

EFEK PROTEKTIF BEKUL BALI (*Ziziphus jujuba* Mill.) TERHADAP SKOR KERUSAKAN PANKREAS DAN HISTOPATOLOGI PULAU LANGERHANS TIKUS TERINDUKSI DIET TINGGI LEMAK

I Nyoman Tri Pramarta¹, I Wayan Putu Sutirta Yasa², Desak Gde Diah Dharma Santhi², Anak Agung Wiradewi Lestari²

¹Program Studi Sarjana Kedokteran dan Profesi Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana, Denpasar, Bali

²Departemen Patologi Klinis, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana, Denpasar, Bali

Email: inyomantripramarta@gmail.com

ABSTRAK

Diet tinggi lemak merupakan faktor risiko sindrom metabolik yang dapat menimbulkan penyakit diabetes melitus tipe 2. Prevalensi diabetes terus meningkat dan merupakan penyebab utama dari 1,6 juta kematian global serta komplikasi diantaranya gagal ginjal, kebutaan, gagal jantung, hingga amputasi tungkai bawah. Tujuan penelitian ini menguji efek protektif buah bekul bali atau=*Ziziphus jujuba* Mill. (Zj) terhadap skor kerusakan pankreas dan histopatologi pulau Langerhans tikus yang diberikan diet tinggi lemak. Desain penelitian yang digunakan yaitu *post-test* dengan grup kontrol. Populasi dalam penelitian (n=25) tikus:Wistar jantan²(*Rattus norvegicus*), berumur 3-4 bulan dengan berat 180-200 g. Tikus secara acak dibagi kedalam lima kelompok yaitu: normal dengan diet standar (K-) dan diet tinggi lemak yang diberikan selama 56 hari dan perlakuan selama 14 hari berupa: plasebo (K+); ekstrak dosis 200 mg/kg Zj(rendah); ekstrak dosis 400 mg/kg Zj(sedang); ekstrak dosis 800 mg/kg Zj(tinggi). Data hasil pengamatan skor kerusakan pankreas kemudian dianalisis menggunakan SPSS versi 23. Hasil penelitian menunjukkan kelompok K+ memiliki skor kerusakan pankreas yang tinggi dan bermakna dibandingkan kelompok K- ($p < 0,01$). Pada kelompok perlakuan, pemberian ekstrak dosis tinggi berhasil menunjukkan skor kerusakan pankreas paling rendah dan bermakna dibandingkan K+ ($p < 0,01$). Sedangkan ekstrak dosis sedang dan rendah, meskipun menunjukkan skor yang lebih rendah dibandingkan K+, namun secara statistik tidak berbeda bermakna. Hal ini menunjukkan adanya efek terapi yang *dose-dependent*. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan ekstrak etanol bekul bali (*Ziziphus jujuba* Mill.) memiliki potensi untuk dapat dikembangkan sebagai obat terkait efek protektifnya.

Kata Kunci: bekul bali (*Ziziphus jujuba* mill.), skor kerusakan pankreas, histopatologi pulau langerhans, diet tinggi lemak

ABSTRACT

A high-fat diet is a risk factor for metabolic syndrome which can cause type 2 diabetes mellitus. The prevalence of diabetes continues to increase and is a major cause of 1.6 million global deaths and complications of kidney failure, blindness, heart failure, and amputation of the lower limbs. The purpose of this study is to investigate the protective effect of bekul bali or *Ziziphus jujuba* Mill. (Zj) on the score of pancreatic damage and histopathology of Langerhans islet in rat induced with high fat diet. This study used post-test design with control group. The population in the study (n = 25) rat strain Wistar, (*Rattus norvegicus*), male, age 3-4 months with a weight of 180-200 g. Rats were divided into five groups: normal with standard diet (K-) and high fat diets given for 56 days continued with 14 days treatment consisting of: placebo (K+); extract 200 mg/kg Zj(low); extract (400 mg/kg Zj(medium); extract 800 mg/kg Zj(high). Data from observations of pancreatic damage scores were then analyzed using SPSS version 23. The results showed that K+ group had a high and significant pancreatic damage scores ($p < 0.01$) compared to the K- group. In treatment group, high dose extracts successfully showed the lower pancreatic damage score ($p < 0.01$) compared to K+. While the low and moderate dose extract showed a lower score than K+, but it was not statistically significant. This result showed a dose-dependent effect. Based on these results it can be concluded that the ethanol extract of bekul bali (*Ziziphus jujuba* Mill.) can be developed as a drug related to its protective effect.

Keywords: bekul bali (*Ziziphus jujuba* mill.), score of pancreatic damage, histopathology of Langerhans islet, high fat diet

PENDAHULUAN

Dewasa ini, konsumsi produk yang tinggi kalori atau diet tinggi lemak menunjukkan adanya peningkatan, baik di negara maju ataupun negara berkembang. Diet tinggi kalori yang tidak sehat ini merupakan salah satu faktor risiko terjadinya sindrom metabolik. Sindrom ini memiliki karakteristik berupa obesitas abdominal/sentral, resistensi insulin dan hiperlipidemia yang dapat menimbulkan berbagai penyakit seperti diabetes melitus.¹ Prevalensi diabetes terus meningkat diantara pasien dewasa yang berusia diatas 18 tahun menjadi 8,5% di tahun 2014. Selain itu, diabetes merupakan penyebab utama dari 1,6 juta kematian global dan komplikasi diantaranya gagal ginjal, buta, gagal jantung, hingga amputasi tungkai bawah.²

Patogenesis diabetes melitus diawali oleh terganggunya proses metabolisme glukosa sehingga menurunkan sekresi insulin. Kelenjar endokrin dari pankreas berada pada pulau Langerhans tersusun atas kumpulan sel α yang berperan dalam menghasilkan hormon glukagon dan sel β yang menghasilkan hormon insulin. Terjadinya defisiensi insulin yang dihasilkan oleh sel β pankreas juga dapat disebabkan oleh berbagai faktor diantaranya kerusakan pada sel β pankreas akibat pengaruh eksternal serta penurunan reseptor glukosa pada pankreas ataupun insulin pada jaringan perifer sebagai target. Selain itu, resistensi insulin dapat disebabkan oleh timbulnya reaksi inflamasi seperti peningkatan sitokin proinflamasi TNF- α dan akumulasi jaringan lemak pada obesitas sentral yang memicu pelepasan sitokin IL-6 dan terjadinya resistensi leptin.^{3,4}

Pengobatan lini pertama yang digunakan untuk mengatasi diabetes melitus tipe 2 saat ini yaitu metformin memiliki beberapa kelemahan yaitu komplikasi pengobatan. Penggunaan metformin terbukti menimbulkan efek samping berupa akut pankreatitis.⁵ Selain itu, penggunaan metformin menginduksi terjadinya asidosis laktat yang ditandai oleh kelelahan, pusing, kesulitan dalam bernapas, dan muntah.⁶ Berdasarkan kelemahan tersebut dibutuhkan sebuah pengobatan alternatif dengan risiko yang minim untuk terbentuknya efek samping namun tetap memiliki efek terapeutik terhadap fungsi sekresi insulin dan protektif terhadap morfologi sel pankreas.

Penggunaan bahan alami sebagai pengobatan atau yang lebih dikenal dengan *complementary and alternative medicine* (CAM) saat ini sedang berkembang dengan pesat.⁷ Salah satu tanaman yang memiliki manfaat kesehatan yaitu buah bekul bali (*Ziziphus jujuba* Mill.) memiliki kandungan utama berupa flavonoid seperti *quercetin* yang berpotensi sebagai efek protektif terhadap pulau Langerhans pankreas dan memperbaiki fungsi sekresi insulin.⁸ Berdasarkan berbagai permasalahan tersebut untuk mengatasi keterbatasan pengobatan lini utama diabetes melitus tipe 2. Maka perlu dilakukan pengujian efek protektif dari buah bekul bali atau *Ziziphus jujuba* Mill. (Zj) terhadap skor kerusakan pankreas dan histopatologi pulau Langerhans tikus yang diberi diet tinggi lemak.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan desain *post-test* dengan grup kontrol. Populasi dalam penelitian merupakan 25 ekor tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 3-4 bulan dengan berat 180-200 g. Tikus didapatkan dari Lab. Farmakologi dan Terapi-Divisi Pengembangan Obat dan Hewan Coba, Unit Laboratorium Biomedik Terpadu, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. Tikus secara acak dibagi kedalam lima kelompok yaitu: normal (K-), diet tinggi lemak dan plasebo (K+), diet tinggi lemak dan ekstrak dosis rendah (200 mg/kg Zj), diet tinggi lemak dan ekstrak dosis sedang (400 mg/kg Zj) serta diet tinggi lemak dan ekstrak dosis tinggi (800 mg/kg Zj). Pemberian diet tinggi lemak tersusun atas pakan standar yang dicampur dengan lemak babi dan pemberian kuning telur bebek melalui sonde oral selama 56 hari. Buah bekul bali atau *Ziziphus jujuba* Mill. (Zj) di maserasi menggunakan etanol 96% untuk dijadikan ekstrak. Selanjutnya ekstrak diberikan selama 14 hari p.o. Sehari setelah perlakuan, seluruh kelompok diterminasi dengan dislokasi servikal yang sebelumnya telah diberikan anestesi dan sedasi berupa kombinasi *ketamine-xylazine*.

Organ pankreas diambil untuk selanjutnya dilakukan proses pembuatan preparat histopatologi. Pewarnaan yang digunakan yaitu *hematoxylin-eosin* (H&E). Preparat kemudian diamati menggunakan aplikasi *OptiLab* melalui mikroskop dengan perbesaran 400 \times sebanyak 5 lapang pandang untuk setiap preparat. Pengamatan histopatologi pulau Langerhans dilakukan secara kualitatif dan tingkat kerusakan pankreas ditentukan berdasarkan skor dengan kriteria: skor 0 (tidak ada nekrosis pada sel pankreas), skor 1 (total 25% nekrosis pada sel pankreas), skor 2 (total 50% nekrosis pada sel pankreas), skor 3 (total 75% nekrosis pada sel pankreas), dan skor 4 (total nekrosis pada seluruh sel pankreas).

Data hasil pengamatan skor kerusakan pankreas kemudian dikumpulkan untuk dianalisis menggunakan uji statistik menggunakan *SPSS version 23*. Pada penelitian ini menggunakan uji statistik non-parametrik *Kruskall Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney-U* untuk mengetahui perbedaan skor kerusakan pankreas antarkelompok dan secara statistik signifikan jika nilai $p < 0,05$. Penelitian ini telah mendapat izin kelayakan etik dari Komisi Etik Penelitian (KEP) Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana dengan nomor surat: 1613/UN14.2.2/PD/KEP/2018.

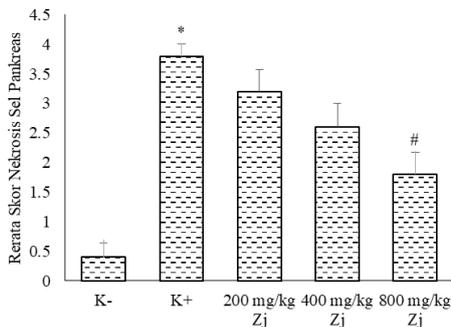
HASIL

Pengamatan 5 lapang pandang preparat pankreas pada lima kelompok menunjukkan kelompok K+ memiliki skor kerusakan pankreas yang tinggi dan secara statistik signifikan ($p < 0,01$) jika dibandingkan dengan kelompok K-. Pada kelompok perlakuan, pemberian ekstrak bekul bali dosis tinggi berhasil menunjukkan skor paling rendah secara rerata dan mendekati kelompok normal yang dapat dilihat lebih lanjut pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Data deskriptif skor kerusakan pankreas.

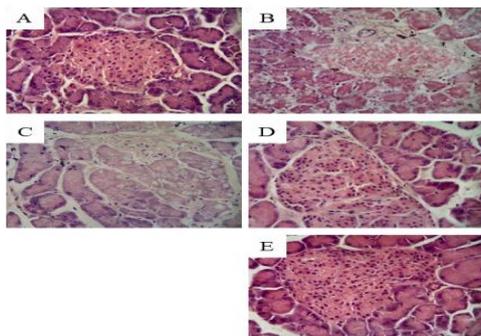
Kelompok	Rerata ± SB	Med(min- maks)	Nilai p
K-	0,4 ± 0,55	0(0 - 1)	0,001
K+	3,8 ± 0,45	4(3 - 4)	
200 mg/kg Zj	3,2 ± 0,84	3(2 - 4)	
400 mg/kg Zj	2,6 ± 0,89	2(2 - 4)	
800 mg/kg Zj	1,8 ± 0,84	2(1 - 3)	

Kelompok perlakuan lainnya yaitu dosis rendah dan sedang meskipun menunjukkan skor kerusakan pankreas yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok K+, namun secara statistik tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna dapat dilihat lebih lanjut pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Rerata skor kerusakan pankreas. Keterangan: statistik signifikan vs. K-($p < 0,01$), statistik signifikan vs. K+ ($p < 0,01$).

Pengamatan histopatologi pada preparat pankreas terlihat sel pada pulau langerhans dan sekitarnya yang mulai terdegradasi pada kelompok K+ dibandingkan dengan kelompok K-. Pada kelompok perlakuan, dosis rendah terlihat pucat dan serupa dengan kelompok K+. Dengan peningkatan dosis menjadi sedang dan tinggi menunjukkan perbaikan struktur pulau langerhans dan menyerupai penampang pada preparat kelompok K-. Untuk melihat preparat histopatologi pulau Langerhans pankreas dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Histopatologi Pulau Langerhans pada Pankreas dengan pewarnaan H&E dan perbesaran mikroskop 400×.

Keterangan: A (kelompok K-), B (kelompok K+), C (kelompok 200 mg/kg Zj), D (kelompok 400 mg/kg Zj), E (kelompok 800 mg/kg Zj).

DISKUSI

Diabetes melitus (DM) merupakan salah satu penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia sebagai akibat dari gangguan sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya. Model DM pada tikus dapat dilakukan dengan metode diet tinggi lemak.⁹ Perlakuan berupa induksi tinggi lemak yang berkaitan dengan DM juga ditandai oleh nekrosis pada sel pankreas. Pada analisis *Kruskal Walliss* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna $p < 0,001$ antara seluruh kelompok. Pengujian selanjutnya menggunakan *Mann Whitney-U* menunjukkan perbedaan skor derajat kerusakan pankreas yang bermakna antara kelompok K+ dan K- ($p < 0,01$).

Diet tinggi lemak menginduksi terjadinya DM melalui reaksi inflamasi dan stres oksidatif melalui pelepasan NF-KB, NO dan *reactive oxygen species* (ROS) yang terbentuk dalam aliran darah dan jaringan intraseluler.^{10,11} Terbentuknya ROS dalam jumlah besar mengakibatkan kerusakan pada sel pankreas secara menyeluruh yang ditandai dengan derajat skor nekrosis pada pengamatan histopatologi. Kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak Zj, pada seluruh dosis perlakuan menunjukkan adanya penurunan skor derajat kerusakan sel pankreas, namun penurunan yang signifikan dan mendekati dengan keadaan normal pada K- yaitu kelompok dengan perlakuan yang diberikan dosis 800 mg/kg. penurunan derajat skor menunjukkan respon *dose-dependent* dimana dosis 800 mg/kg pada penelitian ini merupakan dosis minimum untuk menimbulkan efek protektif terhadap kerusakan sel pankreas pada tikus DM terinduksi diet tinggi lemak.

Efek protektif yang ditimbulkan oleh ekstrak Zj disebabkan oleh berbagai kandungan fitokimia yang terkandung di dalamnya. Senyawa fitokimia yang berperan penting yaitu flavonoid seperti *quercetin*. Senyawa ini ditemukan dalam jumlah besar pada buah Zj dan memiliki efek anti-inflamasi yang kuat.¹² Penelitian fitokimia terhadap buah Zj menunjukkan kadar flavonoid total yaitu 62,0-284,9 mg *rutin equiv*/100 g FW.⁸ Efek antioksidan yang ditimbulkan kemudian menghambat akumulasi ROS serta peroksidasi lipid pada sel β pankreas sehingga memberikan efek protektif terhadap autofagositosis, apoptosis ataupun nekrosis dengan mengaktifasi jalur pensinyalan PI3K/Akt.¹³ Penelitian lainnya, menunjukkan senyawa *quercetin* yang merupakan bagian dari flavonoid telah terbukti berperan dalam menghambat ekspresi iNOS sehingga menurunkan kadar NO dan menghambat translokasi NF-KB.¹⁴ Selain itu, flavonoid mampu meningkatkan sekresi insulin dengan mengamplifikasi jalur kaskade PLC/PKC dan cAMP/PKA sehingga mengembalikan fungsi pankreas.¹⁵

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol buah bekul bali (*Ziziphus jujuba* Mill.) memiliki potensi yang baik terkait efek protektif terhadap sel pankreas. Sehingga, kedepannya dapat digunakan sebagai pengembangan obat untuk mencegah kerusakan atau nekrosis pada sel pankreas dan pulau Langerhans.

SARAN

Penting dilaksanakan penelitian lebih lanjut mengenai dosis letal dari ekstrak dan pemberian jangka panjang untuk mengetahui efek terapeutik jangka panjang. Selain itu juga dibutuhkan metode penelitian dengan kelompok kontrol untuk setiap kelompok untuk mengevaluasi lebih lanjut efek protektif yang ditimbulkan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lutsey PL, Steffen LM, Stevens J. Dietary intake and the development of the metabolic syndrome. *Circulation*. 2008 Feb 12;117(6):754-61.
2. WHO. Diabetes. World Health Organization; 30 Oktober 2018. Dapat diakses pada: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
3. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *The Lancet*. 2014 Mar 22;383(9922):1068-83.
4. Akash MS, Rehman K, Chen S. Role of inflammatory mechanism in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Journal of cellular biochemistry*. 2013 Mar;114(3):525-31.
5. Alsubaie S, Almalki MH. Metformin induced acute pancreatitis. *Dermato-endocrinology*. 2013 Apr 1;5(2):317-8.
6. DeFronzo R, Fleming GA, Chen K, Bicsak TA. Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk. *Metabolism*. 2016 Feb 1;65(2):20-9.
7. Grossman LD, Roscoe R, Shack AR. Complementary and alternative medicine for diabetes. *Canadian journal of diabetes*. 2018 Apr 1;42:S154-61.
8. Gao QH, Wu CS, Wang M. The jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit: a review of current knowledge of fruit composition and health benefits. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013 Mar 28;61(14):3351-63.
9. Winzell MS, Ahrén B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004 Dec 1;53(suppl 3):S215-9.
10. Volpe CM, Villar-Delfino PH, dos Anjos PM, Nogueira-Machado JA. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell death & disease*. 2018 Jan 25;9(2):119.
11. Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M, Matsuoka TA. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators of inflammation*. 2010;2010.
12. Rodriguez Villanueva J, Rodriguez Villanueva L. Experimental and clinical pharmacology of *Ziziphus jujuba* Mills. *Phytotherapy research*. 2017 Mar;31(3):347-65.
13. Lin CY, Ni CC, Yin MC, Lii CK. Flavonoids protect pancreatic beta-cells from cytokines mediated apoptosis through the activation of PI3-kinase pathway. *Cytokine*. 2012 Jul 1;59(1):65-71.
14. Dai X, Ding Y, Zhang Z, Cai X, Li Y. Quercetin and quercitrin protect against cytokine-induced injuries in RINm5F β -cells via the mitochondrial pathway and NF- κ B signaling. *International journal of molecular medicine*. 2013 Jan 1;31(1):265-71.
15. Kappel VD, Frederico MJ, Postal BG, Mendes CP, Cazarolli LH, Silva FR. The role of calcium in intracellular pathways of rutin in rat pancreatic islets: potential insulin secretagogue effect. *European journal of pharmacology*. 2013 Feb 28;702(1-3):264-8.