



ISSN 2745-8687



Original Articles

Sanus Medical Journal

DOI 10.22236/sanus.v1i1.5431

Received: August, 2020

Accepted: February, 2021

Published online: February, 2021

Pengaruh Pemberian Diet Restriksi Vitamin B12 pada Tikus: Kajian Insulin dan Glukosa Plasma

Imelda Rosalyn S^a, Dewi Irawati SS^a, Irena Ujjanti^{b,c}, Patwa Amani^d

^aDepartemen Fisiologi Medis, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

^bDepartemen Fisiologi Medis, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA, Jakarta, Indonesia

^cProgram Doktorat Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

^dDepartemen Fisiologi Medis, Fakultas Kedokteran, Universitas Trisakti, Jakarta, Indonesia

Kata kunci

Homosistein, Defisiensi vitamin B12, Glukosa, Insulin, Resistensi Insulin

Abstrak

Latar Belakang. Kekurangan vitamin B12 masih menjadi masalah kesehatan baik di negara maju maupun berkembang. Banyak studi jurnal menunjukkan adanya hubungan antara kekurangan vitamin B12 dengan gangguan metabolisme, salah satunya adalah resistensi insulin, salah satu gangguan metabolisme terbesar. Resistensi terhadap insulin dapat dinilai dengan perubahan kadar glukosa plasma dan insulin. Studi ini mengeksplorasi kemungkinan hubungan antara pembatasan vitamin B12 dan metabolisme glukosa.

Metode. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental pada 18 ekor tikus Sprague Dawley jantan (*Rattus norvegicus*, 300-400 gram, umur 7-8 bulan), yang dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kontrol (G1), kelompok perlakuan empat minggu (G2) dan Kelompok perlakuan 12 minggu (G3). Pada kelompok kontrol diberikan pakan rutin standar, sedangkan kelompok perlakuan diberi pakan defisiensi vitamin B12 AIN-93M sesuai umur perlakuan.

Hasil. Glukosa plasma meningkat pada kelompok perlakuan setelah 4 minggu (kontrol vs P1 = $104,7 \pm 5,04$ vs $206,8 \pm 4,5$; $p = 0,000$) dan 12 minggu (kontrol vs P3 = $99,9 \pm 6,3$ vs $144,7 \pm 6,8$; $p < 0,01$). Insulin plasma menurun pada kelompok perlakuan setelah 4 minggu (kontrol vs P1 = $63,8 \pm 1,5$ vs $59,9 \pm 0,7$; $p > 0,05$) dan 12 minggu (kontrol vs P3 = $61,5 \pm 0,64$ vs $57,4 \pm 1$; $p > 0,05$).

Kesimpulan. Peningkatan defisiensi homosistein akibat diet vitamin B12 dapat menyebabkan sindrom resistensi insulin. Akibatnya, kadar insulin glukosa dan plasma terganggu.

© 2021 SMJ, Jakarta



Pendahuluan

Hati berperan dalam mengatur homeostasis glukosa di dalam tubuh. Kenaikan kadar glukosa puasa disebabkan oleh peningkatan produksi glukosa endogen yang berasal dari proses glukoneogenesis dan glikogenolisis di hati. Kedua proses ini umumnya terjadi karena diatur oleh hormon insulin.¹ Jika terjadi resistensi insulin di hati, efek penghambatan insulin pada mekanisme produksi glukosa tidak optimal.² Semakin tinggi tingkat resistensi insulin maka semakin rendah daya hambat proses glikogenolisis dan glukoneogenesis, sehingga jumlah produksi glukosa oleh hati juga akan meningkat yang dapat menyebabkan terjadinya hiperglikemia.³ Salah satu patogenesis hiperglikemia adalah gangguan pensinyalan insulin oleh zat toksik tertentu yang akan mengganggu protein penyusun jalur transmisi insulin, beberapa literatur menyatakan bahwa homosistein salah satunya.⁴ Agregasi homosistein teroksidasi akan membentuk tiolakton homosistein. Dalam sebuah studi yang dilakukan secara *in vitro* oleh Najib et al. Pada hati tikus yang disuntik dengan reseptor insulin manusia, hal itu menunjukkan bahwa tiolakton homosistein menghambat aktivitas reseptor tirosin kinase insulin, sehingga aktivitas fosfatidylinositol 3-kinase berkurang sekaligus merusak jalur pensinyalan insulin. Homosistein tiolakton juga berinteraksi langsung dengan 3-kinase fosfatidylinositol, menghambat aktivasi Akt secara *in vitro* atau *in vivo*, yang mengakibatkan resistensi insulin.⁵

Vitamin B12 atau cobalamin merupakan vitamin dengan molekul kompleks, karena mengandung atom kobalt yang terikat. Vitamin B12 adalah metabolit sekunder yang diproduksi hanya oleh beberapa jenis bakteri dan archaea. Asupan vitamin B12 hampir secara eksklusif berasal dari sumber hewani. Asupan vitamin B12 yang tidak memadai dari pola makan vegetarian pada orang dewasa muda adalah penyebab utama kekurangan vitamin B12. Sebaliknya, gangguan penyerapan adalah penyebab paling umum dari kekurangan vitamin B12 di geriatri.⁶ Bagian dari penelitian ini telah membuktikan bahwa pemberian pakan dengan restriksi vitamin B12 dapat menyebabkan terjadinya penurunan kadar vitamin B12 dan peningkatan homosistein plasma.^{7,8} Sampai saat ini belum ada penelitian yang dilakukan untuk menjelaskan mekanisme yang menghubungkan agregasi homosistein yang disebabkan oleh restriksi vitamin B12 dengan keadaan resistensi insulin, yang ditunjukkan dengan perbaikan kadar glukosa plasma dan kadar insulin pada hewan coba.⁹ Berdasarkan hal tersebut, dilakukan penelitian tentang pengaruh pembatasan vitamin B12 pada tikus terhadap peningkatan glukosa plasma dan kadar insulin.

Material dan Metode

Desain Penelitian dan Hewan Coba

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan menggunakan tikus Sprague Dawley jantan umur 35 - 40 minggu yang dibagi secara acak menjadi tiga kelompok yaitu: 1) kelompok pertama merupakan kelompok kontrol 2)

3) kelompok ketiga menerima pemberian diet restriksi vitamin B12 selama 12 minggu. Bentuk standar diet diberikan kepada kelompok kontrol, *ad libitum*. Sedangkan pakan jenis AIN-93 M yang dimodifikasi akan diberikan pada kelompok perlakuan, sehingga tidak mengandung vitamin B12 dan ditambahkan pektin sehingga vitamin B12 tidak dapat di absorpsi. Pakan yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Study Diets, USA. Pemeliharaan dilanjutkan dengan pemberian perlakuan hewan coba, pemenggalan hewan coba dan pengambilan spesimen hewan coba dilakukan di Pusat Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (PUSLITBANGKES) FKUI. Sampel diolah dan dianalisis di Laboratorium Terpadu FKUI.

Parameter Biokimia

Uji gula darah puasa dilakukan dengan metode spektrofotometri. Enzim oksidase glukosa mengkatalisis reaksi oksidasi glukosa menjadi asam glukonat dan hidrogen peroksida. Produk reaksi tersebut dapat diukur pada panjang gelombang 546 nm dengan fotometer. Kadar insulin ditentukan dengan menggunakan paket standar ELISA (Rat homocysteine ELISA, MyBioSource, USA). Di Lembaga Imunoendokrinologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Analisis Statistik

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan uji-T independen untuk kadar glukosa plasma dan kadar insulin plasma, di mana kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol sesuai waktu perlakuan. Data sebelumnya dianalisis untuk normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk. Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak SPSS 12 (Ilmu Sosial Statistik 12).

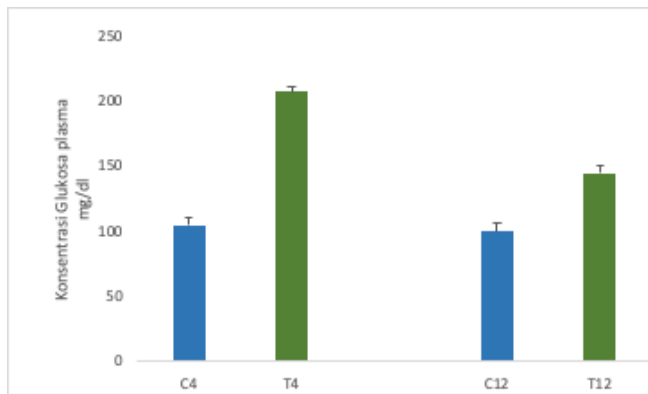
Hasil

Berdasarkan uji-t independen, terdapat perbedaan yang signifikan pada kadar glukosa plasma antara kelompok kontrol ($n=6$) dan perlakuan pada minggu keempat ($n=6$) dan minggu ke duabelas ($n=6$), diperlihatkan pada gambar 1.

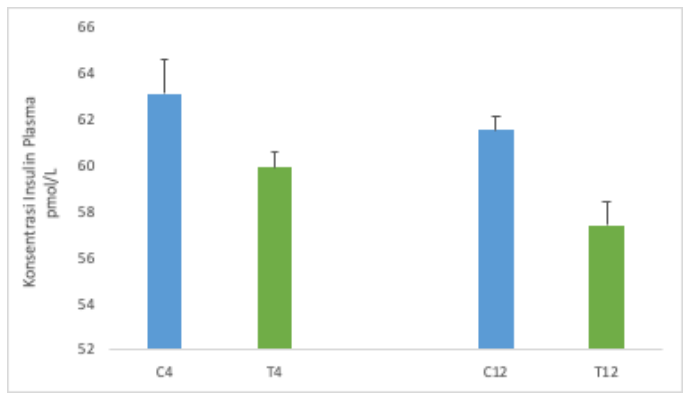
Berdasarkan uji-t independen, tidak terdapat perbedaan bermakna kadar insulin plasma antara kelompok kontrol dan perlakuan pada minggu ke 4 dan minggu ke 12, diperlihatkan pada gambar 2

Diskusi dan Kesimpulan

Peningkatan terjadi pada kadar glukosa plasma selama empat dan dua belas minggu perlakuan. Peningkatan glukosa mungkin disebabkan oleh toksisitas homosistein intraseluler, yang ditandai dengan hiperhomosisteinemia. Kondisi ini menyebabkan stres oksidatif yang mengakibatkan terjadinya resistensi insulin melalui jalur ROS.¹⁰ Kemungkinan lain adalah reaksi homosistein tiolakton homosistein. Penumpukan homosistein memungkinkan tiolakton homosistein



Gambar 1. Kadar glukosa plasma, minggu ke-4 (104.7 ± 5.04 vs 206.8 ± 4.5 $p = 0.00$) dan minggu ke-12 (99.9 ± 6.3 vs 144.7 ± 6.8 $p < 0.01$, $n = 6$)



Gambar 2. Kadar insulin plasma, minggu ke-4 (63.8 ± 1.5 vs 59.9 ± 0.7 $p > 0.05$) dan minggu ke-12 (61.5 ± 0.64 vs 57.4 ± 1 $p > 0.05$ $n = 6$)

vitamin B12 adalah sekitar 6% pada orang berusia kurang dari 60 tahun, dan hampir 20% pada mereka yang lebih dari 60 tahun.⁹ Faktor risiko tertentu meningkatkan prevalensi defisiensi vitamin B12 seperti Insufisiensi diet dari bahan yang kaya vitamin B12, kondisi autoimun yang mengurangi faktor intrinsik yang berperan pada penyerapan vitamin B12 dan penggunaan jangka panjang metformin atau obat penekan asam lambung.^{10,11} Setelah konfirmasi defisiensi B12, etiologi harus ditangani. Seringkali, sebagian besar penyebab dari defisiensi vitamin B12 adalah gangguan pada proses absorbs, namun adanya riwayat pembedahan termasuk gastrektomi, reseksi ileum terminal, atau bypass lambung Dapat menjadi factor risiko. Dalam kasus lain, riwayat kepatuhan terhadap pola makan vegan yang ketat mungkin menjadi sumbernya. Jika pemeriksaan GI dan diet keduanya negatif, kemungkinan penyebabnya adalah autoimun.

tiolakton.¹¹

Homosistein adalah produk dari reaktivitas tiolakton homosistein, yang dikatalisis dengan adanya ATP oleh enzim metionil tRNA sintetase. N-homocysteinylatoin terjadi ketika Hcy berinteraksi dengan gugus amino residu lisin pada protein di dalam gugus aminonya untuk merusak struktur atau fungsi protein.¹²

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Najib et al. yang menunjukkan penghambatan pensinyalan insulin tiolakton homosistein. Studi lain menyatakan bahwa penghambatan fosforilasi tirosin oleh tiolakton homosistein pada reseptor insulin mengganggu sinyal insulin hilir, seperti gangguan aktivasi Substrat Reseptor Insulin (IRS) dan hubungannya dengan p85-P13K, sehingga mengakibatkan terganggunya aktivasi P13K.¹³ Tiolakton homosistein juga secara langsung menghambat IRS dan P13K, selain menghambat fosforilasi tirosin pada reseptor insulin. Studi dari Yu et al. juga menyarankan bahwa sindrom Hhcy menyebabkan hiperglikemia karena peningkatan ekspresi gen PEPCK (Phosphoenolpyruvate carboxykinase).¹ Enzim PEPCK adalah enzim yang berperan dalam proses glukoneogenesis hati. Intoleransi glukosa dan resistensi insulin terjadi pada tikus transgenik dengan gen PEPCK yang berlebihan.¹²

Hati berperan dalam mengatur homeostasis glukosa dalam tubuh. Peningkatan kadar glukosa puasa lebih ditentukan oleh peningkatan produksi glukosa endogen, akibat proses glukoneogenesis dan glikogenolisis di hati. Kedua proses ini terjadi umumnya karena diatur oleh insulin.¹⁴ Ketika resistensi

Dalam studi ini mekanisme adaptif telah terbukti menurunkan kadar glukosa plasma puasa di minggu kedua belas perlakuan. Mekanisme ini dapat disebabkan oleh peningkatan ekspresi GLUT2 melalui hepatosit yang dipicu hiperglikemia.¹⁷

GLUT2 adalah protein pengangkut glukosa yang dibutuhkan untuk membawa glukosa melewati lapisan ganda lipid ke dalam sitoplasma sel. Pembawa utama glukosa di hati adalah GLUT2, yang mengontrol pertukaran glukosa antara hati dan darah. Penelitian Seung-Soon I menunjukkan bahwa glukosa dapat meningkatkan ekspresi GLUT2 di hati baik secara in vitro maupun in vivo.¹⁸ Transkripsi gen di bawah GLUT2 dalam kondisi hiperglikemik atau diabetes mellitus tipe 2 diketahui meningkat di hati. Sebuah studi tentang dampak metabolisme glukosa pada ekspresi gen GLUT2 diterbitkan oleh Rencurell et al. al. Dalam kondisi hiperglikemia, ekspresi GLUT1 dalam otot yang tidak tergantung insulin meningkat. Ide ini ditunjukkan oleh Purwanto et al. yang mengamati perubahan ekspresi GLUT1 pada tikus diabetes.^{19,20} Penelitian ini menunjukkan bahwa hipotesis yang mengatakan bahwa GLUT1 pada kondisi hiperglikemia berperan dalam respon pertahanan fisiologis dapat diterima.

Limitasi pada studi ini adalah kurang lamanya usia perlakuan sehingga disfungsi intraseluler karena terjadinya defisiensi vitamin B12 dapat tergambar dengan jelas. Diharapkan adanya studi lanjutan dalam jangka waktu yang lebih lama untuk pemberian diet restriksi vitamin B12.¹⁹

Pernyataan Etik

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik Riset Kesehatan-Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia / Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (FKUI / RSCM) dengan nomor: 184/UN2.F1/ETIK/2017.

Pernyataan Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan bahwa tidak terdapat konflik kepentingan dalam penulisan artikel ini.

Sumber Pendanaan

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian hibah pasca DIKTI 2018 yang berjudul Penelitian Pembatasan Vitamin B12 pada Fungsi dan Struktur Sintase Metionin, serta Hibah Metil Malonyl Coa-A dan Hibah PITTA UI 2018.

Referensi

1. Yu X, Huang Y, Hu Q, Ma L. Hyperhomocysteinemia stimulates hepatic glucose output and PEPCK expression. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2009;41(12):1027–32.
2. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action : molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106(2):165–9.
3. Schmitz-peiffer C. Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle : mechanisms induced by lipid oversupply. 2010;12(2000):583–94.
4. Golbahar J, Aminzadeh MA, Kassab SE, Omrani GR. Hyperhomocysteinemia induces insulin resistance in male Sprague-Dawley rats. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;76(1):1–5.
5. Najib S, Sánchez-Margalet V. Homocysteine thiolactone inhibits insulin-stimulated DNA and protein synthesis: Possible role of mitogen-activated protein kinase (MAPK), glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) and p70 S6K phosphorylation. *J Mol Endocrinol*. 2005;34(1):119–26.
6. Gammon CS, von Hurst PR, Coad J, Kruger R, Stonehouse W. Vegetarianism, vitamin B12 status, and insulin resistance in a group of predominantly overweight/obese South Asian women. *Nutrition [Internet]*. 2012;28(1):20–4. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2011.05.006>
7. Santoso DIS, Murthi AK, Yolanda S, Amani P, Ujianti I, Sianipar IR. The impact of cobalamin deficiency on heart function: A study on abnormalities in electrocardiography patterns. *Int J Appl Pharm*. 2019;11(Special Issue 6).
8. Amani P, Prijanti AR, Jusuf AA, Kartinah NT, Ujianti I, Murthi AK, et al. Cobalamin restriction with AIN-93M chow modification: Hematology and cardiovascular parameter assessment. In: *AIP Conference Proceedings*. 2019.
9. Kumari C, Kapoor S, Varughese B, Pollipali SK, Ramji S. Mutation Analyses in Selected Exons of the MUT Gene in Indian Patients with Methylmalonic Acidemia. *Indian J Clin Biochem*. 2017;32(3):266–74.
10. Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(4):470–87.
11. Undas A, Perla J, Łacinski M, Trzeciak W, Kaźmierski R, Jakubowski H. Autoantibodies against N-homocysteinylated proteins in humans: Implications for atherosclerosis. *Stroke*. 2004;35(6):1299–304.
12. Najib S, Sánchez-Margalet V. Homocysteine thiolactone inhibits insulin signaling, and glutathione has a protective effect. *J Mol Endocrinol*. 2001;27(1):85–91.
13. Li Z, Gueant-Rodriguez RM, Quilliot D, Sirveaux MA, Meyre D, Gueant JL, et al. Folate and vitamin B12 status is associated with insulin resistance and metabolic syndrome in morbid obesity. *Clin Nutr [Internet]*. 2017;(July):1–7. Available from : <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2017.07.008>
14. Ai Y, Sun Z, Peng C, Liu L, Xiao X, Li J. Homocysteine induces hepatic steatosis involving ER stress response in high methionine diet-fed mice. *Nutrients*. 2017;9(4):1–10.
15. Oh RC, Hustead TR, Ali SM, Pantsari MW. Mildly Elevated Liver Transaminase Levels: Causes and Evaluation. *Am Fam Physician*. 2017;96(11):709–15.
16. Lebeau-pin C, Vallée D, Hazari Y, Hetz C, Chevet E, Bailly-Maitre B. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol [Internet]*. 2018;69(4):927–47. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.06.008>
17. Rencurel F, Waeber G, Antoine B, Rocchiccioli F, Maulard P, Girard J, et al. Requirement of glucose metabolism for regulation of glucose transporter type 2 (GLUT2) gene expression in liver. *Biochem J [Internet]*. 1996;314 (Pt 3 : 903 – 9 . Available from : <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1217142&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
18. Lee J, Kang HS, Park HY, Moon Y, Kang YN, Oh B, et al. OPEN PPAR α -dependent Insig2a overexpression inhibits SREBP-1c processing during fasting. *Sci Rep [Internet]*. 2017; (May) : 1 – 12 . Available from : <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-10523-7>
19. Purwanto B, Sudiana IK, Herawati L, Aksono B. Muscle Glucose Transporter 1 (Glut-1) Expression in Diabetic Rat Models. *Folia Medica Indones*. 2013;49:21–5.
20. Sharma RS, Harrison DJ, Kisielowski D, Cassidy DM, McNeilly AD, Gallagher JR, et al. Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis Are Ameliorated by Pharmacologic Activation of Nrf2 (NF-E2 p45-Related Factor 2). *Cmgh [Internet]*. 2018;5(3):367–98. Available from : <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.11.016>