

Potensi Propolis Sebagai Antidiabetes Berdasarkan Analisis Sayatan Histologi Pankreas

Ayu Nirmala Sari

Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi
UN Ar Raniry Banda Aceh, Indonesia
Email : ayunirmala02@yahoo.com

Ramadhani Eka Putra

Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati
Institut Teknologi Bandung, Indonesia

Ahmad Ridwan

Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati
Institut Teknologi Bandung, Indonesia

Abstract: Diabetes mellitus is a chronic disease characterized by hyperglycemia for long time. Hyperglycemia is proven increase oxidative stress due to the production of reactive oxygen species that exceeds the ability of the natural antioxidant defenses, causing deficiency and insulin resistance. In this study, the effect of propolis as an antidiabetic was observed based on qualitative analysis of incision histology. 55 male mice (*Mus musculus* SW.) were divided into 5 groups: KN (normal control), P1, P2, P3 and KDM (diabetes control) induced diabetes with alloxan dose 200 mg/kg bw intraperitoneally. Propolis solution 50, 100 and 175 mg/kg bw given to P1, P2 and P3, while distilled water was given to KN and KDM by oral gavage for 21 days. Pancreatic incision histology is done every 7 days. Results of the qualitative analysis of histological cuts showed that the diameter of the islets of Langerhans in P1, P2 and P3 is smaller than KN (diameter 100-200 μ m). The heaviest pancreatic damage demonstrated by DM with no propolis treatment. Repairing of damage in the islets of Langerhans in mice treated with propolis showed that propolis potentially as an antidiabetic ;
Keywords: diabetes, propolis, histology, pancreas, antioxisdan, alloxan

1. Pendahuluan

Diabetes mellitus (DM) adalah penyakit kronis yang ditandai dengan meningkatnya kadar glukosa darah (KGD) di atas batas normal (hiperglikemia) dalam jangka waktu yang panjang (>126 mg/dL dalam kondisi puasa dari makanan, dan >200 mg/dL dalam kondisi setelah makan) [1,2]. Hiperglikemia dapat meningkatkan stres oksidatif akibat radikal bebas, reactive oxygen species (ROS) [3, 4, 5, 6]. Kondisi hiperglikemia yang disertai dengan stress oksidatif dapat menyebabkan seseorang menderita

penyakit diabetes mellitus [7, 8, 9]. Hal ini terjadi karena stress oksidatif mengganggu transduksi sinyal insulin dan sekresi insulin dari sel-sel β pankreas yang menyebabkan terjadinya defisiensi insulin [10] serta menyebabkan terjadi penurunan sensitifitas reseptor insulin (resistensi insulin) pada sel yang memiliki reseptor insulin [11, 12, 13]. Stress oksidatif menyebabkan kerusakan oksidatif, perubahan struktural dan fungsional pada sel sehingga menyebabkan berbagai komplikasi pada DM (14, 15, 16), seperti gangguan viskositas dan velositas darah yang dapat menyebabkan kerusakan jantung, otak, kaki, ginjal, mata dan saraf [17, 18, 19, 20]. Diabetes mellitus menjadi masalah kesehatan utama dengan prevalensi yang terus meningkat di seluruh dunia dalam beberapa dekade terakhir [21]. Estimasi prevalensi diabetes mellitus pada dewasa (usia 30-79 tahun) sebanyak 6,4% (285 juta orang) pada tahun 2010 dan akan meningkat menjadi 7,7% atau 439 juta orang pada 2030 [22]. Pada tahun 2020, jumlah penderita DM tipe 2 diperkirakan akan mencapai 250 juta orang di seluruh dunia [23]. Indonesia sendiri menempati urutan ke-9 dalam estimasi epidemiologi DM pada tahun 2010 dengan 7 juta kasus dan akan terus naik menjadi peringkat ke-5 pada tahun 2030 dengan 20 juta kasus [22]. Mengingat adanya kemungkinan peningkatan jumlah penderita dan banyaknya penyakit serta komplikasi yang mampu ditimbulkan, maka penyakit DM harus segera ditangani. Pada penelitian ini digunakan propolis yang di ekstraksi dari raw propolis dari sarang lebah *Trigona* sp untuk dilihat potensi propolis tersebut sebagai antidiabetes berdasarkan analisis sayatan histology pankreas mencit yang dikondisikan menderita diabetes mellitus.

2. Bahan dan Metode

a. Bahan

Hewan uji yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus* SW.) jantan (umur 8 minggu, berat badan 30-45 gram). Mencit dipelihara di dalam kandang beralaskan sekam dengan periode penyinaran selama 12 jam gelap dan 12 jam terang dalam ruangan dengan suhu 24-28°C dan kelembaban 60-75%. Penggantian sekam dilakukan 2 kali seminggu. Pakan dan air minum diberikan

setiap hari secara ad libitum untuk mempertahankan berat rata-rata mencit. Pakan yang diberikan berupa pelet CP 551 dalam bentuk pelet yang diproduksi oleh PT Charoen Pohkpond.

Propolis yang digunakan diekstraksi dari raw propolis yang terdapat pada sarang lebah *Trigona* sp. yang diperoleh dari hutan Sulawesi.

b. Metode

Sebelum perlakuan, 5 kelompok mencit diaklimasi selama seminggu pada kandang beralaskan sekam dengan periode penyinaran selama 12 jam gelap dan 12 jam terang, suhu 24-28°C dan kelembaban 60-75%. Penggantian sekam dilakukan 2 kali seminggu sementara pakan dan air minum diberikan setiap hari secara ad libitum. Pakan yang diberikan berupa pakan anak babi (CP 551) dalam bentuk pelet yang diproduksi oleh PT Charoen Pohkpond.

Uji Pendahuluan Penentuan Dosis Optimum Alloxan Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui dosis optimum alloxan untuk menginduksi diabetes mellitus pada mencit secara intraperitoneal yang mampu bertahan diatas 200 mg/dL selama perlakuan. Dosis alloxan 150 mg/kg bb, 200 mg/kg bb dan 250 mg/kg diujikan kepada 3 kelompok.

Induksi Mencit Menjadi Diabetes Mellitus Induksi dimulai dengan mengukur berat badan dan mengambil darah dari vena lateralis pada ekor untuk pengukuran kadar gula darah (KGD) awal. Dua jam berikutnya mencit disuntik larutan alloxan monohidrat dengan dosis 200 mg/kg berat badan secara intraperitoneal (ip). Mencit selanjutnya dikembalikan ke kandang. Pengukuran KGD selanjutnya dilakukan 7 hari setelah injeksi alloxan.

Ekstraksi Propolis Trigona Lokal Ekstraksi menggunakan metode maserasi yang dilakukan di Pusat Terapi dan Rumah Lebah Rahmi, Margaluyu. Ekstraksi diawali dengan membersihkan raw propolis dari pengotor alami seperti lumpur/potongan kayu dengan pinset. Kemudian propolis dipotong dengan pisau menjadi bagian-bagian kecil untuk mempermudah melarutkannya. Selanjutnya dilakukan maserasi 400 gram raw propolis menggunakan 500

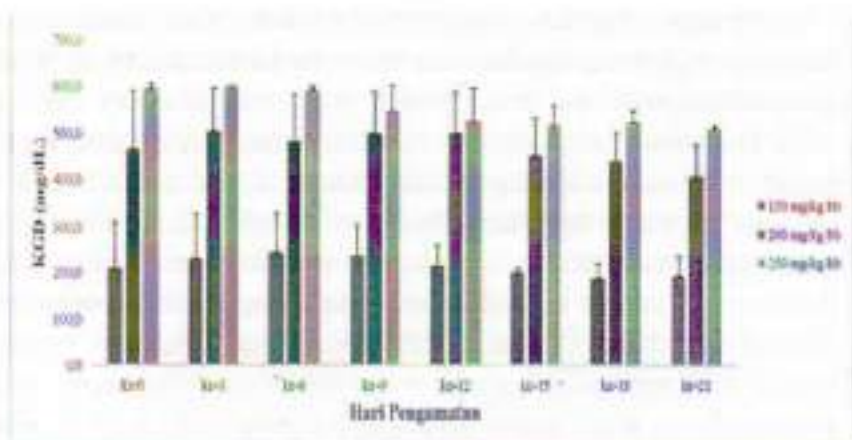
mL propilen glycol pada wadah tertutup dan diaduk 2 kali sehari selama 2 minggu. Ekstrak dipisah dari residu dengan sentrifugasi pada 1500g selama 5 menit. Filtrat yang tersaring dimasukkan ke dalam freeze drying agar pelarutnya hilang sehingga menjadi propolis dalam bentuk pasta.

Penentuan Dosis dan Perlakuan Propolis Dosis propolis diperoleh dari hasil konversi dosis harian propolis yang digunakan oleh manusia ke dosis yang akan dipakai oleh mencit berdasarkan tabel perbandingan rasio permukaan tubuh beberapa spesies hewan yang digunakan pada laboratorium umum dari Laurance & Bacharach. Berdasarkan perhitungan konversi tersebut diperoleh dosis, yaitu 50 mg/kg bb (P1), 100 mg/kg bb (P2) dan 175 mg/kg bb (P3) yang diberikan selama 21 hari perlakuan dengan cara oral gavage. Sedangkan untuk kelompok kontrol DM (KDM) dan kontrol normal (KN) diberikan akuades.

Preparasi Sayatan Histologi Pankreas Pada hari ke-0, ke-7, ke-14 dan ke-21 perlakuan, mencit didislokasi dan dibedah pada bagian abdomen untuk isolasi pankreas. Pankreas dibersihkan dengan larutan (phosphat buffered saline) PBS lalu direndam dalam larutan fiksatif Bouin selama 24 jam sebelum dilakukan embedding di dalam paraffin. Pankreas beku di dalam paraffin disayat menggunakan mikrotom dengan ketebalan 6 μ m untuk membuat pita sayatan yang akan ditempel pada kaca preparat. Kaca preparat yang telah ditemplei sayatan selanjutnya diinkubasi pada oven 37°C selama 24 jam sebelum dilakukan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE).

3. Hasil dan Pembahasan

Dosis Optimum Alloxan Ketiga dosis yang diberikan berhasil menaikkan KGD mencit lebih dari 200 mg/dL pada hari ke 7 setelah dilakukan injeksi alloxan. Terjadinya kenaikan KGD pada mencit hingga melebihi 200 mg/dL menunjukkan bahwa alloxan monohydrate yang diinjeksikan terbukti sebagai diabetogen yang efektif.



Gambar 1. Rerata KGD Selama 21 Hari Pengamatan

Pengkondisian Diabetes Mellitus Pada Hewan Uji. Pada hari pertama (hari diinduksi DM), KGD mencit berada pada kisaran $123,4 \pm 9,47$ - $141,8 \pm 15,86$ mg/dL (Tabel 1). Angka tersebut menunjukkan bahwa KGD mencit termasuk ke dalam kategori normal [24]. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa KGD mencit pada kondisi sebelum DM tidak berbeda secara nyata. Pengukuran KGD pada hari dinyatakan DM (hari ke-0), menunjukkan peningkatan KGD pada mencit yang diinjeksi alloxan, yaitu pada kisaran $423,6 \pm 111,58$ - $487,2 \pm 103,76$ mg/dL. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa KGD mencit yang diinjeksi alloxan berbeda secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol normal (KN).

Tabel 1. Rerata KGD 55 Ekor Mencit (*Mus musculus* SW.) pada Kondisi Sebelum DM dan Setelah Induksi (Kondisi DM)

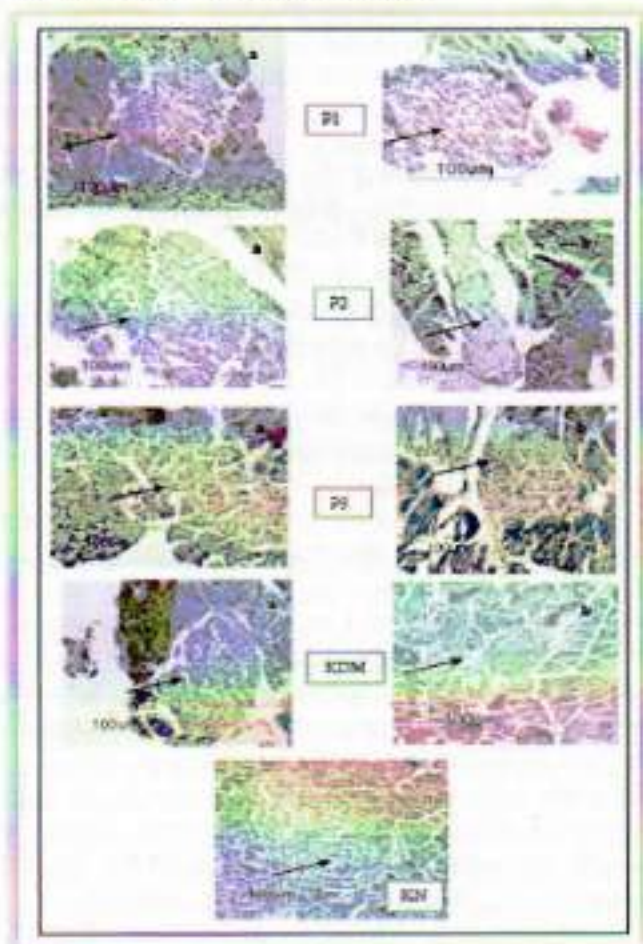
Kelompok	Hari Induksi (Sebelum DM)	Hari ke-0 (Kondisi DM)
P1	$123,4 \pm 9,47$ Ⓜ	$474,8 \pm 54,89$ Ⓜ
P2	$128,6 \pm 19,66$ Ⓜ	$487,2 \pm 103,76$ Ⓜ
P3	$141,8 \pm 15,86$ Ⓜ	$459,4 \pm 128,65$ Ⓜ
KN	$134,4 \pm 22,19$ Ⓜ	$133,6 \pm 16,47$ Ⓜ
KDM	$129,2 \pm 21,46$ Ⓜ	$423,6 \pm 111,58$ Ⓜ

Keterangan: angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan secara signifikan $P < 0,05$.

Analisis Sayatan Histologi Pankreas Hasil pengamatan histologi pankreas pada Gambar IV.6a menunjukkan lokasi pulau Langerhans pada pankreas mencit yang dikondisikan DM di awal. Pada gambar KN (kontrol normal) terlihat pulau Langerhans masih utuh, karena tidak diinjeksi alloxan. Kelompok KDM, P1, P2 dan P3 yang diinjeksi alloxan telah mengalami kerusakan pada pulau Langerhans. Perubahan bentuk pulau Langerhans dapat terjadi karena kerusakan sel yang diduga akibat pemberian alloxan dan glukotoksisitas dalam waktu lama. Toksisitas alloxan terjadi pada pankreas disebabkan oleh oksidasi pada gugus -SH, penghambatan kerja enzim glukokinase, pembentukan ROS, dan gangguan pada homeostasis kalsium intraselular [21]. Perubahan histologi pulau Langerhans pada penderita diabetes dapat terjadi baik secara kuantitatif, seperti pengurangan jumlah atau ukuran, maupun secara kualitatif, seperti terjadi nekrosis [18,19].

Kerusakan yang lebih nyata terlihat pada KDM di akhir perlakuan (Gambar IV.6b), dengan diameter pulau Langerhans kurang dari 100 μ m. Ukuran pulau Langerhans pada kelompok KDM yang cenderung lebih kecil dibanding KN menunjukkan telah terjadi kerusakan pada pulau Langerhans karena induksi DM dengan alloxan sehingga menyebabkan terjadinya nekrosis sel β pankreas. Alloxan di dalam tubuh mengalami metabolisme oksidasi reduksi menghasilkan radikal bebas yang mengakibatkan kerusakan sel β pankreas. Terjadi pengurangan jumlah massa sel, dimana ukuran menjadi lebih kecil bahkan ada yang hancur dan menghilang [24]. Akibat kerusakan sel β , insulin tidak bisa dihasilkan sehingga terjadinya hiperglikemia. Hiperglikemia dapat memperparah kerusakan sel β karena cenderung meningkatkan pembentukan ROS melalui jalur autooksidasi glukosa dan fosforilasi oksidatif [3]. Studi autopsi manusia menunjukkan bahwa terjadi penurunan massa sel β pankreas sebesar 40-60% pada pasien yang menderita diabetes mellitus tipe 2 [22]. Efek senyawa alloxan terhadap sel β pankreas menyebabkan inti sel β mengalami kariolisis, komponen sitoplasma mengalami disintegrasi, batas-batas sel tidak jelas, dan 40-50% sel nekrosis [14, 18, 21]. Berbeda dengan kelompok

DM, pada kelompok P1, P2 dan P3 yang diberi propolis selama 21 hari kerusakan pula Langerhans tidak begitu berat. Masih terlihat pulau Langerhans dengan diameter 100 μm dengan kerusakan pada beberapa bagian dari pulau Langerhans. Kondisi ini diduga karena terhentinya kerusakan lebih lanjut pada sel β pankreas yang disebabkan oleh alloxan, karena adanya kandungan flavonoid pada propolis. Flavonoid berperan sebagai antioksidan yang mampu mengurangi stress oksidatif pada sel [25].



Gambar 2. Sayatan Histologi Pankreas Mencit pada Awal dan Akhir Perlakuan

4. Kesimpulan

Berdasarkan analisis kualitatif terhadap sayatan histologi pankreas diketahui bahwa pulau Langerhans pada mencit kelompok KDM, P1, P2 dan P3 yang diberi injeksi alloxan telah mengalami kerusakan. Setelah diberi perlakuan dosis propolis selama 21 hari, pada kelompok P1, P2 dan P3 kerusakan pula Langerhans tidak begitu berat bila dibandingkan dengan KDM. Hal ini membuktikan bahwa propolis memiliki potensi sebagai antidiabetes dengan adanya perbaikan pada kerusakan pulau Langerhans pada mencit yang diberi propolis.

Daftar Kepustakaan

- [1.] Wilson, L. M. & Price, S. A. 1992. Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit. Edisi Keempat. Alih bahasa: Peter Anugrah. Penerbit buku Kedokteran EGC. Jakarta, 78-92.
- [2.] Can, A., Nuriye., Ozov, N., Bolkent, S., & Yanardag, R. 2004. Effect of Aloe vera leaf and pulp extracts on the liver in type II diabetic rat models. *Bio. Pharm. Bull.* 27 (5), 694-698.
- [3.] Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A. & Grodsky, G.M. 2003. Oxidative stress-activated signaling pathway mediators of insulin resistance and β cells disfunctions?. *Diabetes*, 52 (1), 1-8.
- [4.] Robertson, R. P., Harmon, J., Tran, P. O., Tanaka, Y., & Takahashi, H. 2003. Glucose toxicity in beta-cells, type 2 diabetes, good radical gone bad, and the glutathion connection. *Diabetes*, 52, 581-587.
- [5.] Jee, S. H., Kim, H. J., & Lee, J. 2005. Obesity insulin resistance and cancer risk. *Yonsei Med Journal*, 46, 449-455.
- [6.] Okutan, H., Ozcelik N, Yilmaz H. R., & Uz, E. 2005. Effect of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clin. Biochem.*, 38 (2), 192-196.
- [7.] Niskanen, L. K., Salonen, J. T., Nyysönen, K., & Uusitupa, M. I. 1995. Plasma lipid peroxidation and hyperglycaemia: a connection through hyperinsulinaemia? *Diabetic Medicine*, 12, 802-808.
- [8.] Santini, S. A., Marra, G., Giardina, B., Cotroneo, P., Mordente, A., Martorana, G. E., Manto, A., & Ghirlanda, G. 1997. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes*, 46, 1853-1858.
- [9.] Cederberg, J., Basu, S., & Eriksson, U. J. 2001. Increased rate of lipid peroxidation and protein carbonylation in experimental

diabetic pregnancy. *Diabetologia*, 44, 766-774.

- [10.] Kaneto, H., Kajimoto, Y., Miyagawa, J., & Hori, M. 1999. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic β -cells against glucose toxicity. *Diabetes*, 48, 2398-2406.
- [11.] Houstin. N., Rosen. E. D., & Lander. E.S. 2006. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*, 440, 944-948.
- [12.] Bonnard. C., Durand. A., Peyrol. S. Chanseau. E., Chauvin M. A., Mario. B., Vidal. H., & Rieusset. J. 2008. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistance mice. *J. Clin. Invest*, 118, 789-800.
- [13.] Kumashiro. N., Tamura. Y., Uchida. T., Ogihara. T., Fujitani. Y., Hirose. T., Mochizuki. H., Kawamori. H., & Watada. H. 2008. Impact of oxidative stress and peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α in hepatic insulin resistance. *Diabetes*, 57, 1083-2091.
- [14.] Mercuri, F., Quagliaro, L., & Ceriello, A. 2000. Oxidative stress evaluation in diabetes. *Diabetes Technol. Ther.*, 2, 589-600.
- [15.] West, I. C. 2000. Radical and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Med.*, 17, 171-180.
- [16.] Cam, M., Yavuz, O., Guven, A., Ercan, F., & Sutundag, N. 2003. Protective effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pineal Phys.*, 35, 212-220.
- [17.] Halliwell, B., & Gutteridge. 1999. Free radical in biology and medicine. 3rd ed. Oxford Univ Press, New York.
- [18.] Auslander, W., Haire-Joshu, D., Houston, C., Rhee, C.W., & Williams, J. H. 2002. A controlled evaluation of staging dietary patterns to reduce the risk of diabetes. *Diabetes Care*, 25, 809-814.
- [19.] Marjani, A. 2005. Plasma lipid peroxidation zinc and erythrocyte Cu-Zn superoxide dismutase enzyme activity in patient with type 2 diabetes mellitus. *Internet Endocrinol*, 2 (1), 1647-1648.
- [20.] Nobercourt, E., Jacqueminet, S., Hanset, B., Chantepie, S., Grimaldi, A., Chapman M. J., & Kontush, A. 2005. Defective antioxidative activity of small dense HDL particle in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycemia. *Diabetologia*, 48 (3), 529-538.
- [21.] Rohilla, A., & Ali, S. 2012. Alloxan induced diabetes: mechanisms dan effects, *Int Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Science*, 3, 819-822.

- [22.] Shaw, J. E., Saltiel, A. R., & Zimmet, P. Z. (2010) : Global estimates of the prevalence of 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 87: 4-14.
- [23.] Shulman, G. I. 2000. Cellular mechanism of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106 (2), 19-26.
- [24.] Alarcon, F. J., Roman R., Flores, J. L., & Aguirre, F. 2002. Investigation on the hypoglycemic effect of extracts of four Mexican medicinal plant in normal and alloxan-induced diabetic mice. *Phytotherapy Research*, 16, 383-386.
- [25.] Szkudelski, T. 2001. The Mechanism of alloxan and streptozotocin action β cells of the rat pancreas. *Physiology*, 50, 536-546.
- [26.] Akhlaghi, M., & Bandy, B. 2009. Mechanism of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Biol. Mol. Cardio.*, 46, 309-317.

