

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata jumlah sel endotel arteri ekor tikus normal adalah $35,25 \pm 7,54$, sedangkan rata-rata jumlah sel endotel arteri ekor pada kelompok tikus dengan DM yang diinduksi STZ adalah $20,50 \pm 3,70$. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok DM (kontrol positif) terjadi penurunan jumlah sel endotel arteri ekor yang bermakna terhadap kelompok tikus normal (kontrol negatif) dengan $p = 0,003$ ($p < 0,05$). Penurunan jumlah sel endotel ini menunjukkan adanya kematian sel endotel yang berlebihan yang terjadi pada kelompok DM yang diberi diet tinggi lemak dan injeksi STZ.

Diet tinggi lemak merupakan jenis pakan tikus yang akan meningkatkan kejadian dislipidemia, obesitas, hiperglikemia, serta resistensi insulin yang biasa disebut dengan sindroma metabolik (Buettner *et al.*, 2006). Injeksi STZ pada tikus akan memberikan efek toksik pada sel-sel beta pankreas yang memproduksi insulin. STZ akan masuk ke dalam sel melalui transporter glukosa GLUT 2 dan menyebabkan alkilasi DNA dan kematian sel beta (Deeds *et al.*, 2011). Diet tinggi lemak disertai dengan injeksi STZ ini yang kemudian akan memicu terjadinya DM tipe 2.

Hiperglikemia yang terjadi pada DM tipe 2 akan meningkatkan produksi ROS melalui beberapa mekanisme yaitu autooksidasi glukosa, jalur poliol, pembentukan AGEs, aktivasi PKC, dan peningkatan jalur heksosamin. Normalnya, produksi ROS akan dinetralisasi oleh mekanisme pertahanan dari antioksidan seluler. Namun, jika terjadi ketidakseimbangan antara antioksidan protektif dan

produksi ROS inilah yang akan menyebabkan terjadinya stres oksidatif dan memicu gangguan dan kerusakan fungsi seluler (Mohora *et al.*, 2007; Tangvarasittichai, 2015).

Bahan reaktif dari radikal bebas mampu memicu terbentuknya reaksi berantai pada sel endotel dan mengakibatkan timbulnya kerusakan komponen dalam sel endotel (Halliwell dan Gutteridge, 2007). Rusaknya sel endotel dapat menginduksi terjadinya apoptosis. Apoptosis merupakan proses kematian sel yang terprogram. Pada keadaan normal, apoptosis merupakan mekanisme proteksi untuk mengeliminasi sel-sel yang sudah tua atau rusak (Oever *et al.*, 2010).

Radikal bebas dapat mengaktivasi kaskade kaspase dan menginduksi terjadinya apoptosis pada sel endotel melalui beberapa mekanisme. Contohnya, melalui peningkatan rasio protein pro-apoptosis Bax terhadap protein anti-apoptosis Bcl-2 (Oever *et al.*, 2010; Kageyama *et al.*, 2011), peningkatan produksi PGE₂ melalui upregulasi ekspresi COX-2 yang dapat menginduksi kematian sel (Sheu *et al.*, 2006), dan melalui aktivasi jalur JNK (Oever *et al.*, 2010; Avogaro *et al.*, 2011). Kematian yang terjadi pada sel endotel dapat menyebabkan lepasnya sel tersebut dari dinding pembuluh darah (Lampka *et al.*, 2010). Lepasnya sel endotel tersebut akan membuat jumlah sel endotel intak pada dinding pembuluh darah menjadi berkurang.

Ekstrak daun kemiri terbukti dapat meningkatkan jumlah rerata sel endotel pada keadaan DM. Berdasarkan hasil penghitungan, untuk kelompok tikus DM dengan pemberian ekstrak daun kemiri dosis 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan 400 mg/kgBB memiliki rata-rata jumlah sel endotel arteri ekor yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok tikus DM (kontrol positif). Dari hasil uji statistik, diketahui bahwa peningkatan jumlah sel endotel pada kelompok tikus DM dengan

pemberian ekstrak daun kemiri 100 mg/kgBB memiliki perbedaan secara bermakna terhadap kelompok tikus DM (kontrol positif) dengan $p = 0,029$ ($p < 0,05$).

Peningkatan jumlah sel endotel tersebut berkaitan dengan kandungan swertisin dan rhamnosylswertisin yang terdapat pada ekstrak daun kemiri. Swertisin dan rhamnosylswertisin merupakan suatu flavonoid C-glikosida yang dapat menurunkan kadar glukosa darah *postprandial* dengan cara menghambat aktivitas enzim α -glukosidase. Enzim α -glukosidase merupakan enzim kunci pada pencernaan karbohidrat yang berfungsi mengkatalisa hidrolisis karbohidrat kompleks menjadi glukosa pada usus halus dan meningkatkan kadar glukosa darah *postprandial*. Penghambatan pada enzim ini akan menurunkan absorpsi glukosa usus karena karbohidrat tidak dapat dipecah menjadi glukosa, sehingga akan menurunkan kadar glukosa darah setelah makan (Wu *et al.*, 2012; Nair *et al.*, 2013). Swertisin juga memiliki potensi dalam regenerasi sel beta pankreas. Swertisin dapat memfasilitasi *islet neogenesis* dari sel induk/progenitor pankreas melalui jalur *p38 mitogen-activated protein kinase* (MAPK). *Islet neogenesis* merupakan proliferasi dan diferensiasi sel induk/progenitor pankreas sehingga menghasilkan sel-sel beta pankreas. Dengan adanya generasi sel-sel beta pankreas yang baru, maka produksi insulin juga dapat meningkat (Dadheech *et al.*, 2013; Dadheech *et al.*, 2015). Swertisin dan rhamnosylswertisin sebagai senyawa flavonoid mengandung senyawa fenolik yang memiliki aktivitas antioksidan. Flavonoid dapat mengeliminasi radikal bebas secara langsung melalui donasi atom hidrogen. Dengan adanya aktivitas antioksidan dari swertisin dan rhamnosylswertisin ini, maka akan terjadi penurunan jumlah radikal bebas dan menurunkan kejadian stres oksidatif (Balasundram *et al.*, 2006; Rahman, 2007; Prochazkova *et al.*, 2011). Mekanisme-mekanisme ini dapat menurunkan kejadian

hiperglikemia dan stres oksidatif sehingga terjadi penurunan apoptosis sel endotel serta peningkatan jumlah sel endotel pada arteri ekor.

Pada kelompok tikus DM dengan pemberian ekstrak daun kemiri dosis 200 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB, didapatkan jumlah rata-rata sel endotel yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol positif DM, namun pada hasil uji statistik tidak menunjukkan peningkatan jumlah sel endotel yang signifikan ($p > 0,05$). Pada pemberian dosis tersebut, jumlah rata-rata sel endotel arteri ekor mengalami sedikit penurunan jika dibandingkan dengan pemberian ekstrak daun kemiri dosis 100 mg/kgBB. Salah satu mekanisme yang mungkin dapat menjelaskan hal ini adalah karena tingginya kadar NO yang diproduksi melalui *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) pada tikus. iNOS merupakan salah satu dari tiga isoform NOS yang dapat memproduksi NO sebagai respon inflamasi yang terjadi pada DM (Moncada dan Higgs, 2006). Peningkatan massa adiposa karena obesitas berhubungan dengan peningkatan berbagai molekul-molekul inflamasi, termasuk resistin, iNOS, IL-6, dan TNF- α , yang kemudian akan mengaktifkan imunitas bawaan (*innate immunity*) (Shoelson *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2010). Sitokin dan TNF- α dapat menginduksi ekspresi gen iNOS melalui aktivasi NF- κ B pada berbagai sel, termasuk sel endotel, monosit, makrofag, dan sel otot polos vaskular (Tripathi dan Aggarwal, 2006; Cengel dan Sahinarslan, 2006). NO yang diproduksi dalam konsentrasi rendah oleh eNOS memiliki efek anti-apoptosis sedangkan iNOS akan memproduksi NO dengan konsentrasi tinggi yang justru bersifat sitotoksik dan akan memicu terjadinya apoptosis sel endotel melalui jalur cGMP. NO yang berikatan pada bagian *heme* dari *guanylate cyclase* akan meningkatkan kadar cGMP, kemudian mengaktifkan protein kinase G dan akhirnya memicu kematian sel melalui apoptosis (Liao *et al.*, 2006; Chatterjee dan

Catravas, 2008). Adanya efek pro-apoptosis dari NO inilah yang diduga menyebabkan jumlah sel endotel pada arteri ekor tikus mengalami penurunan.

Berdasarkan uraian di atas, maka dapat disimpulkan bahwa hipotesis yang mengatakan bahwa ekstrak daun kemiri dapat meningkatkan jumlah sel endotel arteri ekor pada tikus DM tipe 2 terbukti pada penelitian ini. Efek optimal didapatkan pada kelompok tikus DM dengan pemberian ekstrak daun kemiri dosis 100 mg/kgBB. Pada kelompok tersebut, jumlah sel endotel arteri ekor mengalami peningkatan secara signifikan dibandingkan dengan kelompok DM (kontrol positif). Pada kelompok tikus DM dengan pemberian ekstrak daun kemiri dosis 200 mg/kgBB dan dosis 400 mg/kgBB, jumlah sel endotel arteri ekor juga mengalami peningkatan jumlah jika dibandingkan dengan kelompok DM (kontrol positif). Meskipun peningkatan tersebut tidak memiliki perbedaan yang signifikan pada uji statistik, namun hasil penghitungan jumlah sel endotel pada kelompok tersebut sudah mendekati jumlah sel endotel pada kelompok normal (kontrol negatif). Hasil yang tidak signifikan pada penelitian ini dikarenakan oleh nilai standar deviasi yang tinggi (lebih dari 10%) sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang lebih besar agar hasilnya lebih homogen.

6.2 Keterbatasan Penelitian

Terdapat faktor yang merupakan keterbatasan peneliti dalam melaksanakan penelitian mengenai pengaruh ekstrak daun kemiri terhadap jumlah sel endotel arteri ekor tikus Wistar model DM tipe 2, yaitu perendaman organ arteri ekor dalam larutan fiksasi formalin 10% dalam waktu yang terlalu lama memungkinkan terjadinya perbedaan kualitas pada sediaan histopatologi arteri ekor pada tikus.