

## BAB VI

### PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas pemberian ragi *Saccharomyces cerevisiae* terhadap perbaikan struktur dan fungsi jaringan pankreas mencit model diabetes mellitus dengan indikator berat badan mencit, kadar glukosa darah puasa, jumlah sel beta pancreas dan ekspresi sel CD34 dengan menggunakan hewan coba mencit jantan galur balb/C (*Mus musculus*).

Pembuatan model hewan coba mencit DM tipe 1 pada percobaan ini mengacu pada Arora *et al.* (2009), yaitu dengan menginjeksikan STZ dosis multipel sebanyak 40 mg/kgBB selama 5 hari berturut-turut. STZ dosis rendah tersebut menyebabkan alkilasi DNA yang mengakibatkan kerusakan fragmentasi pada DNA sel beta pankreas sehingga terjadinya insulinitis (Lenzen, 2008). Insulinitis atau infiltrasi pada islet pancreas memicu apoptosis sel beta pankreas. Apoptosis dari sel beta pankreas menyebabkan kerusakan sel tersebut yang ditandai dengan degradasi masa sel beta pankreas. Hal ini menyebabkan menurunnya kadar insulin dalam sirkulasi yang merupakan penanda dari DM tipe 1 (Van Belle *et al.*, 2011). Pada penelitian ini diamati gejala klasik DM tipe 1 seperti polifagi dan polidipsi. Keadaan tersebut ditandai dengan sisa pangan dan air minum yang semakin sedikit seiring dengan berjalannya penelitian yang diikuti pula dengan penurunan berat badan.

Ragi *Saccharomyces cerevisiae* merupakan salah produk bahan dasar pangan yang biasa digunakan sebagai bahan dasar pembuatan bir, roti, tempe, tape (Landecker, 1972) dan suplemen (Hong *et al.*, 2004). Ragi *Saccharomyces cerevisiae* diserap secara maksimal oleh tubuh melalui pemberian oral pada saat

perut dalam keadaan kosong. *Beta* glucan yang merupakan kandungan utama pada dinding sel ragi *Saccharomyces cerevisiae* akan diserap oleh Sel M pada lumen intestinal. Sel M membantu penyerapan *beta glucan* dan mengekspresikannya ke APC yang berada di patch peyer (Frey *et al.*, 1996). Makrofrag yang merupakan APC menangkap *beta glucan* melalui reseptor *dectin-1*, CR3, dan TLR2/6 pada permukaannya, dan kemudian teraktivasi. Makrofag yang teraktivasi meregulasi system imun. Salah satu proses regulasi yang terjadi adalah dengan mengekspresikan G-CSF. Peningkatan kadar G-CSF menyebabkan sel osteoblast lineage dan kemokin SDF-1 tersupresi dan menurunkan regulasi CXCR4 yang merupakan reseptor pada permukaan HSC atau sel CD34. Supresi sel osteoblast lineage, SDF-1, dan CXCR4 memobilisasi HSC ke sirkulasi perifer. Kadar HSC yang meningkat pada sirkulasi menunjukkan perbaikan pada sistem imun pada diabetes melitus tipe 1 yang disebabkan oleh autoimun dan perbaikan pada jaringan pankreas pada proses desktruksi sel beta pankreas (Ito *et al.*, 2009).

### **6.1 Efek Injeksi STZ Serta Peran Pemberian Ragi *Sacchaomyces serevisiae* Terhadap Berat Badan Mencit**

Uji ANOVA dilakukan untuk menilai pada minggu keberapa didapatkan perbedaan terhadap perkembangan berat badan mencit. Pada hasil uji ANOVA, didapatkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara minimal 2 (dua) kelompok yang dimulai dari M2 (14 hari pasca injeksi STZ) sampai pengukuran bert badan di akhir penelitian. Kerusakan sel beta pankreas akibat injeksi STZ menurunkan produksi insulin (Arora *et al.*, 2009) yang mengakibatkan timbulnya gejala klasik DM seperti polifagi dan polidipsi. Keadaan polifagi tersebut meningkatkan nilai kenaikan berat badan mencit antara 22-32 hari (M3-M4) pasca injeksi STZ, kemudian kerusakan sel beta pankreas tersebut dilanjutkan

dengan proses lipolisis. Proses lipolisis merupakan kompensasi akibat tidak efektifnya penggunaan glukosa darah yang ditandai dengan penurunan berat badan sampai minggu akhir penelitian (Gambar 5.1).

Pada uji *post hoc tukey* HSD dan uji *homogeneous subsets* dari penimbangan berat badan 49 hari pasca diinjeksi STZ (42 hari diberi ragi *Saccharomyces cerevisiae*) didapatkan kelompok P2 dan P3 masih dalam satu kelompok dengan kelompok K (-) ( $p = 0,067$ ) sedangkan kelompok P1 dan juga P2 masih dalam satu kelompok dengan kelompok K (+) ( $p = 0,089$ ). Hal ini semakin menguatkan hipotesis bahwa pemberian ragi *Sacchaaromyces cerevisiae* dosis 100 mg/kgBB dan dosis 200 mg/kgBB mampu menghambat penurunan berat badan dan memperbaiki gejala klasik DM tipe 1 yaitu penurunan berat badan akibat injeksi STZ.

## **6.2 Profil Glukosa Darah Normal Puasa Mencit**

Kadar Glukosa Darah mencit jantan normal menurut Soemardji (2004) adalah dalam rentang 71-124 mg/dl. Sebelum diukur kadar glukosa darahnya, mencit dipuasakan selama 10-14 jam. Pengukuran kadar glukosa darah puasa normal pada kelompok K (-) dalam penelitian ini didapatkan dengan rata-rata sebesar  $112,32 \pm 18,57$ .

## **6.3 Efek Injeksi STZ Serta Peran Pemberian Ragi *Sacchaomyces serevisiae* Terhadap Kadar Glukosa Darah Puasa Mencit**

Pengamatan pada hasil uji ANOVA kadar glukosa darah puasa mencit, didapatkan perbedaan kadar glukosa darah puasa yang signifikan ( $p < 0,05$ ) dimulai dari M3 (22 hari setelah diinjeksi STZ atau 15 hari setelah diberi ragi *Saccharomyces cerevisiae*) sampai pengukuran di minggu akhir. Pada M2 (14 hari setelah diinjeksi STZ) profil kadar glukosa darah puasa mencit yang diinjeksi

STZ tergolong hiperglikemia ( $GD > 126$  mg/dl) namun tidak didapatkan perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ) pada uji ANOVA.

Pada gambar 5.3 didapatkan kadar glukosa darah yang naik (M4 dan M6) dan turun (M3 dan M5) pada kelompok-kelompok yang diinjeksi STZ. Pengukuran 42 hari pasca injeksi STZ (35 hari pemberian ragi *Saccharomyces cerevisiae*) atau M5 didapatkan kadar glukosa darah puasa mencit menjadi normal yang kemudian kembali hiperglikemia ( $GD > 126$ ) di M6. Hal ini diduga sesuai dengan patogenesis DM tipe 1 (Gambar 2.1), pengukuran pada kelompok-kelompok yang diinjeksi STZ (K (+), P1, P2, dan P3) di M5 merupakan pengukuran pada fase *honeymoon*. Fase ini merupakan reaksi remisi yang berupa rangsangan proliferasi sel beta pankreas akibat inflamasi pada sel beta tersebut. Pada periode ini juga ditemukan kadar glukosa darah tidak sampai tahap hiperglikemia yang biasanya menjadi pengecoh dalam diagnosa dan penanganan DM tipe 1 (Van Belle *et al.*, 2011).

Hasil uji *post hoc tukey HSD* dan uji *homogeneous subsets* di M6 (Tabel 5.4), tidak didapatkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ) antara kelompok K (-), P3, dan P2. Tidak adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok P3, P2, dan P1. Tidak adanya perbedaan yang signifikan antara P2, P1, dan K (+).

Pemberian STZ dosis multipel mampu menginduksi mencit menjadi DM yang diandai dengan keadaan hiperglikemia pada kelompok K (+) sedangkan pada kelompok perlakuan diamati perbaikan kadar glukosa darah yang semakin mendekati kelompok normal (K (-)). Hal ini semakin menguatkan hipotesis penelitian bahwa pemberian ragi *Saccharomyces cerevisiae* mampu memperbaiki kadar glukosa darah puasa mencit yang di induksi DM dengan menggunakan STZ.

Kemudian dilakukan uji korelasi *pearson* untuk mengetahui hubungan antar dosis pemberian ragi *Saccharomyces cerevisiae* (Tabel 5.5). Hasil uji korelasi *pearson* didapatkan nilai korelasi *pearson* sebesar  $r = -0,619$  (dengan tingkat signifikansi  $p = 0,032$ ), yang berarti tingkat keeratannya kuat dan berbanding negatif. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar dosis pemberian ragi *Saccharomyces cerevisiae* semakin mendekati kadar glukosa darah kelompok K (-).

#### **6.4 Efek Injeksi STZ Serta Peran Pemberian Ragi *Sacchaomyces serevisiae* Terhadap Rerata Jumlah Sel Beta Pankreas**

Hasil penghitungan rerata jumlah sel beta pankreas didapatkan kelompok K (+) memiliki rata-rata jumlah sel beta pankreas terendah ( $9,74 \pm 2,24$ ), kemudian kelompok P1 ( $20,28 \pm 3,13$ ) memiliki rata-rata jumlah sel beta pankreas lebih tinggi dari kelompok K (+). Kelompok P2 ( $34,23 \pm 3,58$ ) memiliki rata-rata jumlah sel beta pankreas lebih tinggi dari kelompok K (+) dan P1. Kelompok P3 ( $48,53 \pm 7,92$ ) memiliki rata-rata jumlah sel beta pankreas lebih tinggi dari kelompok K (+), P1, dan P2. Kelompok K (-) ( $52,67 \pm 8,28$ ) memiliki rata-rata jumlah sel beta pankreas tertinggi dari semua kelompok. Hasil uji *post hoc tukey HSD* dan uji *homogeneous subsets* tidak didapatkan perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ) antara kelompok K (+) dan P1. Tidak didapatkan perbedaan yang signifikan antara kelompok K (-) dan P3. Didapatkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara kelompok P2 dengan kelompok lainnya.

Pemberian STZ nampaknya mempengaruhi jumlah sel beta pankreas yang ditandai dengan gambaran apoptosis sel beta pankreas di pulau langerhans (gambar 5.8). Sedangkan pada kelompok perlakuan diamati adanya perbaikan dengan indikator jumlah sel beta pankreas yang lebih banyak dari kelompok K (+). Hal ini menguatkan hipotesis penelitian bahwa pemberian ragi

*Saccharomyces cerevisiae* mampu memperbaiki rerata jumlah sel beta pankreas ke arah normal.

Hasil uji korelasi *pearson* pada kelompok P1, P2, dan P3 didapatkan, hubungan positif dengan tingkat keamatan yang kuat sekali ( $r = 0,926$ ). Dengan demikian, semakin besar dosis pemberian ragi *Saccharomyces cerevisiae* semakin besar pula rerata jumlah sel beta pankreasnya mendekati ke arah normal.

### **6.5 Efek Injeksi STZ Serta Peran Pemberian Ragi *Sacchaomyces cerevisiae* Terhadap Ekspresi Sel CD34**

Hasil pengukuran rata-rata ekspresi sel CD34 didapatkan, kelompok K (-) memiliki presentase ekspresi terendah ( $7,61 \pm 3,59$ ). Kelompok K (+) ( $22,85 \pm 11,61$ ) lebih tinggi dari kelompok K (-). Kelompok P1 ( $39,18 \pm 15,19$ ) lebih tinggi dari kelompok K (-) dan K (+). Kelompok P2 ( $39,82 \pm 10,39$ ) lebih tinggi dari kelompok K (-), K (+) dan P1. Kelompok P3 ( $43,76 \pm 13,85$ ) memiliki ekspresi sel CD34 tertinggi. Hasil pengukuran tersebut diuji menggunakan ANOVA sehingga dapat dilihat pada hasil uji *post hoc tukey HSD* dan uji *homogeneous subsets* tidak didapatkan perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ) antara kelompok K (-) dengan kelompok K (+) dan tidak didapatkan perbedaan yang signifikan pula antara kelompok K (+), P1, P2, dan P3.

Pemberian ragi *Saccharomyces cerevisiae* nampaknya mampu meningkatkan mobilisasi HSC ke sirkulasi yang ditandai dengan meningkatnya ekspresi sel CD34 di sirkulasi perifer. *Beta Glucan* yang merupakan kandungan utama dari ragi *Saccharomcyes cerevisiae* diserap oleh sel M di intestin dan kemudian akan ditangkap oleh APC. APC kemudian akan mengaktifkan regulasi sistem imun salah satunya dengan meningkatkan ekspresi G-CSF. Peningkatan G-CSF tersebut menyupresi jumlah sel *osteoblast lineage* serta menurunkan

regulasi dari CXCR4 dan SDF-1 yang merupakan faktor-faktor dari mobilisasi sel CD34 dari sumsum tulang ke sirkulasi perifer. Peningkatan ekspresi sel CD34 pada kelompok kontrol positif diduga akibat dari respon terhadap kerusakan pada sel beta pankreas. Peningkatan ekspresi sel CD34 pada kelompok perlakuan membuktikan hipotesis bahwa beta glukon yang merupakan kandungan utama dari ragi *Saccharomyces cerevisiae* mampu memfasilitasi migrasi *hematopoietic stem cell* ke perifer dengan indikator peningkatan ekspresi sel CD34.

Kemudian pada uji korelasi didapatkan nilai korelasi positif, sangat lemah ( $r = 0,160$ ) dan tidak signifikan ( $p = 0,619$ ). Hal ini membuktikan bahwa pemberian ragi *Saccharomyces cerevisiae* dengan dosis 50 mg/kgBB sudah mampu meningkatkan ekspresi sel CD34 di sirkulasi secara signifikan (K (-) & P1,  $p = 0,012$ ) serta peningkatan dosis pada pemberian ragi *Saccharomyces cerevisiae* tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap ekspresi sel CD34.

Dalam pelaksanaan penelitian ini terdapat beberapa kekurangan dan keterbatasan, yaitu dalam pembuatan model hewan DM tipe 1 dengan menggunakan mencit jantan Balb/C (*Mus musculus*), telah dilakukan pemberian pakan dan minum secara adlibitum yang dikontrol ketat dan terjadwal serta mencit dipuasakan  $\pm 10-14$  jam sebelum diukur kadar glukosa darahnya, namun pada pengukuran kadar glukosa darah puasanya didapatkan hasil kadar glukosa darah puasa yang fluktuatif.