |
| Rat/Mouse Leptin Antiserum | EAS83 |
| 10X HRP Wash Buffer Concentrate (50 mL) | EWB-HRP |
| Rat Leptin Standards | E8083-K |
| Quality Controls 1 and 2 | E6083-K |
| Rat/Mouse Leptin Matrix Solution | EPS0016 |
| Assay Buffer | AB-PTRHK |
| Rat/Mouse Leptin Detection Antibody | E1083 |
| Enzyme Solution | EHRP |
| Substrate | ESS-TMB2 |
| Stop Solution | ET-TMB |

XVIII. ORDERING INFORMATION

A. To place an order:

For USA Customers:

Please provide the following information to our customer service department to expedite your telephone, fax or mail order:

1. Your name, telephone and/or fax number
2. Customer account number
3. Shipping and billing address
4. Purchase order number
5. Catalog number and description of product
6. Quantity and product size

TELEPHONE ORDERS:

Toll Free US (866) 441-8400

(636) 441-8400

FAX ORDERS: (636) 441-8050

MAIL ORDERS: Millipore

6 Research Park Drive

St. Charles, Missouri 63304 U.S.A.

For International Customers:

To best serve our international customers, it is Millipore's policy to sell our products through a network of distributors. To place an order or to obtain additional information about Millipore products, please contact your local distributor.

B. Conditions of Sale

All products are for research or manufacturing use only. They are not intended for use in clinical diagnosis or for administration to human or animals. All products are intended for *in vitro* use only.

C. Material Safety Data Sheets (MSDS)

Material safety data sheets for Millipore products may be ordered by fax or phone. See Section A above for details on ordering.

LAMPIRAN 8

**TABEL HASIL PEMERIKSAAN KADAR
HORMON LEPTIN *POSTPRANDIAL* DENGAN TEKNIK ELISA**

| Sampel | Kadar Leptin1 | Kadar Leptin 2 | Mean |
|--------|---------------|----------------|--------|
| A1. | 1,027 | 1,067 | 1,047 |
| A2. | 0,620 | 0,620 | 0,620 |
| A3. | 0,194 | 0,153 | 0,174 |
| A4. | 0,620 | 0,641 | 0,631 |
| A5. | 0,478 | 0,604 | 0,541 |
| A6. | 0,641 | 0,943 | 0,792 |
| A7. | 0,417 | 0,572 | 0,495 |
| A8. | 0,722 | 0,812 | 0,767 |
| A9. | 0,113 | 0,180 | 0,147 |
| A10. | 1,413 | 1,400 | 1,407 |
| B1. | 0,722 | 0,834 | 0,778 |
| B2. | 1,149 | 1,291 | 1,220 |
| B3. | 1,007 | 1,204 | 1,106 |
| B4. | 0,824 | 1,117 | 0,971 |
| B5. | 1,718 | 2,054 | 1,886 |
| B6. | 1,982 | 2,119 | 2,051 |
| B7. | 1,880 | 2,141 | 2,011 |
| B8. | 0,986 | 1,117 | 1,052 |
| B9. | 0,946 | 1,052 | 0,999 |
| B10. | 1,738 | 1,771 | 1,755 |
| C1. | 1,250 | 1,574 | 1,412 |
| C2. | 2,307 | 2,642 | 2,475 |
| C3. | 0,173 | 0,333 | 0,253 |
| C4. | 0,478 | 0,638 | 0,558 |
| C5. | 1,271 | 0,855 | 1,063 |
| C6. | 0,356 | 0,376 | 0,366 |
| C7. | 0,925 | 0,899 | 0,912 |
| C8. | 0,946 | 1,030 | 0,988 |
| C9. | 0,539 | 0,550 | 0,545 |
| C10. | 1,454 | 1,727 | 1,591 |
| QC 1 | 3,220 | 3,320 | 3,270 |
| QC 2 | 14,810 | 13,390 | 14,100 |

(Ket. Pengerjaan baik jika quality control berkisar pada: QC1: 1,7-3,6 ng/mL, QC2: 7,2-15,1 ng/mL)



UNIVERSITAS INDONESIA FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat

Pos Box 1358 Jakarta 10430

Kampus Salemba Telp. 31930371, 31930373, 3922977, 3927360, 3912477, 3153236, Fax.: 31930372, 3157288, e-mail : office@fk.ui.ac.id

NOMOR : 9 /PT02.FK/ETIK/2010

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL --- CLEARANCE

Panitia Tetap Penilai Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:
The Committee of The Medical research Ethics of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research has carefully reviewed the proposal entitled:

"Pengaruh Fruktosa Terhadap Kadar Leptin Darah Postprandial, Asupan Makan dan Berat Badan Tikus".

Peneliti Utama : dr. Trinovita Andraini
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Program Magister Ilmu Biomedik Kekhususan Fisiologi FKUI

dan telah menyetujui protocol tersebut di atas.valuasi
and approved the above mentioned proposal

Jakarta, 8 Februari 2010



Chairman
Ketua

Prof. Dr. dr. Agus Firmansyah, SpA(K)

-Peneliti wajib menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.

RIWAYAT HIDUP

Nama : Trinovita Andraini
Jenis kelamin : Perempuan
Tempat/tanggal lahir : Bogor/3 November 1981
Alamat : Eramas 2000, Blok B9 No. 5
Kecamatan Cakung, Jakarta Timur 13950
Nomor Telp. : 0819-685633
e-mail : trinovita_99fk@yahoo.com
Agama : Islam
Status : Menikah
Dana Penelitian : Pribadi



RIWAYAT PENDIDIKAN FORMAL

| Nama Sekolah | Tahun |
|-----------------|---|
| 2007 – Sekarang | Program S2-Studi Ilmu Biomedik, Kekhususan Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia |
| 1999 – 2005 | Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Palembang |
| 1996 – 1999 | SMA Negeri 1 Palembang |
| 1993 – 1996 | SMP Negeri 18 Palembang |
| 1987 – 1993 | SD Negeri 71 Palembang |

RIWAYAT PEKERJAAN

2010 : Dosen Honorer pada Departemen Fisiologi FK UI
2009 : Dosen Luar biasa pada Akper Antariksa Jakarta
2007-2008 : Dosen Honorer Pada Bagian Fisiologi FK Unsri Palembang
2007-2008 : Dosen Luar biasa pada STIK Bina Husada Palembang

RIWAYAT PENELITIAN

2006 : Hubungan Hasil Cold Pressor Test Dengan Riwayat Keluarga
Hipertensi pada Mahasiswa Fakultas Kedokteran Unsri Angkatan
2006
2003 : Penulisan Resep Obat Dengan Nama Generik Pada Pasien Rawat
Jalan Rumah Sakit Mohammad Hoesin Palembang

Draft Artikel Majalah Kedokteran Indonesia

Pengaruh Fruktosa Terhadap Kadar Leptin Serum *Postprandial*: Dampaknya terhadap Asupan Makanan Dan Berat Badan Tikus

Trinovita Andraini^{*}, Djauhari Widjajakusumah^{*}, Sri Widia A Jusman[^]

^{*}Departemen Fisiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

[^]Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Saat ini, karena perubahan pola diet, terutama pola diet Barat, yang banyak mengkonsumsi makanan siap saji dan minuman ringan menyebabkan peningkatan konsumsi harian fruktosa yang bermakna, bahkan mencapai 85-100 gram per hari. Data di Amerika Serikat, menunjukkan bahwa seiring terus meningkatnya konsumsi HFCS dan sukrosa juga terjadi peningkatan prevalensi obesitas. Peningkatan konsumsi fruktosa tampaknya merupakan salah satu faktor penting yang berkontribusi menyebabkan terjadinya epidemi obesitas karena dua alasan, yaitu proses metabolisme fruktosa terjadi lebih cepat dan menyediakan substrat lipogenik yang lebih banyak pada stadium *postprandial* dan fruktosa dapat menyebabkan *overconsumption* karena konsumsi fruktosa tidak menyebabkan peningkatan hormon leptin dan insulin *postprandial*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbandingan pengaruh diet tinggi fruktosa dan diet tinggi glukosa terhadap kadar leptin *postprandial* serum tikus dan pengaruhnya terhadap asupan makanan dan berat badan. Metode penelitian adalah studi eksperimental secara *in vivo* pada tiga kelompok tikus jantan spesies *Sprague-Dawley*, berusia 8-10 minggu dengan berat badan 150-200 gram. Tikus diberikan perlakuan selama 15 hari yaitu diberi larutan kontrol atau larutan glukosa 43% atau fruktosa 43% dengan dosis 2mL/100 g bb/hari dan makanan standar. Parameter yang diukur adalah jumlah asupan makanan, penambahan berat badan dan kadar hormon leptin *postprandial* setelah 15 hari perlakuan dengan metode ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Didapatkan hasil kadar leptin serum *postprandial* tikus lebih tinggi secara bermakna pada kelompok perlakuan glukosa tetapi tidak berbeda bermakna pada kelompok perlakuan fruktosa dibanding kelompok kontrol, sedangkan jumlah asupan makanan pada kelompok perlakuan fruktosa lebih rendah daripada kelompok glukosa dan penambahan berat badan pada kelompok perlakuan fruktosa lebih tinggi dari kelompok perlakuan glukosa tetapi tidak berbeda bermakna. Disimpulkan bahwa fruktosa memiliki kecenderungan menyebabkan kadar leptin *postprandial* lebih rendah dari glukosa dan memiliki kecenderungan menyebabkan penurunan asupan makanan dan peningkatan berat badan yang lebih besar dibandingkan glukosa.

Kata Kunci: Leptin, asupan makanan, berat badan, fruktosa, glukosa

EFFECTS OF FRUCTOSE ON *POSTPRANDIAL* LEPTIN SERUM LEVEL: AND ITS EFFECT ON FOOD INTAKE AND BODY WEIGHT IN RAT

Trinovita Andraini^{*}, Djauhari Widjajakusumah^{*}, Sri Widia A Jusman[^]

Nowadays, due to changing on diet, especially Western diet which consumes fast food and soft drink cause increasing daily consumption of fructose, even to achieve 85-100 gram per day. In US, data shows that the more to consume HFCS and sucrose (especially soft drink), the more to increase obesity. The increase of fructose consumption appears to be one crucial factor which contributes obesity epidemic due to two reasons as follows: fructose metabolism process happens faster and provides more lipogenic substrate on *postprandial* stadium and fructose can cause overconsumption because fructose consumption is not the same as glucose which does not cause increasing leptin hormone and insulin *postprandial*. Leptin and insulin are the long term adiposity signal which work on hypothalamus and manage amount of consumption food and energy expenditure so it will influence body weight. The objective of this study was to understand the influence of high fructose diet on *postprandial* level of serum leptin in rat and its influence to daily food intake and body weight. The method was *In vivo* experimental study on three groups of male rats of *Sprague-Dawley* species, age between 8-10 weeks with body weight around 150-200 gram. Rats are given treatment for 15 days and given control liquid or glucose liquid 43% with dose of 2 mL/100gr body weight/day or fructose 43% with dose of 2 mL/100 gr body weight/day and standard food. The measured Parameter are amount of daily food intake, increasing of body weight and *postprandial* serum leptin level after 15 days of treatment with ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) method. The Result of this study are the rats *postprandial* serum leptin level is higher significantly on glucose treatment groups but it is not different to fructose treatment group compared to control group. In addition, amount of daily food intake on fructose treatment group is lower than that of glucose group and gaining body weight of fructose treatment group is higher than that of glucose treatment but the different between them is not significant. It can be concluded that Fructose tends to cause degree of *postprandial* serum leptin level lower than glucose and tend to cause decreasing consumption of food and gaining body weight higher than glucose.

Keywords: Leptin, food intake, body weight, fructose and glucose

Pendahuluan

Secara fisiologis, tubuh manusia memiliki mekanisme untuk mempertahankan homeostasis energinya sehingga berat badan dipertahankan konstan. Mekanisme ini melibatkan berbagai sinyal perifer yang akan diintegrasikan pada hipotalamus yang selanjutnya akan mempengaruhi perilaku dan motivasi untuk makan serta *energy expenditure*. Sinyal perifer ini dapat dipengaruhi oleh kandungan jenis makronutrien yang dimakan seseorang, salah satunya fruktosa. Konsumsi fruktosa dalam jumlah berlebihan diduga bertanggung jawab terhadap perubahan homeostasis energi sehingga turut berkontribusi dalam meningkatkan obesitas.

Fruktosa yang didapatkan dari diet merupakan komponen dari sukrosa, yang terdapat dalam buah-buahan dan *table sugar*, atau sebagai gula bebas dalam madu dan dalam *high fructose corn syrup* (HFCS). Sukrosa dan HFCS merupakan pemanis yang paling banyak digunakan pada industri makanan, juga digunakan dalam jumlah yang sangat banyak pada sejumlah besar makanan siap saji, minuman ringan (*soft drink*) baik yang berkarbonasi maupun yang tidak (*fruit drink*).

Dahulu, manusia mengkonsumsi fruktosa hanya sebesar 15-20 gram per hari, dan terutama berasal dari buah-buahan. Tetapi, saat ini, karena perubahan pola diet, terutama pola diet barat, yang banyak mengkonsumsi makanan siap saji dan minuman ringan menyebabkan peningkatan konsumsi harian fruktosa yang bermakna, bahkan mencapai 85-100 gram per hari^{1,2}. Bahkan satu dari setiap 4 anak di Amerika mengkonsumsi pemanis diatas 25% total energi yang direkomendasikan¹.

Data di Amerika Serikat, menunjukkan bahwa seiring terus meningkatnya konsumsi HFCS dan sukrosa (terutama dari minuman ringan) juga terjadi peningkatan prevalensi obesitas meskipun telah terjadi penurunan konsumsi lemak jenuh³. Peningkatan konsumsi HFCS maupun sukrosa tampaknya merupakan salah satu faktor paling penting yang berkontribusi terjadinya epidemi obesitas^{4,5,6}. Bukti yang berkembang saat ini menunjukkan bahwa diet yang tinggi fruktosa berpotensi untuk menimbulkan efek yang tidak diinginkan pada profil lipid darah dan dapat menyebabkan perubahan profil hormon yang berhubungan dengan berat badan sehingga mempromosikan terjadinya *overconsumption*, penambahan berat badan, disregulasi metabolisme lemak, dan resistensi insulin^{3,4,7,8,9}.

Kontribusi diet tinggi fruktosa dalam menyebabkan penambahan berat badan dan terjadinya *intake* energi yang tidak terkontrol (*overconsumption*) amat mungkin terjadi karena fruktosa tidak hanya memiliki fungsi lipogenesis, tetapi fruktosa menyebabkan penekanan nafsu makan yang lebih sedikit dibandingkan karbohidrat lain^{2,10,11,12}. Fungsi lipogenesis fruktosa lebih besar dari glukosa karena fruktosa merupakan substrat lipogenesis yang lebih disukai hati daripada glukosa. Fruktosa memasuki sel hati dan langsung difosforilasi oleh enzim fruktokinase menjadi fruktosa 1-fosfat dan jalur metabolisme selanjutnya tidak dibatasi oleh enzim fosfofruktokinase seperti pada glukosa. Dengan demikian proses metabolisme fruktosa terjadi lebih cepat dan menyediakan substrat lipogenik yang lebih banyak pada stadium *postprandial*^{8,9}.

Fruktosa dapat menyebabkan *overconsumption* karena konsumsi fruktosa tidak menyebabkan peningkatan hormon yang menekan nafsu makan (leptin dan insulin) ataupun penurunan hormon yang merangsang nafsu makan (ghrelin). Banyak penelitian, baik pada manusia dan hewan, menunjukkan bahwa jika dibandingkan dengan subjek yang mengkonsumsi glukosa, maka konsumsi fruktosa menyebabkan rendahnya kadar insulin plasma *postprandial*, dan rendahnya kadar leptin plasma *postprandial* dan diurnal, bahkan

berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Teff et al, diet tinggi fruktosa juga menumpulkan penurunan kadar ghrelin plasma *postprandial*. Hal inilah yang dianggap menjadi faktor potensial penyebab masih meningkatnya masukan makanan setelah mengkonsumsi fruktosa walaupun dalam jumlah kalori yang tinggi.

Leptin dan insulin merupakan sinyal adiposa jangka panjang yang menggambarkan jumlah simpanan energi dalam adiposa dan mengatur berat badan seseorang¹³. Disamping itu kadar kedua hormon ini juga dipengaruhi oleh status energi jangka pendek yaitu keadaan setelah makan sehingga diasumsikan juga berperan dalam menyebabkan sinyal kenyang jangka pendek yang mengatur nafsu makan setelah makan¹⁴. Leptin dan insulin bekerja pada hipotalamus pada nukleus arkuata yang mempengaruhi aktivitas neuronal pada area hipotalamus lateral dan nukleus paraventricular sehingga mengatur jumlah asupan makan dan peningkatan *energy expenditure* untuk mempertahankan berat badan¹³. Kadar leptin plasma dapat menggambarkan kadar insulin plasma karena biosintesis dan sekresi leptin pada jaringan adiposa memerlukan stimulasi oleh insulin^{15,16,17}. Rendahnya kadar insulin plasma juga menyebabkan rendahnya kadar leptin plasma, demikian juga sebaliknya.

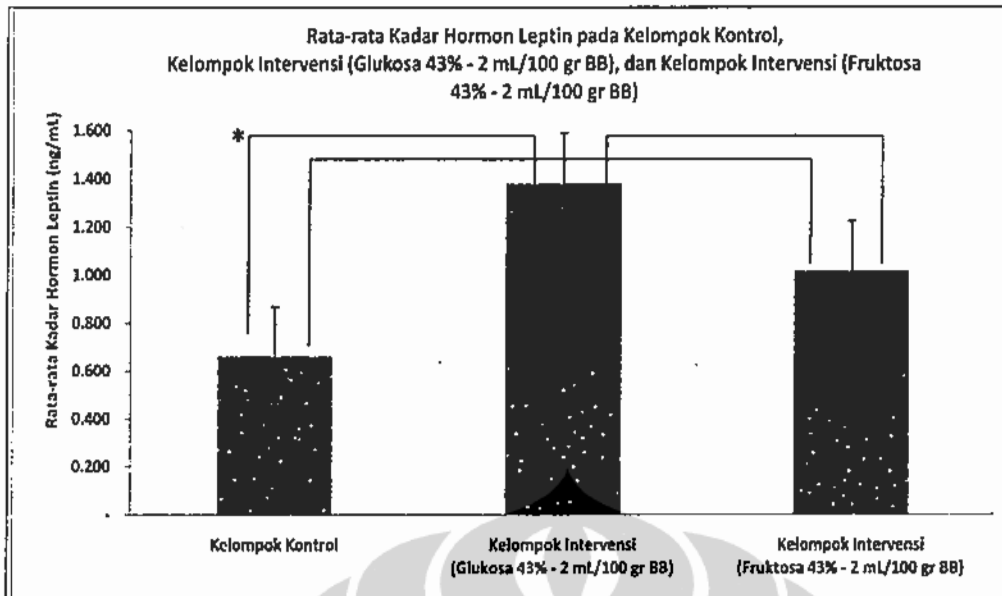
Pada penelitian ini ingin diketahui bagaimana pengaruh diet tinggi fruktosa terhadap kadar leptin plasma *postprandial* yang secara tidak langsung juga menggambarkan kadar insulin plasma *postprandialnya*, pengaruhnya terhadap jumlah asupan makanan dan pada akhirnya pengaruhnya terhadap berat badan.

Metode

Penelitian ini merupakan studi eksperimental secara *in vivo* pada tiga kelompok tikus jantan spesies *sprague-Dawley* sehat yang berusia 8-10 minggu dengan berat badan berkisar antara 150-200 gram. Hewan uji dipelihara dalam kandang secara individual, dengan ventilasi cukup dalam suhu ruangan antara 18-26°C dengan kelembaban 30-70%. Penerangan ruangan 12 jam gelap dan 12 jam terang. Tikus diberi makanan yang mengandung serat 5%, protein 21-23%, dan lemak 5%. Kelompok I adalah kelompok kontrol, diberikan larutan kontrol (air), kelompok perlakuan pertama diberikan glukosa 43% dan sedangkan kelompok perlakuan kedua diberi larutan fruktosa 43% dengan dosis 2 mL/100 g bb/hari (sebanding dengan diet tinggi glukosa 1,5 g/kg bb/hari pada manusia) secara peroral dengan sonde sesuai dengan berat badan tikus setiap hari dibagi menjadi dua dosis. Perlakuan dilaksanakan selama 15 hari dan dicatat jumlah asupan makanan perhari dan pertambahan berat badan tikus setiap hari. Setelah hari ke-15, tikus dipuaskan selama empat belas jam sebelum dilakukan pengambilan darah. Kemudian tikus kelompok kontrol diberikan larutan kontrol (air), kelompok perlakuan pertama diberikan glukosa 43%-2 mL/100 g bb dan kelompok perlakuan 2 diberikan fruktosa 43%-2 mL/100 gr bb secara peroral dengan sonde sesuai dengan berat badan tikus. Satu jam kemudian dilakukan prosedur pengambilan darah tikus dari jantung dan dilakukan pemeriksaan kadar serum leptin *postprandial* tikus dengan teknik ELISA.

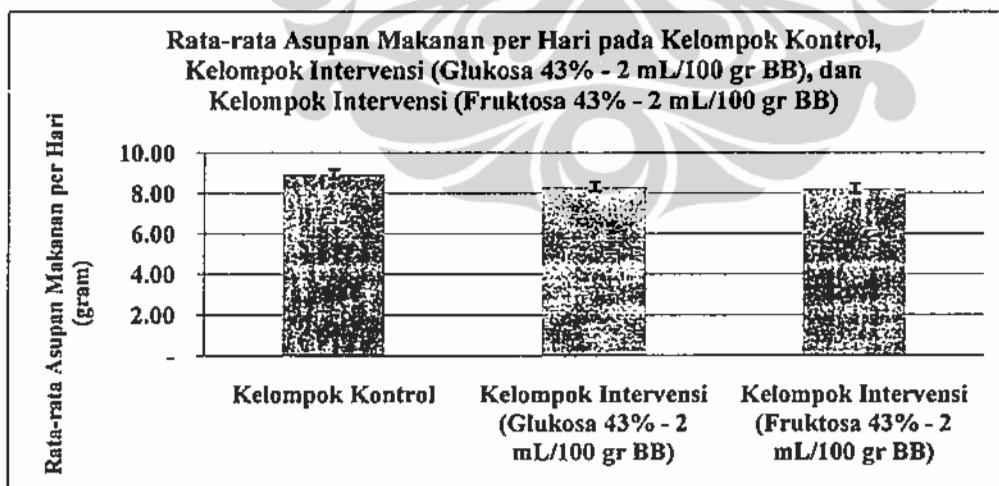
Hasil

Pemeriksaan kadar hormon leptin *postprandial* dilakukan secara duplo. Didapatkan kadar hormon leptin *postprandial* pada kelompok kontrol adalah $0,662 \pm 0,38$ ng/mL, rata-rata pada kelompok perlakuan dengan glukosa 43%-2 mL/100 g BB/hari adalah $1,383 \pm 0,49$ ng/mL, dan rata-rata pada kelompok perlakuan dengan fruktosa 43%-2 mL/100 g BB/hari adalah $1,016 \pm 0,67$ ng/mL (gambar 1).



Gambar 1. Rata-rata kadar hormon pada kelompok hewan uji

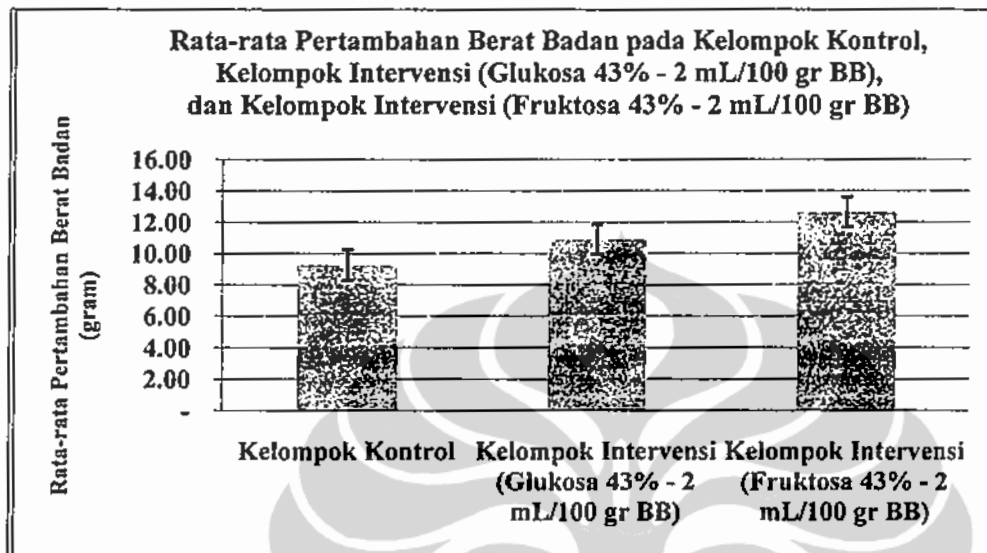
Rata-rata asupan makanan tikus perhari pada kelompok kontrol adalah $8,98 \pm 0,79$ gram, rata-rata pada kelompok perlakuan glukosa 43%-2 mL/100 g BB/hari adalah $8,35 \pm 0,71$ gram, dan rata-rata pada kelompok perlakuan fruktosa 43%-2 mL/100 g BB/hari adalah $8,26 \pm 0,97$ gram (gambar 2). Berdasarkan analisis data didapatkan bahwa jumlah asupan makanan antar kelompok kontrol dan kelompok perlakuan secara statistik tidak menunjukkan perbedaan bermakna ($p=0,121$). Tetapi secara deskriptif dapat dilihat kecenderungan bahwa jumlah asupan makanan pada kelompok kontrol paling tinggi, kemudian diikuti kelompok intervensi dengan glukosa 43%-2 mL/100gr bb dan terakhir kelompok intervensi dengan fruktosa glukosa 43%-2 mL/100gr bb.



Gambar 2. Rata-rata asupan makanan per hari pada kelompok hewan uji

Rata-rata pertambahan berat badan pada kelompok kontrol adalah $9,29 \pm 5,90$ gram, rata-rata pada kelompok perlakuan dengan glukosa 43%-2 mL/100 g BB/hari adalah $10,92 \pm 6,23$ gram, dan rata-rata pada kelompok perlakuan dengan fruktosa 43%-2 mL/100 g BB/hari adalah $12,66 \pm 4,41$ gram (gambar 3). Berdasarkan analisis data didapatkan bahwa

pertambahan berat badan antar kelompok kontrol dan kelompok perlakuan secara statistik tidak berbeda bermakna ($p=0,415$). Tetapi secara deskriptif dapat dilihat kecenderungan bahwa pertambahan berat badan pada kelompok perlakuan dengan fruktosa 43%-2 mL/100gr bb paling tinggi, kemudian diikuti kelompok perlakuan dengan glukosa 43%-2 mL/100gr bb dan terakhir kelompok kontrol.



Gambar 21. Rata-rata pertambahan berat badan pada kelompok hewan uji

Pembahasan

Hubungan sebab akibat diet fruktosa dan obesitas serta mekanisme patofisiologi penyebabnya secara tepat belum diidentifikasi. Tetapi penelitian terbaru oleh Teff *et al* telah mengidentifikasi pengaruh konsumsi fruktosa terhadap sistem endokrin yang terlibat dalam regulasi asupan makanan dan berat badan pada manusia, dan menunjukkan bahwa konsumsi fruktosa dibandingkan dengan konsumsi glukosa menyebabkan lebih rendahnya sekresi insulin dan produksi leptin dan melemahkan penekanan kadar ghrelin plasma *postprandial* setelah dilakukan observasi selama 24 jam. Data ini memberikan penjelasan dengan pendekatan endokrin bahwa diet fruktosa berkontribusi untuk meningkatkan asupan makanan dan berat badan yang akhirnya menyebabkan obesitas.

Berdasarkan data tersebut maka penelitian ini dilakukan yang bertujuan untuk mengetahui perbandingan pengaruh diet tinggi fruktosa dan diet tinggi glukosa terhadap kadar leptin *postprandial* serum tikus dan pengaruhnya terhadap asupan makanan dan berat badan setelah dilakukan perlakuan selama 15 hari. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental secara *in vivo* dengan menggunakan desain paralel, acak pada tiga kelompok tikus jantan spesies *Sprague-Dawley*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kadar leptin serum *postprandial* tikus setelah 15 hari perlakuan lebih tinggi secara bermakna pada tikus yang mengkonsumsi glukosa 43%-2 mL/100 kg bb/hari dibandingkan kelompok kontrol, sedangkan kadar leptin serum *postprandial* setelah mengkonsumsi fruktosa 43%-2 mL/100 kg bb/hari lebih tinggi dari kelompok kontrol tetapi tidak berbeda bermakna dan lebih rendah dalam kelompok perlakuan glukosa 43%-2 mL/100 kg bb/hari. Hasil ini sejalan dengan hipotesis bahwa jumlah leptin *postprandial* yang dilepaskan ke sirkulasi darah diatur pada level post-transkripsi (translasi dan sekresi) yang dimodulasi secara akut dan dipengaruhi oleh kadar insulin serta ketersediaan substrat energi^{14,15,28,29}.

Meningkatnya kadar leptin *postprandial* secara bermakna setelah tikus diberi larutan glukosa kemungkinan disebabkan oleh dua hal. Pertama, pemberian larutan glukosa

menyebabkan peningkatan glukosa darah yang kemudian di *uptake* oleh sel beta pankreas melalui GLUT2 sehingga meningkatkan sintesis dan sekresi insulin dari sel beta pankreas. Dengan demikian terjadi peningkatan kadar insulin darah. Peningkatan kadar insulin darah kemudian akan meningkatkan sintesis (translasi) dan sekresi leptin dari jaringan adiposa dalam waktu 30 menit, dengan demikian terjadi peningkatan kadar leptin darah dalam jangka pendek (1-2 jam) *postprandial*. Kedua, glukosa darah juga akan di *uptake* oleh sel adiposa dengan bantuan insulin. Glukosa ini menyediakan substrat energi bagi adiposa yang membantu meningkatkan translasi leptin dalam sel adiposa.

Peningkatan insulin darah yang diikuti oleh meningkatnya kadar leptin darah dapat dilihat pada penelitian sebelumnya, yang dilakukan oleh Teff et al (2004), Akhavan et al (2007), Stanhope et al (2008) dan Adam et al (2008). Sedangkan bagaimana mekanisme insulin dapat meningkatkan kadar insulin darah baru-baru ini telah diungkapkan dalam penelitian Lee et al (2009).

Sebaliknya, peningkatan kadar leptin *postprandial* yang tidak bermakna setelah tikus diberi larutan fruktosa pada penelitian ini kemungkinan karena fruktosa tidak menyebabkan peningkatan kadar insulin karena pankreas tidak memiliki transporter fruktosa GLUT5². Dengan demikian, tidak seperti glukosa, sintesis dan sekresi leptin oleh sel adiposa pada tikus yang diberi larutan fruktosa tidak dibantu oleh insulin.

Pada penelitian ini kadar leptin darah kelompok perlakuan fruktosa memiliki kecenderungan yang lebih tinggi dari kelompok kontrol. Mekanisme fruktosa yang menyebabkan peningkatan kadar leptin darah yang lebih tinggi dari kelompok kontrol diantaranya, pertama, kemungkinan pemberian fruktosa dosis tinggi pada penelitian ini cukup untuk menyediakan substrat energi pada sel adiposa untuk meningkatkan sintesis leptin. Pada keadaan tidak ada glukosa maka *uptake* fruktosa oleh sel adiposa akan meningkat sampai dua kali lipat melalui GLUT5 dan kemungkinan GLUT4¹⁸. Dengan demikian maka sintesis leptin dalam sel adiposa *postprandial* meningkat pada kelompok perlakuan fruktosa, sehingga kadar leptin *postprandial*nya lebih tinggi dari kelompok kontrol tetapi tidak lebih tinggi dari kelompok perlakuan glukosa.

Kedua, pada penelitian ini, meskipun pengukuran kadar leptin darah dilakukan satu jam *postprandial* yang menggambarkan pengaruh akut keadaan setelah makan (*postprandial*) terhadap kadar leptin, tetapi perlu diingat bahwa pengukuran kadar leptin ini dilakukan setelah 15 hari tikus mendapat perlakuan, sehingga pengaruh kronik perlakuan tersebut juga turut mempengaruhi jumlah kadar leptin *postprandial*nya. Hal ini disebabkan oleh adanya pengaruh perlakuan pada level transkripsi yang turut berkontribusi mempengaruhi hasil kadar leptin yang diukur pada penelitian ini. Perlakuan jangka panjang menyebabkan terjadinya perbedaan ukuran sel adiposa yang proporsional dengan level m-RNA leptin sehingga turut mempengaruhi jumlah leptin yang dilepas dalam sirkulasi. Pada penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa terdapat korelasi positif antara jumlah mRNA leptin, jumlah leptin pada jaringan adiposa dan dalam sirkulasi darah¹⁹. Maka, karena pada penelitian ini berat badan tikus kelompok perlakuan fruktosa lebih tinggi dari kelompok lainnya maka produksi leptin basal kelompok tikus yang mendapatkan perlakuan fruktosa lebih besar dari kelompok kontrol yang proporsional dengan ukuran sel adiposanya. Sedangkan pada kelompok tikus yang mendapatkan perlakuan glukosa pertambahan berat badannya lebih kecil dibandingkan kelompok perlakuan fruktosa tetapi kadar leptin darahnya paling tinggi karena dipengaruhi oleh insulin.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat kecenderungan jumlah asupan makanan perhari pada kelompok kontrol lebih tinggi dibandingkan kelompok lainnya, kemudian diikuti kelompok perlakuan dengan glukosa 43%-2 mL/100 gr bb dan terakhir kelompok perlakuan dengan fruktosa 43%-2 mL/100 gr bb. Jadi, kelompok tikus dengan perlakuan fruktosa justru jumlah asupan makanan per harinya paling kecil. Hasil ini tidak

sesuai dengan hipotesis awal yang menyebutkan bahwa fruktosa dapat menyebabkan *overconsumption* karena pemberian fruktosa tidak menyebabkan peningkatan kadar insulin dan leptin darah, dengan demikian penekanan nafsu makan atau sinyal kenyang yang terbentuk setelah mengkonsumsi fruktosa menjadi terhambat.

Sebenarnya, penelitian sebelumnya mengenai perbandingan pengaruh konsumsi glukosa dan fruktosa terhadap jumlah asupan makanan masih kontroversial^{20,21,22,23}. Hal ini dipengaruhi oleh protokol penelitian yang berbeda-beda, diantaranya dipengaruhi oleh jenis perlakuan yang diberikan dalam bentuk padat atau cairan, dosis, waktu dan cara pemberian.

Kelompok perlakuan memiliki jumlah asupan makanan yang lebih kecil dari kelompok kontrol karena kelompok perlakuan melakukan kompensasi dengan mengurangi asupan makanan karena beberapa hal. Pertama, kelompok perlakuan telah mendapatkan tambahan energi dari cairan yang diberikan. Kedua, cairan yang diberikan memiliki rasa yang manis sehingga juga turut berperan dalam menimbulkan rasa kenyang. Ketiga, kemungkinan berhubungan dengan faktor gastrointestinal dan sinyal kenyang yang berhubungan dengan perlakuan tersebut³⁰.

Jumlah asupan makanan kelompok perlakuan glukosa lebih kecil dari kelompok kontrol kemungkinan disebabkan oleh konsumsi glukosa yang meningkatkan kadar gula darah, yang diikuti oleh meningkatnya kadar insulin dan leptin darah sehingga menekan nafsu makan.

Sedangkan faktor yang menyebabkan fruktosa memiliki efek yang relatif lebih kuat dalam menekan nafsu makan dibandingkan glukosa kemungkinan adalah faktor gastrointestinal²⁴. Fruktosa diabsorpsi lebih lambat dari glukosa, sehingga memungkinkan waktu kontak yang lebih lama dengan reseptor gastrointestinal dan menghasilkan sinyal kenyang yang lebih lama. Kontak nutrisi dengan usus halus dipostulatkan merupakan sumber utama rasa kenyang *postgastric* yang dapat merangsang peptida kenyang. Peptida tersebut diantaranya glucagon, bombesin, gastrin, somatostatin, neurotensin, dan *glucagon-like peptide 1*. Disamping itu, fruktosa diabsorpsi secara tidak lengkap sehingga menyebabkan lingkungan yang hiperosmolar pada usus besar. Cairan hiperosmolar ini dapat menyebabkan perasaan malaise dan dapat menurunkan asupan makanan.

Ditinjau dari indeks glikemik, fruktosa dan glukosa juga menyebabkan penekanan asupan makanan yang berbeda. Indeks glikemik sebenarnya ditentukan secara empiris, dan umum digunakan untuk membedakan dan membandingkan berbagai jenis nutrisi yaitu untuk menggambarkan efek 50 gram karbohidrat pada suatu makanan terhadap level gula darah dibandingkan dengan 50 gram glukosa. GI berkisar antara 100 untuk glukosa dan 20 untuk fruktosa. Makanan dengan GI yang tinggi dilaporkan dapat menurunkan nafsu makan hanya dalam jangka pendek, sementara makanan dengan GI yang rendah efek kontrol asupan energinya lebih lambat tetapi lebih lama.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan berat badan kelompok tikus yang mendapatkan perlakuan fruktosa lebih tinggi daripada kelompok lainnya meskipun jumlah asupan makanan per hari kelompok perlakuan fruktosa justru lebih rendah dari kelompok lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa keseimbangan energi positif yang terjadi pada kelompok perlakuan fruktosa bukan disebabkan karena peningkatan masukan energi melalui asupan makanan tetapi disebabkan oleh faktor lainnya. Tetapi, sayangnya kemungkinan faktor lainnya pada penelitian ini tidak dieksplorasi lebih lanjut karena keterbatasan penelitian.

Kemungkinan peningkatan berat badan yang lebih besar pada kelompok perlakuan fruktosa berdasarkan teori yang ada dapat diduga disebabkan oleh beberapa hal. Pertama, kelompok perlakuan fruktosa kemungkinan memiliki *energy expenditure* yang lebih rendah dari kelompok perlakuan glukosa²⁵. Hal ini amat mungkin terjadi karena kelompok tikus perlakuan fruktosa memiliki kadar leptin darah yang lebih rendah dari kelompok glukosa

sehingga *energy expenditure*-nya juga lebih rendah. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk membuktikan hal ini dengan cara mengukur *energy expenditure* pada kedua kelompok tikus secara langsung.

Kemungkinan kedua, dibandingkan glukosa, fruktosa merupakan substrat yang lebih disukai hati untuk dibentuk menjadi trigliserida sehingga proses adipogenesis lebih tinggi dari kelompok glukosa. Penelitian yang dilakukan oleh Stanhope *et al* (2008), Teff *et al* (2004), Chong *et al* (2007) dan Angelopoulos *et al* (2009) menunjukkan bahwa konsumsi fruktosa dalam dosis tinggi menyebabkan terjadinya peningkatan trigliserida darah. Dan, berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Jurgens *et al* (2005), pada kelompok tikus yang mendapatkan perlakuan fruktosa terjadi proses adipogenesis yang lebih tinggi dibandingkan kelompok lainnya karena proses metabolisme fruktosa terjadi lebih cepat dan menyediakan substrat lipogenik yang lebih banyak sehingga ukuran sel adiposanya menjadi lebih besar. Tetapi, karena keterbatasan penelitian, variabel jumlah lemak tubuh (*body fat*) pada tikus secara langsung tidak dilakukan pada penelitian ini.

Kemungkinan ketiga, pada kelompok perlakuan fruktosa seperti yang telah dijelaskan di atas, terjadi peningkatan kadar trigliserida darah⁸. Peningkatan kadar trigliserida ini dapat menyebabkan menurunnya transpor leptin menembus *blood brain barrier* yang dapat menginduksi resistensi leptin^{26,27}. Dengan demikian, walaupun kadar leptin cukup tinggi pada kelompok perlakuan fruktosa dibandingkan kelompok kontrol, namun tidak cukup untuk mempertahankan berat badan tikus tersebut dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Oleh karena itu, untuk mengungkap keterlibatan langsung faktor-faktor di atas yang turut berkontribusi meningkatkan berat badan pada kelompok perlakuan fruktosa, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan pemeriksaan yang lebih lengkap seperti pemeriksaan *energy expenditure*, jumlah lemak tubuh tikus, dan kadar trigliserida darah tikus.

Kesimpulan

Fruktosa memiliki kecenderungan menyebabkan kadar leptin *postprandial* lebih rendah dari glukosa dan memiliki kecenderungan menyebabkan penurunan asupan makanan dan peningkatan berat badan yang lebih besar dibandingkan glukosa.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹ Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition&metabolism*. 2005;2:5
- ² Douard V, Ferraris RP. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.2008;295: E227-E237
- ³ Adams S.H, Stanhope K.L, Grant R.W, Cummings B.P, Havel P.J. Metabolic and endocrine profiles in response to systemic infusion of fructose and glucose in rhesus macaques. *Endocrinology*. June 2008; 149(6):3002-3008
- ⁴ Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:537-543
- ⁵ Malik VS, Schulze MB, Hu FB. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2006;84:274-288
- ⁶ Le KA, Tappy L. Metabolic effect of fructose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9:469-475
- ⁷ Bantle J.P. Dietary fructose and metabolic syndrome and diabetes. *J. Nutr*. 2009; 139:1263S-1268S
- ⁸ Chang F.M, Fielding B.A, Frayn K.N. Mechanism for the acute effect of fructose on *postprandial* lipemia. *Am J Clin Nutr*. 2007;85:1511-1520
- ⁹ Schaefer E.J, Gleason J.A, Dansinger M.L. Dietary fructose and glucose differentially affect lipid and glucose homeostasis. *J Nutr*. 2009; 139:1257S-1262S
- ¹⁰ Teff KL, Elliott SS, Tschop M, et al. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates *postprandial* suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2963-72
- ¹¹ Stanhope K.L, Havel P.J. Endocrine and metabolic effects of consuming beverages sweetened with fructose, glucose, sucrose or high-fructose corn syrup. *Am J Clin Nutr*. 2008; 88:1733S-1737S
- ¹² Akhavan T, Anderson G.H. Effects of glucose to fructose ratio in solutions on subjective satiety, food intake, and satiety hormones in young man. *Am J Clin Nutr*. Juli 2007; 86:1354-1363
- ¹³ Cummings D.E. Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiology & Behavior*.2006;89:71-84
- ¹⁴ Lee M.J, Fried S.K. Integration of hormonal and nutrient signals that regulate leptin synthesis and secretion (review). *Am J Physiol Endocrinol Metab*. March 2009; 296: E1230-1238
- ¹⁵ Lee M.J, Fried S.K. Multilevel regulation of leptin storage, turnover, and secretion by feeding and insulin in rat adipose tissue. *Journal of lipid research*. May 2006; 47:1984-1993
- ¹⁶ Singh K.A, Boozer C.N, Vasselli J.R. Acute insulin-induced elevation of circulating leptin and feeding inhibition in lean but not obese rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. March 2005; 289: R373-R379
- ¹⁷ Lee M.J, Wang Y, Ricci M.R, Sullivan S, Russel C.D, Fried S.K. Acute and chronic regulation of leptin synthesis, storage, and secretion by insulin and dexamethason in human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.Nov 2006; 292:E858-E864
- ¹⁸ Froesch E.R, Ginsberg J.L. Fructose metabolism of adipose tissue. I. comperative of fructose and glucose metabolism in epididymal adipose tissue of normal rat. *J. Biol Chem*. 1962; 237: 3317-3324
- ¹⁹ Fried SK, Ricci MR, Russell CD, Laferre're B. Regulation of Leptin Production in Humans. *J. Nutr*. 2000;130: 3127S-3131S
- ²⁰ Moran T.H. Fructose and satiety. *J. Nutr*.2009; 139: 1253-1256
- ²¹ Lindqvist A, Baelemans A, Albertsson C.E. Effect of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regulatory peptides*. 2008; 150: 26-32
- ²² Kanarek R.B, Gambill O.N. Different effect of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats. *J. Nutr*.1982; 112:1546-1554
- ²³ Tappy L, Kim A.L. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev*. 2010; 90: 23-46
- ²⁴ Anderson G.H, Woodend D. Consumption of sugars and the regulation of short-term satiety and food intake. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2003;78 (4): 843S-849S
- ²⁵ Jurgens H, Haass W, Castaneda T.R, Schurmann A.S, Koebnick C, Dombrowski F, et al. Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obesity research*. 2005; 13(7):1146-1156

²⁶ Banks WA, Coon AB, Robinson SM, Moinuddin A, Shultz JM, Nakaoke R, Morley JE. Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes*. 2004; 53: 1253–1260

²⁷ Saphiro A, et al. Fructose induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 295: 1370-1375

