

EFEK METFORMIN TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI OTOT RANGKA TIKUS MODEL OBESITAS

Effects of Metformin on Histopathological Appearance of Skeletal Muscles of Obesity Model Rats

Merlionarsy Tammuan¹, David Pakaya², Mohammad Salman², Muhammad Nur Ikhsan Liwang³

AFFILIATIONS

1. Fakultas Kedokteran, Universitas Tadulako, Palu, Indonesia
2. Departemen Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tadulako, Palu, Indonesia
3. Departemen Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran, Universitas Tadulako, Palu, Indonesia

ABSTRACT

Metformin is one of the pharmacological agents used for the treatment of type 2 diabetes mellitus (DMT2). One application of metformin is currently widely used for the treatment of obesity which can cause muscle atrophy. The aim of this study is to determine the effect of metformin in reducing body weight and muscle cell diameter through histology of muscle in obese model rats. This was an experimental-research with posttest only controlled group design with qualitative and quantitative approaches. This study used 15 white male Wistar rats, aged 10-12 weeks, body weight (BW) 200-250 grams. The rats were divided into 3 treatment groups, i.e: normal control (K1), negative control (obesity model/K2), and obesity model plus 250 mg/kgBW metformin therapy (K3). The rats were modified into obesity models by high fat diet (HFD) administration. The BW measurements were conducted periodically. Histopathology of the skeletal muscle were perform from hematoxylin eosin (HE) staining in 5 randomly selected and non-overlapping visual fields using an Olympus CX23 light microscope with 400× magnification and quantified using ImageJ software. The data were analyzed by GrapPhad Prism 8.0.0 using Kruskal-Wallis non-parametric test. The results showed that the BW of the K3 group treated with metformin was lower than K1 and K2 ($p=0,0049$) and the diameter of skeletal muscle cells was higher, but not statistically significant ($p=0.2009$). In conclusion, metformin has the capacity to decrease body weight and enhance the size of skeletal muscle cells.

KEYWORDS:

Metformin, Skeletal Muscle, Obesity, Muscle Atrophy

ABSTRAK

Metformin merupakan salah satu agen farmakologis yang digunakan untuk terapi diabetes mellitus tipe 2 (DMT2). Salah satu aplikasi metformin saat ini banyak digunakan untuk terapi obesitas yang dapat menyebabkan atrofi otot. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek metformin dalam menurunkan berat badan (BB) dan diameter sel otot rangka melalui gambaran histologis otot rangka pada tikus model obesitas. Penelitian ini merupakan eksperimental dengan rancangan posttest only controlled group design. Penelitian ini menggunakan 15 ekor tikus putih galur Wistar jantan, berusia 10-12 minggu, dengan BB 200-250 gram. Tikus dibagi dalam 3 kelompok perlakuan, yaitu kontrol normal (K1), model obesitas (K2), dan model obesitas dengan terapi metformin 250mg/kgBB (K3). Tikus dimodifikasi menjadi model obesitas dengan pemberian high fat diet (HFD). Dilakukan pengukuran BB secara berkala. Gambaran histopatologi otot rangka didapatkan dari pewarnaan hematoksilin eosin (HE) pada 5 lapang pandang yang dipilih secara acak dan tidak tumpang tindih dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus CX23 perbesaran 400×. Hasil gambar dikuantifikasi menggunakan perangkat lunak ImageJ. Data dianalisis dengan GrapPhad Prism 8.0.0 menggunakan uji non parametrik Kruskal-wallis. Ditemukan berat badan kelompok K3 yang diterapi metformin lebih rendah dari K1 dan K2 ($p=0,0049$) dan rerata diameter sel otot rangka lebih tinggi, namun tidak signifikan ($p=0,2009$). Disimpulkan bahwa metformin mampu menurunkan BB serta meningkatkan diameter sel otot rangka.

KATA KUNCI:

Metformin, Otot Rangka, Obesitas, Atrofi Otot

CORRESPONDING AUTHOR:

David Pakaya

david_pakaya@untad.ac.id

PENDAHULUAN

Obesitas adalah penumpukan lemak yang berlebihan karena ketidakseimbangan asupan energi

(*energy intake*) dan energi yang digunakan (*energy expenditure*) dalam jangka waktu yang lama. Obesitas ditandai dengan indeks massa tubuh (IMT)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

lebih dari 30 (World health organization (WHO), 2018). Obesitas dipengaruhi banyak faktor seperti peningkatan diet tinggi kalori, penurunan aktivitas fisik, predisposisi genetik, serta asupan glukokortikoid berlebihan (Senesi *et al.*, 2016; Roy *et al.*, 2016). Prevalensi obesitas di Indonesia yaitu 15,4 % pada usia lebih dari 18 tahun, dan 10,8 % pada anak usia 5-12 tahun. Di kota Palu pada tahun 2018 menunjukkan angka sebesar 794 kasus, dan didominasi oleh wanita (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI), 2016; Dinas Kesehatan (Dinkes) Kota Palu, 2021).

Obesitas dapat berkembang menjadi berbagai komorbid seperti hipertensi, hiperlipidemia, dan sebagainya, bahkan menimbulkan masalah pada sendi dan otot (Roy *et al.*, 2016). Permasalahan otot pada kondisi obesitas dapat menyebabkan terjadinya atrofi otot. Atrofi otot dapat menyebabkan hilangnya massa otot sehingga menurunkan kualitas hidup, meningkatkan morbiditas dan mortalitas (Wali *et al.*, 2006).

Beberapa obat diketahui menjadi pilihan dalam terapi obesitas, termasuk obat-obat yang digunakan untuk diabetes mellitus. Metformin merupakan salah satu agen farmakologis yang digunakan untuk terapi diabetes mellitus tipe 2 (DMT2). Obat golongan biguanid ini mampu menurunkan glukosa darah dengan mengurangi glukoneogenesis dan menstimulasi insulin untuk menggunakan glukosa yang tersimpan di otot dan adiposit. Salah satu

aplikasi metformin saat ini banyak digunakan untuk terapi obesitas (Hasan *et al.*, 2019). Terapi metformin yang dikombinasikan dengan intervensi perubahan gaya hidup dapat menurunkan IMT yang dapat mencegah terjadinya diabetes mellitus pada *overweight* dan obesitas (Sadeghi *et al.*, 2020). Efek samping metformin relatif ringan dengan pemberian dosis rendah (Shurrab and Arafa, 2020). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek metformin dalam mencegah atrofi otot melalui gambaran histologis otot rangka pada kondisi obesitas.

METODE

A. Sampel Hewan Coba

Penelitian ini merupakan eksperimental dengan rancangan *posttest only controlled group design*. Penelitian ini menggunakan tikus putih galur Wistar jantan, berusia 10-12 minggu, berat badan (BB) 200 - 250 gram, dan berjumlah 15 ekor. Tikus dibagi dalam 3 kelompok perlakuan; K1: kontrol normal; K2: model obesitas; K3: model obesitas + terapi metformin 250mg/kgBB. Pengukuran BB dilakukan secara berkala pada setiap minggu sampai hari ke-63. Penelitian ini telah memperoleh izin dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako dengan nomor: 4083/UN 28.1.30/KL/2021.

B. Pewarnaan Histologi

Tikus diterminasi dan dinekropsi pada hari ke-63. Jaringan dibuat dalam blok paraffin dan dipotong dengan ketebalan 5 μ m. Pewarnaan jaringan

menggunakan Hematoksin Eosin (HE). Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus CX23* perbesaran 400× dan perangkat lunak *optilab*. Hasil gambar dikuantifikasi menggunakan perangkat lunak *ImageJ*.

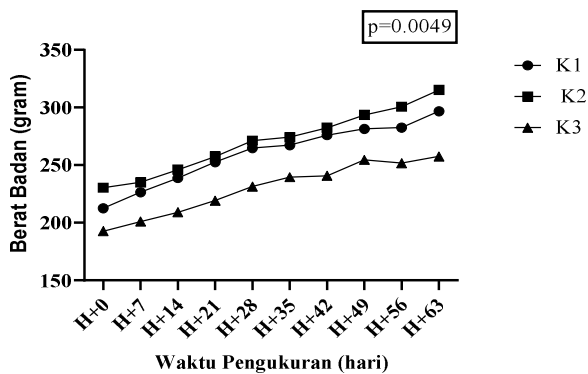
C. Analisis Statistik

Data dianalisis dengan *GraphPad Prism 8.0.0* menggunakan uji parametrik *one way Anova* dan uji lanjut *tukey* untuk menganalisis rerata berat badan tikus dan uji non-parametrik *Kruskal-wallis* untuk menganalisis rerata diameter sel otot rangka.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Berat Badan Tikus Model Obesitas

Data yang ditampilkan disini merupakan data pada kelompok tikus yang dirawat mulai awal sampai hari ke 63. Data BB dapat dilihat pada Gambar 1.



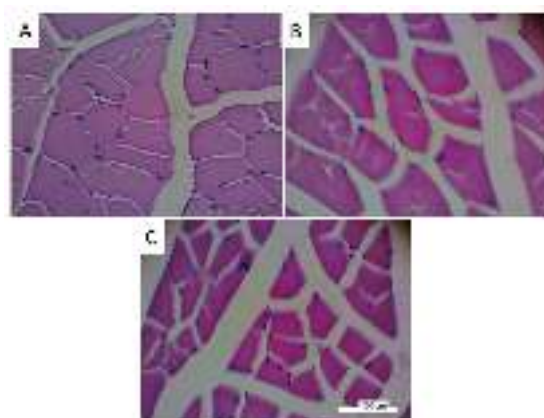
Gambar 1 Grafik Rerata Berat badan Tikus per Kelompok perlakuan.

Keterangan:

K1: Kelompok Kontrol tikus normal; K2: Kelompok tikus model obesitas; K3: Kelompok tikus model obesitas dengan terapi metformin. H+0: Sebelum pemberian HFD; H+7: 7 hari pasca pemberian HFD; H+14: 14 hari pasca pemberian HFD; H+21: 21 hari pasca pemberian HFD; H+28: 28 hari pasca pemberian HFD; H+35: 35 hari pasca pemberian HFD; H+42: 42 hari pasca pemberian HFD; H+49: 49 hari pasca pemberian HFD; H+56: 56 hari pasca pemberian HFD; H+63: 63 hari pasca pemberian HFD.

Rerata BB tikus pada awal penelitian H0 (sebelum induksi HFD) didapatkan berkisar antara 192,8 ± 30,53 sampai 230,4 ± 25,59 gram. Kelompok kontrol K1 dan kelompok model obesitas K2 mengalami peningkatan BB dari awal hingga akhir penelitian, sementara kelompok model obesitas yang diterapi metformin K3 mengalami peningkatan namun menurun pada H+56 lalu meningkat kembali pada H+63. Berat badan kelompok kontrol K1 mengalami peningkatan dari BB awal 212,6 ± 27,59 hingga BB akhir 296,8 ± 25,44. Berat badan kelompok model obesitas K2 mengalami peningkatan dari BB awal H0 230,4 ± 25,59 menjadi 315,2 ± 33,71. Berat badan awal kelompok model obesitas yang diterapi metformin yaitu 192,8 ± 30,53 dan berat badan akhir yaitu 257,6 ± 35,38. Rerata BB pada seluruh kelompok dilakukan uji normalitas *Saphiro Wilk* dan didapatkan data terdistribusi normal. Setelah dilakukan uji *One Way Anova*, didapatkan perbedaan rerata BB yang bermakna pada setiap kelompok ($p= 0,0049$).

B. Gambaran Histopatologi Otot Rangka

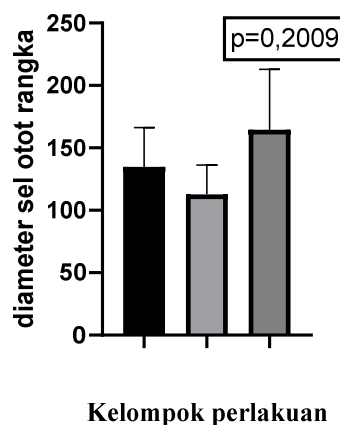


Gambar 2 Gambaran histologis otot rangka model tikus obesitas.

(A). Kelompok K1/kontrol normal; (B). Kelompok K2/kontrol negatif (model Obesitas); (C). Kelompok K3/tikus model obesitas dengan terapi metformin. (Pewarnaan: HE, Perbesaran 100 kali, skala 100 μm).

Gambar 2 menunjukkan gambaran histopatologi jaringan otot rangka. Gambar 2 (A) merupakan kelompok K1 normal yang menunjukkan diameter sel otot lebih besar daripada kelompok K2 dan K3, dengan ruang interstisial yang lebih kecil. Gambar 2 (B) menunjukkan kelompok K2 tikus model obesitas, yang memiliki diameter lebih kecil dari kelompok K3 dan ruang interstisial lebih lebar dari dua kelompok perlakuan lainnya. Gambar (C) adalah deskripsi diameter sel otot rangka pada kelompok K3 yang diterapi dengan metformin. Hasil ini menunjukkan diameter sel otot lebih besar dari K2 dan ruang interstisial yang lebih kecil dibandingkan dengan kelompok perlakuan K2.

Hasil pengukuran rerata diameter sel otot rangka dapat dilihat pada Gambar 3. Pada K1 sebagai kelompok normal, didapatkan rerata diameter sel otot rangka $134,598 \pm 31,53 \mu\text{m}$. Pada K2 yang merupakan tikus model obesitas, didapatkan rerata diameter sel otot rangka $112,76 \pm 23,32 \mu\text{m}$. Pada kelompok K3 yang mendapatkan terapi metformin, rerata diameter sel otot rangka paling besar yaitu $164,50 \pm 48,59 \mu\text{m}$. Uji non-parametrik menggunakan *Kruskal-wallis* menunjukkan adanya perbedaan yang tidak bermakna antar kelompok.



Gambar 3 Grafik diameter sel otot rangka.

Keterangan:
K1: Kelompok kontrol tikus normal; K2: Kelompok tikus model obesitas; K3: Kelompok tikus model obesitas dengan terapi metformin. Uji *Kruskal-wallis* ($p= 0,2009$).

Penelitian ini menggunakan tikus galur wistar yang diinduksi obesitas menggunakan HFD yang dibentuk dalam bentuk pakan tikus. *High fat diet* dapat menyebabkan peningkatan adiposit dan leptin, yang dapat berkembang menjadi obesitas sehingga terjadi hipertensi atau intoleransi glukosa (Dias *et al.*, 2021). *High fat diet* dapat meningkatkan kadar trigliserida darah. Hidrolisis trigliserida menjadi asam lemak bebas menghasilkan akumulasi asam lemak bebas pada kondisi obesitas (Li *et al.*, 2019).

Pada pemeriksaan berat badan yang dilakukan setiap minggu didapatkan peningkatan berat badan pada tikus kelompok K2 dan K3. Tikus kelompok K2 yang diberikan HFD mengalami peningkatan setiap minggu hingga akhir penelitian pada H+63. Tikus kelompok K3 yang diberikan HFD dan diterapi metformin mengalami penurunan BB pada H+56. Metformin dapat menurunkan berat badan dan adiposit pada tikus model obesitas.

Penurunan BB juga disertai dengan penurunan asupan kalori pada tikus model obesitas (Shin *et al.*, 2021). Mekanisme penurunan BB oleh metformin belum diketahui secara pasti, namun diperkirakan metformin memengaruhi pusat pengatur rasa lapar pada sistem saraf pusat dan menurunkan neuropeptida Y sehingga menurunkan nafsu makan. Metformin juga meningkatkan sensitivitas leptin dan insulin yang dapat berpengaruh pada penurunan asupan makanan (Sadeghi *et al.*, 2020).

Pada pengukuran diameter sel otot rangka didapatkan perbedaan tidak bermakna antar kelompok ($p= 0,2009$). Perbedaan tidak bermakna pada setiap kelompok dapat terjadi karena adanya perbedaan dosis yang digunakan. Jumlah dosis yang diberikan berbeda sehingga mempengaruhi aktivitas pada sel otot rangka (Hasan *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020).

Kelompok K1 yaitu kelompok tikus normal, memiliki rerata diameter lebih kecil daripada kelompok K3 dan lebih besar jika dibandingkan dengan kelompok K2, serta memiliki ruang interstisial lebih kecil dibandingkan semua kelompok perlakuan. Kelompok kontrol memiliki ruang interstisial lebih kecil. Hal ini sebagai tanda bahwa sel otot tidak mengalami atrofi, adanya pelebaran ruang interstisial menandakan adanya atrofi sel otot rangka (Amin *et al.*, 2018).

Pada K2 yaitu tikus model obesitas, didapatkan rerata diameter sel otot lebih kecil dan

secara histologis ruang interstisial lebih lebar daripada kelompok K3. Pemberian HFD dapat menyebabkan obesitas yang memicu terjadinya atrofi otot. Atrofi otot tersebut muncul melalui peningkatan *beclin-1* dan LC3II yang menyebabkan autofagi serta peningkatan produksi myostatin, *FoXO*, *MuRF1* dan *atrogen1* pada sistem ubiquitin proteasom. Peningkatan produksi myostatin dapat mengaktifkan jalur *the myostatin* – SMAD3 sehingga terjadi peningkatan degradasi protein dan menurunkan sintesis protein. Peningkatan myostatin juga dapat meningkatkan produksi *FoXO* yang dapat menyebabkan atrofi otot (Roy *et al.*, 2016; Bonaldo and Sandri, 2013).

Kelompok K3 merupakan kelompok model tikus obesitas yang diterapi metformin. Meskipun secara statistik tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok, rerata diameter kelompok K3 lebih besar dan secara histologi memiliki ruang interstisial yang lebih kecil daripada kelompok K2. Pemberian metformin dapat meningkatkan PGC-1 α dan menurunkan level myostatin, *FoXO*, *MuRF1* dan *atrogen1* pada otot soleus. Metformin mengaktifasi biogenesis mitokondria dengan mengaktifasi PGC-1 α yang dapat mencegah apoptosis pada sel. Metformin juga mengatur regulasi hipertropi dan atrofi pada kerusakan sel otot, mencegah stres oksidatif, meningkatkan sensitivitas insulin, dan memperbaiki penurunan massa otot pada resistensi insulin melalui sintesis ceramide (hasan *et al.*, 2019).

Penelitian lain juga mengatakan metformin memperbaiki atrofi otot pada tingkat molekuler. Metformin mencegah atrofi otot dengan meningkatkan produksi AMPK sehingga produksi ATP dan ekspresi PGC-1 α , Akt dan GLUT4 meningkat. Peningkatan AMPK juga dapat mengurangi lemak intramuskular dan penggunaan glukosa pada otot (Yang *et al.*, 2020).

SIMPULAN DAN SARAN

Metformin memiliki efek terhadap penurunan berat badan ($p= 0,0049$) dan meningkatkan diameter sel otot rangka tikus model obesitas namun tidak bermakna secara statistik ($p= 0,2009$).

DAFTAR PUSTAKA

- Amin, S.N., Hussein, U.K., Yassa, H.D., Hassan, S.S., and Rashed, L.A. 2018. Synergistic actions of vitamin D and Metformin on Skeletal Muscles and Insulin Resistance of Type 2 Diabetic Rats. *J Cell Physiol.* 233(8). Pp= 5768–79.
- Bonaldo, P. and Sandri, M. 2013. Cellular and Molecular Mechanisms of Muscle Atrophy. *DMM Dis Model Mech.* 6(1). Pp= 25–39.
- Dias, M., dos Reis, S.A., da Conceição, L.L., Sedyama, C.M.N.O., Pereira, S.S., de Oliveira, L.L., Gouveia Peluzio, M.D.C., Martinez, J.A., and Milagro, F.I. 2021. Diet-induced Obesity in Animal Models: points to consider and influence on Metabolic Markers. *Diabetol Metab Syndr.* 13(1). P= 32
- Dinas kesehatan (Dinkes) Kota Palu. 2021. *Profil kesehatan Dinas Kesehatan tahun 2018.* Available on https://dinkes.palukota.go.id/program/profil_kesehatan
- Hasan, M.M., Shalaby, S.M., El-Gendy, J., and Abdelghany, E.M.A. 2019. Beneficial effects of metformin on Muscle Atrophy Induced by Obesity in Rats. *J Cell Biochem.* 120(4). Pp= 5677–86.
- Kementerian Kesehatan RI. *Epidemi Obesitas.* 2018. Available from: <http://www.p2ptm.kemkes.go.id/dokumen-ptm/factsheet-obesitas-kit-informasi-obesitas>.
- Li, X., Wei, X., Sun, Y., Du, J., Li, X., Xun, Z., and Li, Y.C. 2019. High-fat diet Promotes Experimental Colitis by Inducing Oxidative Stress in the Colon. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.* 317(4). Pp= G453–62.
- Roy, B., Curtis, M.E., Fears, L.S., Nahashon, S.N., and Fentress, H.M. 2016. Molecular mechanisms of Obesity-induced Osteoporosis and Muscle Atrophy. *Front Physiol.* 7(SEP). Pp= 1–19.
- Sadeghi, A., Mousavi, S.M., Mokhtari, T., Parohan, M., and Milajerdi, A. 2020. Metformin Therapy Reduces Obesity Indices in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Child Obes.* 16(3). Pp= 174–91
- Senesi, P., Montesano, A., Luzi, L., Codella, R., Benedini, S., and Terruzzi, I. 2016. Metformin Treatment Prevents Sedentariness Related Damages in Mice. *J Diabetes Res.* 8274689.
- Shin, A.C., Balasubramanian, P., Suryadevara, P., Zyskowski, J., Herdt, T.H., MohanKumar, S.M.J., and MohanKumar, P.S. 2021. Metformin Effectively Restores the HPA Axis Function in Diet-Induced Obese Rats. *Int J Obes.* 45(2). Pp= 383–95.
- Shurrab, N.T. and Arafa, E.S.A. 2020. Metformin: A review of its Therapeutic Efficacy and Adverse Effects. *Obes Med.* 17. P= 100186
- Wali, J.A., Jarzebska, N., Raubenheimer, D., Simpson, S.J., Rodionov, R.N., and Sullivan, J.F.O. 2006. Cardio-Metabolic Effects of High-Fat Diets and Their Underlying Mechanisms — A Narrative Review. *Nutrients.* 12(5). P= 1505.
- World Health Organization (WHO). 2018. *Obesity Overview.* Available from: https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1
- Yang, Y., Liao, Z., and Xiao, Q. 2020. Metformin Ameliorates Skeletal Muscle Atrophy in Grx1 KO Mice by Regulating Intramuscular Lipid Accumulation and Glucose Utilization. *Biochem Biophys Res Commun.* 533(4). Pp= 1226–32.