

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan penghitungan jumlah pulau Langerhans dan sel β pankreas maka hasil dapat dilihat pada Tabel 3. dan Tabel 4. Hasil penghitungan kelompok tikus normal K1 didapatkan perbedaan yang tidak signifikan jumlah pulau Langerhans antara grup tikus kontrol normal, grup tikus normal yang diberikan glibenklamid dan grup tikus normal yang diberikan glibenklamid dan minyak buah merah. Jumlah pulau Langerhans pada kelompok tikus diabetes K2 didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara grup tikus diabetes yang diberikan glibenklamid dan minyak buah merah dengan grup tikus diabetes kontrol dan grup tikus diabetes yang diberikan glibenklamid.

Tabel 3. Rerata jumlah pulau Langerhans pada kelompok 1 dan 2.

Perlakuan	Jumlah pulau Langerhans					Rata - rata	Jumlah total
	Tikus 1	Tikus 2	Tikus 3	Tikus 4	Tikus 5		
Kontrol normal	17	34	24	62	42	35,80	179
N. Glibenklamid	22	45	40	42	38	37,40	187
N. Glibenklamid & M.buah merah	40	21	39	43	24	33,40	167
Kontrol DM	7	13	5	7	8	8,00*	48
DM. Glibenklamid	7	7	3	10	15	8,40*	42
DM. Glibenklamid & M.buah merah	17	36	32	54	42	36,20*	181

Keterangan: N. normal, DM. diabetes mellitus. * : taraf signifikansi $p < 0,05$

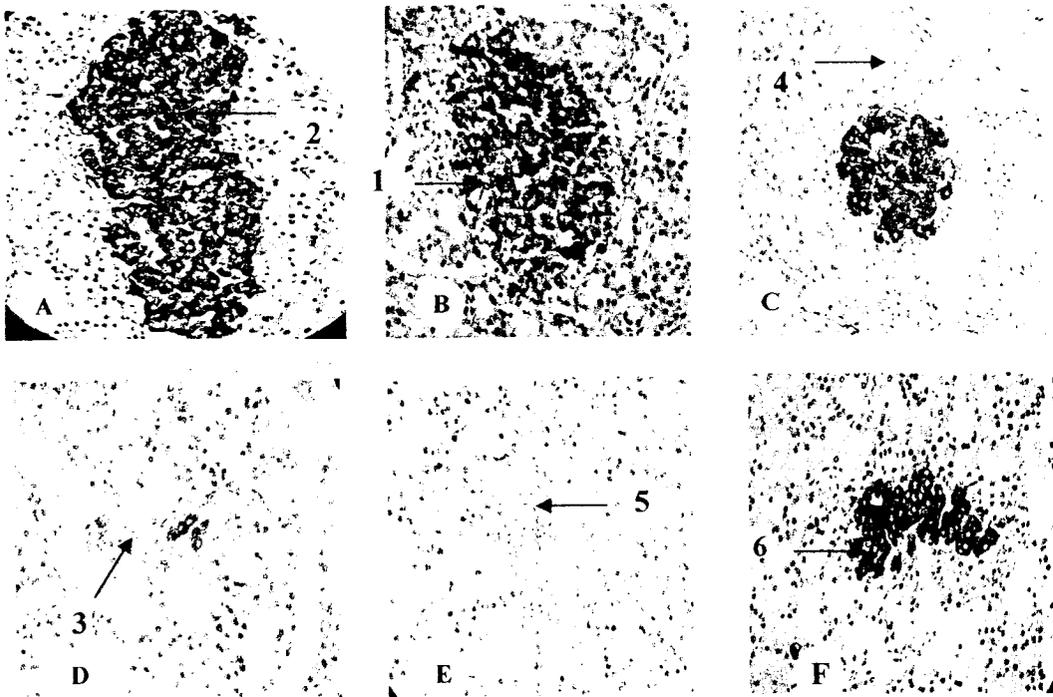
Kelompok tikus diabetes yang diberikan minyak buah merah dan glibenklamid menunjukkan bahwa jumlah pulau Langerhans meningkat sangat signifikan bila dibandingkan dengan kelompok tikus diabetes kontrol dan kelompok tikus diabetes yang diberikan glibenklamid. Jumlah pulau Langerhans pada grup tikus diabetes yang diberikan minyak buah merah dan glibenklamid sama dengan kelompok tikus normal(K1). Data ini menunjukkan bahwa pemberian minyak buah merah pada tikus diabetes dapat meningkatkan jumlah pulau Langerhans.

Tabel 4. Rerata jumlah sel β pankreas pada kelompok 1 dan 2

Perlakuan	Jumlah sel β pankreas @ 5 pulau					Rata – rata / tikus	Jumlah total
	Tikus 1	Tikus 2	Tikus 3	Tikus 4	Tikus 5		
Kontrol normal	322	562	558	232	481	431,00	2.150
N. Glibenklamid	289	511	616	545	580	508,20	2.541
N. Glibenklamid & M.buah merah	300	388	487	531	453	431,80	2.159
Kontrol DM	353	130	223	64	146	183,20*	916
DM. Glibenklamid	301	187	159	135	285	213,40*	1.067
DM. Glibenklamid & M.buah merah	528	513	279	284	394	399,60*	1.998

Hasil penghitungan kelompok tikus normal K1 didapatkan perbedaan yang tidak signifikan jumlah sel β pankreas grup tikus kontrol normal, grup tikus normal yang diberikan glibenklamid dan grup tikus normal yang diberikan glibenklamid dan minyak

buah merah. Jumlah sel β pankreas pada kelompok tikus diabetes K2 didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara grup tikus diabetes yang diberikan glibenklamid dan minyak buah merah dengan grup tikus diabetes kontrol dan grup tikus diabetes yang diberikan glibenklamid. Data diatas menunjukkan bahwa pemberian minyak buah merah pada tikus diabetes meningkatkan jumlah sel β pankreas yang masih hidup.



Keterangan: 1. Pulau Langerhans berwarna coklat yang tidak homogen, 2. Pulau Langerhans berwarna coklat yang homogen, 3. Pulau yang mengalami atropi, 4. Kelenjar eksokrin, 5. Pulau yang tidak tercat antibodi-anti-insulin. 6. Pulau Langerhans mengalami regenerasi sel β pankreas.

Gambar 8. Gambaran pulau Langerhans dengan pengecatan imunohistokimia menggunakan antibodi anti-insulin. A. Grup kontrol normal dengan gambaran pulau yang lebar dan intensitas warna coklat yang homogen. B. Grup normal dengan pemberian glibenklamid, tampak pulau yang lebar dengan warna coklat yang kurang homogen. C. Grup normal dengan pemberian glibenklamid dan minyak buah merah, tampak warna coklat tua yang homogen. D. Grup kontrol diabetes, tampak pulau mengalami atropi dan

beberapa sel β yang tercat warna coklat. E. Grup diabetes dengan pemberian glibenklamid, tampak pulau masih lebar tetapi tidak tampak warna coklat. F. Grup diabetes dengan pemberian glibenklamid dan minyak buah merah, tampak gambaran pulau dengan sel-sel β tercat coklat tua yang homogen. Gambar dilihat dengan mikroskop cahaya perbesaran 400 X.

Kadar gula darah puasa yang tinggi pada tikus kontrol diabetes ini menunjukkan bahwa setelah induksi dengan streptozotosin 60 mg/kgBB menyebabkan terjadinya hiperglikemia. Hal ini disebabkan oleh destruksi sel β pankreas sehingga produksi insulin menurun. Segera setelah hiperglikemia menjadi nyata, fungsi sel- β makin memburuk, sekresi insulin yang dipicu glukosa menjadi lebih parah kerusakannya dan degranulasi sel β menjadi jelas dan disertai penurunan jumlah massa sel β . Penelitian secara *in vitro* atau *in vivo* menjelaskan bahwa hiperglikemia menyebabkan toksik glukosa terhadap sel β . Hiperglikemia kronis akan merusak fungsi sel β pada tingkat sintesis insulin hingga sekresi insulin (Kaneto *et al.*, 1999). Donath *et al* (1999) melaporkan bahwa hiperglikemia memicu terjadinya apoptosis sel β pada *P. Obesus*. Pirk *et al* (1998) juga melaporkan bahwa apoptosis berperan penting dalam kegagalan kompensasi massa sel β pada tikus diabet Zucker (Kaneto *et al.*, 1999).

Proses terjadinya apoptosis pada sel β juga oleh karena toksis glukosa. Salah satu mekanisme utama yang potensial pada toksisitas glukosa adalah kelebihan pembentukan ROS yang terjadi melalui jalur mitokondria dan non-mitokondria. Islet sangat rentan terhadap ROS karena kadar enzim antioksidan endogen yang rendah. Kadar ROS dan glukosa yang berlebihan secara kronis menyebabkan penurunan ekspresi gen insulin melalui hilangnya faktor transkripsi PDX-1. Salah satu rantai patofisiologi ini

memberikan gambaran perlunya terapi antioksidan sebagai tambahan dalam mengelola diabetes(Federici *et al.*, 2001).

Beberapa pengaturan fisiologis fungsi sel β pada kondisi tertentu menginisiasi apoptosis sel β . Pada lingkungan fisiologis glukosa meningkatkan konsentrasi Ca^{2+} sitoplasma dan menstimulasi sekresi insulin. Namun dalam kondisi peningkatan konsentrasi glukosa yang kronis akan merusak fungsi sel β dan menginduksi apoptosis sel β . Pada kultur islet pankreas manusia stimulasi berlebihan dengan glukosa kadar tinggi akan menaikkan kadar Ca^{2+} bebas sitoplasma, dan konsentrasi Ca^{2+} masih bisa tetap bertahan walaupun kadar glukosa telah normal(Maedler *et al.*, 2005). Perubahan kadar Ca^{2+} sitosol berperan penting dalam mengatur beberapa jalur signal PKC dan kalmodulin. Jalur ini juga memicu proses apoptosis. Kadar Ca^{2+} sitosol juga ditingkatkan oleh ROS pada beberapa jenis sel melalui mobilisasi cadangan Ca^{2+} intra seluler dan atau masuknya Ca^{2+} dari ekstra seluler(Dröge, *et al.*, 2002).

Pemeriksaan sel β pankreas menunjukkan bahwa pada kelompok tikus diabetes antara grup kontrol diabetes, grup diabetes yang diberi glibenklamid dan grup yang diberi minyak buah merah dan glibenklamid terdapat gambaran histologis yang berbeda. Grup tikus kontrol diabetes dan tikus diabetes yang diberikan glibenklamid jumlah pulau Langerhans sangat menurun bila dibandingkan dengan kelompok tikus normal (K1). Kelompok tikus diabetes yang diberikan glibenklamid dan minyak buah merah tampak gambaran jumlah pulau Langerhans yang banyak dan lebar tidak jauh berbeda dengan kelompok tikus normal (K1). Hal ini membuktikan bahwa minyak buah merah mempengaruhi daya tahan hidup sel β dan kandungan insulin dalam sitoplasma sel.

Penelitian ini menggunakan model tikus diabetes tipe 1 dengan menggunakan streptozotisin untuk menginduksi terjadinya diabetes. Diabetes tipe 1 terjadi karena adanya infiltrasi seluler dan respons inflamasi pada pulau Langerhans. Komponen seluler yang menginfiltrasi pulau Langerhans adalah makrofag, monosit, dan sel limfosit T (CD4+ dan CD8+)(Nielsen *et al.*, 1999), sehingga pada gambaran histologis tampak sebagai insulitis. Sel CD8+ mensekresi granzim / perforin sehingga dapat menyebabkan destruksi sel β . Sel CD4+ dan CD8+ yang teraktivasi akan mengekspresikan FasL dan akan berikatan dengan reseptor Fas sehingga memicu apoptosis. Pelepasan sitokin interleukin (IL)-1 β oleh makrofag dan sel T berdampak sebagai molekul efektor dalam destruksi sel β . IL-1 β sendiri atau kombinasi dengan tumor nekrosis factor (TNF)- α dan interferon (IFN)- γ bersifat toksik terhadap sel β , khususnya melalui induksi radikal bebas seperti NO yang dikatalisis iNOS. Nitrik Oksida merusak sel β melalui beberapa mekanisme, 1) NO menonaktifkan enzim akonitase dalam siklus Krebs melalui nitrosilasi gugus Fe-S dan bereaksi dengan superoksida membentuk peroksinitrit yang akan menghalangi oksidasi glukosa dalam mitokondria dan menghalangi pembentukan ATP, 2) NO merusak DNA, 3) NO menginduksi p53 yang memicu apoptosis, dan 4) NO sebagai mediator proses apoptosis pada jalur sitokin (Nielsen *et al.*, 1999; Emamaulee dan Shapiro, 2006).

Insulitis secara bertahap akan menurun setelah onset klinis diabetes. Limfosit menjadi jarang ditemukan pada islet yang mengalami atrofi setelah lebih dari satu minggu onset diabetes, dan insulin yang berada di dalam sel β tidak bisa terdeteksi dengan pemeriksaan imunohistologi pada hewan coba (Natori dan Kawano, 1993)

Ada fakta yang nyata bahwa hiperglikemia yang terjadi setelah induksi streptozotosin menghasilkan pembentukan ROS. ROS menyebabkan peningkatan stres oksidatif berbagai jaringan. Tidak adanya kompensasi dari antioksidan endogen yang cukup, menyebabkan ketidakseimbangan sistem redoks, sehingga terjadi aktivasi sinyal intraseluler yang sensitive terhadap stres. Salah satu konsekuensi besar adalah produksi gen (seperti NF- κ B) yang menyebabkan kerusakan seluler dan semuanya berujung pada komplikasi diabetes (Evans *et al.*, 2002).

Penyebab utama kematian sel sel β pada onset DM tipe 1 adalah apoptosis, suatu proses tingkat tinggi yang terprogram yang diaktivasi dan atau dimodifikasi oleh signal ekstra seluler, tingkat ATP intra seluler, kaskade fosforilasi, dan ekspresi gen-gen pro dan anti apoptosis. Sitokin memicu gen-gen yang sensitif terhadap stres baik yang bersifat protektif atau merusak daya tahan hidup sel β (Cnop *et al.*, 2005).

Pada saat terdiagnosis DM tipe 1 massa sel β sudah menurun 70-80%. Hal ini dikarenakan bervariasinya derajat insulinitis dan tidak terdeteksinya nekrosis sel β . Fakta ini menunjukkan bahwa proses hilangnya sel β terjadi secara perlahan dalam waktu sekian tahun. Kelainan patologi yang ditemukan adalah sejalan dengan penurunan progresif fase sekresi insulin pada individu yang positif antibodinya, jauh sebelum berkembang menjadi diabetes. Pada akhirnya menunjukkan bahwa apoptosis sel β disebabkan penipisan secara gradual sel β pada tikus model DM tipe 1 (Cnop *et al.*, 2005).

Pada hewan coba yang diinjeksi streptozotosin menunjukkan adanya destruksi sel β sebanyak 80% pada hari ke-4 setelah injeksi, bila dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberikan streptozotosin, hasil serupa juga dilaporkan oleh peneliti lainnya (Garofano *et al.*, 2000).

Penelitian ini didapatkan bahwa grup tikus yang diberikan glibenklamid dan minyak buah merah mengalami perbaikan gambaran pulau Langerhans. Perbaikan tersebut ditandai dengan jumlah pulau masih banyak, diameter pulau masih lebar mendekati kelompok normal (K1). Gambaran ini menunjukkan kecenderungan adanya proses pergantian sel β pankreas (*β -cell turnover*) lebih baik. Parameter pergantian sel β pankreas dapat diukur dengan menghitung massa sel β , jumlah sel β , replikasi sel β atau menghitung apoptosis dan neogenesis sel β (Bonner-Weir, 2001).

Peningkatan massa sel β terjadi melalui peningkatan replikasi sel β , peningkatan ukuran sel β , penurunan kematian sel β , dan diferensiasi sel progenitor sel β yang tersisa. Sel progenitor berada di ductus maupun pulau Langerhans (Bouwens & Rooman, 2004). Para peneliti mengungkapkan hipotesa bahwa replikasi sel β berasal dari massa sel β itu sendiri. Analisis ini berdasarkan bahwa cadangan sel β yang masih tersisa (*preexisting β -cells*) sebagai sumber utama sel β yang baru sesudah dewasa dan pada tikus coba yang dilakukan pankreatektomi (Couri *et al.*, 2006). Regenerasi sel β dimulai segera setelah pankreatektomi. Regenerasi meliputi proliferasi sel β yang tersisa dan neogenesis dari sel epitel ductus periferal (Hayashi *et al.*, 2003). Pada penelitian tikus neonatal yang diinduksi streptozotosin menunjukkan bahwa regenerasi sel β juga melalui proliferasi sel β yang tersisa (Gorafano *et al.*, 2000).

Bila terjadi destruksi subtotal sel β maka tidak otomatis terjadi regenerasi tetapi tikus akan menjadi diabetes lebih dahulu atau mati, terkecuali bila ada bagian pankreas yang tidak terpapar toksis dapat terjadi neogenesis. Bila hampir seluruh massa sel β mengalami destruksi, pemberian stimulasi dari luar perlu dilakukan. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa pemberian kombinasi gastrin dan Epithelial Growth Faktor (EGF)

pada tikus yang diinduksi alloksan terjadi pemulihan kontrol glikemik dan terjadi regenerasi sel β . Pertumbuhan regenerasi sel β >30% per hari. Meskipun tidak terjadi regenerasi secara sempurna, pemberian gastrin dan EGF memulihkan 30-40% massa sel β dalam 7 hari (Bouwens & Rومان, 2004). Beberapa molekul seperti GLP-1, β -cellulin, nikotinamid, gastrin, EGF-1, dan hormon tyroid berperan besar dalam inisiasi regenerasi sel β pada diabetes. Para ahli memberikan hipotesa bahwa molekul-molekul tersebut menstimulasi prekursor sel islet melalui neogenesis atau menginduksi replikasi sel β yang masih tersisa. (Banerjee *et al.*, 2005).

Mekanisme minyak buah merah terhadap regenerasi sel β pankreas belum jelas diketahui. Berdasarkan penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa suplementasi antioksidan bermanfaat dalam menurunkan hiperglikemia dan kehilangan massa sel β spontan pada tikus NOD dan tikus BB (Bio-Breeding). Berbagai macam antioksidan seperti nikotinamid, SOD, dan α -tocopherol telah menunjukkan efek proteksi terhadap berkembangnya IDDM pada hewan coba diabetes (Jonas *et al.*, 1999).

Keuntungan antioksidan alami adalah keamanan dan toleransi dosis oral yang lebar (Green *et al.*, 2004). Elliott *et al.* (1996) melaporkan bahwa pemberian nikotinamid mempunyai efek protektif pada populasi yang dilakukan obyek penelitiannya di Selandia baru, namun penelitian dengan prosedur yang sama tidak berefek yang dilakukan oleh *Nicotinamide Intervention Study* di Belanda (Lampeter *et al.*, 1998). Penggunaan antioksidan sintetis saat ini mulai dibatasi. Hasil penelitian Ford *et al.* (1980) dalam Miyake & Sibamoto (1997) dan ditulis oleh Indriati, dkk. (2002) menunjukkan bahwa antioksidan sintetis ternyata dapat meracuni binatang percobaan dan juga bersifat karsinogenik.