

## PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN A TERHADAP LUAS PULAU LANGERHANS PANKREAS PADA TIKUS (*RATTUS NORVEGICUS*) GALUR WISTAR JANTAN MODEL DIABETES MELLITUS TIPE 2

drg.Prasetyo Adi, MS.\*, dr. Eviana Norahmawati, Sp.PA(K).\*\*, Yussika Fernanda\*\*\*

\*Laboratorium Biokimia Biomolekular Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

\*\*Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

\*\*\*Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

### ABSTRAK

Diabetes Mellitus adalah penyakit metabolik yang disebabkan kelainan produksi atau kerja insulin sehingga menyebabkan suatu keadaan hiperglikemia yang berujung pada gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Hiperglikemia yang terjadi dalam jangka panjang karena resistensi insulin pada pulau langerhans pankreas tersebut berimplikasi pada proses autooksidasi glukosa sehingga akan meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS). Kadar ROS yang tinggi dan pertahanan antioksidan yang lemah dalam sel akan menyebabkan apoptosis pulau langerhans pankreas. Penelitian ini bertujuan menganalisis pengaruh pemberian vitamin A terhadap luas pulau langerhans pankreas pada tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan model diabetes mellitus tipe 2 dengan menggunakan *true experimental design* secara *in vivo* di laboratorium. Penelitian ini memiliki lima kelompok yang mendapatkan perlakuan tertentu, diantaranya: KN(Kelompok Normal yang diberikan diet normal saja); KP(Kelompok Positif DM, yang diberikan diet tinggi lemak dan induksi STZ tanpa); VAP50 (Kelompok Positif DM yang diterapi dengan vitamin A dosis 50); VAP100 (Kelompok Positif DM yang diterapi dengan Vitamin A dosis 100); VAP150 (Kelompok Positif DM yang diterapi vitamin A dengan dosis 150). Dari hasil pengamatan dan pengukuran pulau langerhans pankreas dapat disimpulkan terdapat perbedaan luas pulau langerhans antar kelompok perlakuan. Kelompok KN menjadi kelompok dengan luas pulau langerhans terbesar sedangkan kelompok KP merupakan kelompok dengan luas pulau langerhans terkecil. Hal tersebut disebabkan karena efek ROS yang menyebabkan apoptosis sel. Selain itu, didapatkan peningkatan luas pulau secara berurutan pada kelompok VAP50, VAP100, dan VAP150 disebabkan karena pengaruh dari vitamin A yang bekerja sebagai antioksidan dan dapat menginduksi proses proliferasi sel. Penelitian ini membuktikan bahwa terdapat pengaruh pemberian vitamin A terhadap luas pulau langerhans dan terdapat korelasi yang kuat antara dosis pemberian vitamin A dengan luas pulau langerhans, dengan dosis optimal adalah dosis 150mg/kgBB

Kata Kunci: Diabetes Melitus tipe 2, Luas Pulau Langerhans Pankreas, Vitamin A, *Reactive Oxygen Species* (ROS), Antioksidan

## PENDAHULUAN

Diabetes Mellitus adalah penyakit metabolik yang disebabkan kelainan produksi atau kerja insulin sehingga menyebabkan suatu keadaan hiperglikemia yang berujung pada gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein (Iraj Heydari et al, 2009). Secara klinis, Diabetes Mellitus ditandai gejala khas seperti poliuria, polidipsia, polifagia, dan berat badan menurun tanpa sebab yang jelas, serta ditemukan abnormalitas nilai pada pemeriksaan glukosa darah (Syam, Fahria Ari et al, 2014). WHO memprediksikan kenaikan penderita Diabetes Mellitus tipe 2 di Indonesia dari 8,4 juta pada tahun 2000 menjadi 21,3 juta pada tahun 2030. Sedangkan *International Diabetes Federation* (IDF) memprediksi adanya peningkatan jumlah penyandang Diabetes Mellitus tipe 2 di Indonesia dari 9,1 juta pada tahun 2014 menjadi 14,1 juta pada tahun 2035 (PERKENI, 2015).

Berdasarkan prediksi tersebut kita bisa menyimpulkan bahwa prevalensi Diabetes Mellitus tipe 2 akan terus melambung tinggi. Namun, seiring bertambahnya hari, upaya untuk menekan angka-angka tersebut masih berkuat pada metode-metode terapi lama. Saat ini terapi Diabetes Mellitus tipe 2 saat ini berfokus pada modifikasi gaya hidup, medikasi obat-obat anti hiperglikemik, dan Insulin sebagai *Hormon Replacement Therapy*. Modifikasi gaya hidup meliputi terapi nutrisi medis dan pengelolaan kesehatan jasmani menjadi langkah awal dan utama dalam memulai terapi Diabetes Mellitus tipe 2. Sedangkan medikasi obat anti hiperglikemik dan injeksi insulin menjadi langkah terapi lanjutan sesuai situasi dan kondisi klinis penyandang Diabetes Mellitus tipe 2 (Perkeni, 2015). Hingga sekarang dua poin utama tersebut masih menjadi protab pengelolaan pasien Diabetes Mellitus tipe 2, khususnya medikasi anti hiperglikemik yang sangat cukup berkembang dan digunakan oleh pasien Diabetes Mellitus. Walaupun anti hiperglikemik dan insulin dirasa mampu mengobati gejala dan keluhan dari penyandang Diabetes mellitus tipe 2, namun obat-obat tersebut ternyata juga memiliki beberapa kelemahan. Diantaranya seperti efek samping hipoglikemi, reaksi alergi, naiknya berat badan, gangguan

gastrointestinal, hingga meningkatkan risiko fraktur pada wanita menopause. Selain itu, harga beberapa obat yang terbilang masih cukup mahal (Setyawati dan Lintin, 2016) dan diperlukan disiplin tinggi untuk patuh dalam konsumsi obat merupakan faktor lain yang menjadi kekurangan dalam medikasi antihiperglikemik dan insulin (Widodo et al, 2016). Merujuk pada kondisi saat ini, masyarakat kita telah cukup banyak tereduksi dan melakukan upaya tambahan dalam menangani Diabetes Mellitus tipe 2. Dari bahan herbal hingga sintesis banyak diteliti untuk mengembangkan pengobatan Diabetes Mellitus tipe 2 di masa depan.

Vitamin A merupakan salah satu vitamin penting yang dibutuhkan tubuh Vitamin A sendiri merupakan istilah yang digunakan untuk merujuk pada berbagai zat yang memiliki sifat biologis dan kimiawi yang sama seperti retinoid, retinol, asam retinal. sejak embriogenesis hingga pertumbuhan dan perkembangan tubuh setelah lahir. Tidak sekedar berfungsi sebagai metabolit yang digunakan untuk mengontrol differensiasi sel epitel, kesehatan mata, reproduksi, dan resistensi terhadap infeksi, saat ini vitamin A telah menjadi pengobatan penyakit keganasan seperti leukimia promielositik dan juga *Kapocis's Sarcom* (Eun-Jung Rhee, 2012). Menurut Steven A. Trasino, hilangnya diet vitamin A berimplikasi pada turunnya kadar vitamin A dalam pankreas, hiperglikemia, berkurangnya sekresi insulin secara masif. Selain itu, juga ditemukan remodeling pulau langerhans pankreas, apoptopsis sel Beta, peningkatan masa sel Alfa, hiperglukagonemia, serta perubahan distribusi ukuran pulau langerhans menjadi lebih kecil. Demikian halnya dengan penelitian yang dilakukan oleh *Chertow et al* menunjukkan bahwa pada tikus yang diberi diet rendah retinoid menyebabkan intoleransi glukosa dan gangguan pelepasan insulin akut yang diinduksi oleh glukosa.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) secara *in vivo* di laboratorium menggunakan rancangan *Randomized post test only controlled group design*. Sampel penelitian adalah model tikus *Rattus*

*novergicus* strain Wistar jantan usia 6–8 minggu dengan berat 120 – 160 gram dalam kondisi sehat. Tikus diberikan diet tinggi lemak pada seluruh kelompok. Pada kelompok KP dan VAP50, VAP100, VAP150 diet tinggi lemak dan induksi STZ. Setiap minggunya kadar glukosa darah puasa diukur pada setiap sampel tikus. Kemudian pada minggu ke 11 pada kelompok VAP diberikan injeksi vitamin A dengan dosis sesuai kelompok masing-masing.

#### Pengolahan Data

Data luas bidang dari pulau langerhans dihitung menggunakan rumus luas elips. Kemudian hasil perhitungan luas selanjutnya akan dianalisis menggunakan Program SPSS for windows versi 20.0 dengan tingkat kepercayaan 95% atau  $\alpha=0,05$ . Analisis data dilakukan dengan tujuan akhir membedakan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan dari tiap pulau langerhans yang diteliti. Langkah pertama yang dilakukan adalah melakukan uji saphiro wilk untuk menentukan distribusi dari sebaran data. Langkah kedua adalah menguji homogenitas/variasi antar data. Ketiga adalah Uji One Way Anova yang bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok data. Uji statistik yang terakhir adalah Uji Post Hoc. Langkah ini dilakukan untuk mendapatkan kesimpulan kelompok mana saja yang memiliki perbedaan bermakna. Langkah analisis terakhir adalah melakukan uji korelasi untuk menentukan hubungan antara pemberian vitamin A terhadap luas pulau langerhans

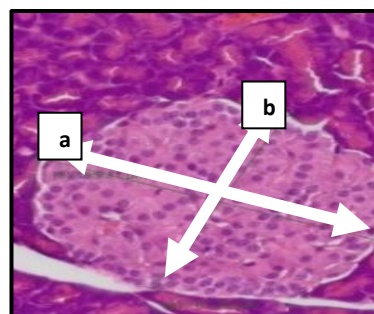
#### HASIL PENELITIAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan tikus *Rattus novergicus* galur wistar jantan yang dipelihara selama tiga bulan dengan diberikan beberapa asupan makanan dan perlakuan perlakuan. Tikus yang digunakan disini telah melalui beberapa persyaratan yaitu usia 6-8 minggu, sehat yang ditandai dengan aktifnya bergerak, bulu tikus putih dan bersih. Tikus yang digunakan adalah sejumlah 6 ekor tiap kelompok perlakuan tikus namun yang berhasil hingga diberikan perlakuan, bedah, hingga digunakan menjadi preparat adalah sebanyak dua puluh tikus dari total jumlah tikus yang dipelihara. Selama

rentang waktu pemeliharaan, tikus diberikan asupan makanan normal atau tinggi lemak sesuai dengan jenis kelompok perlakuan. Kemudian setiap minggunya dilakukan pengukuran berat badan tikus dan nilai gula darah puasa (GDP) pada setiap kelompok untuk men gevaluasi status hiperglikemia. Setelah penelitian selesai, tikus dibedah kemudian diambil organ pankreas untuk digunakan dalam sampel pembuatan preparat parafin blok. Preparat tersebut selanjutnya diamati dibawah mikroskop untuk mengetahui gambaran histologi Patologi anatomi dari sampel tiap kelompok perlakuan. Pada pengamatan histologi di Laboratorium Patologi Anatomi, tiap sampel preparat diukur panjang dan lebar kemudian dilakukan perhitungan luas pulau langerhansnya.

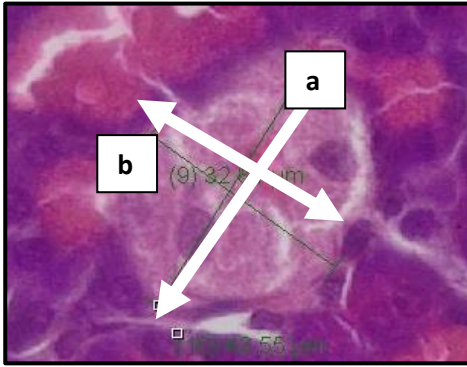
#### Gambaran Histologi dan Luas Pulau Langerhans Pankreas pada berbagai kelompok kontrol dan perlakuan.

Preparat yang menjadi sampel dalam penelitian ini diamati menggunakan mikroskop olympus di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Dari hasil pengamatan didapatkan histologi dari pulau langerhans pankreas dari tiap kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:



Gambar (Perbesaran 400x dengan Pengecatan HE) Pulau langerhans pankreas pada Kelompok Kontrol Negatif (KN). Morfologi pulau langerhans tampak oval/bulat. Pada kelompok ini didapatkan rerata luas pulau langerhans dari sampel preparat sebesar 28355,25  $\mu\text{m}$

Keterangan: a) jari-jari terpanjang dengan nilai sebesar 258,57  $\mu\text{m}$ ; b) jari-jari terpendek dengan nilai sebesar 133,8  $\mu\text{m}$

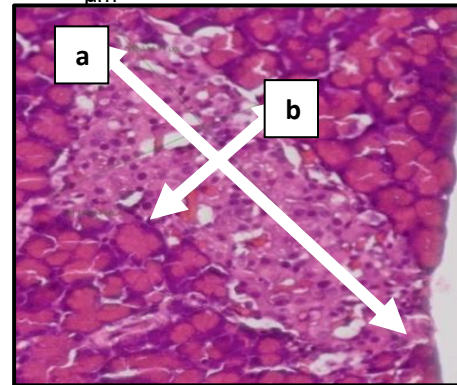


Gambar (Perbesaran 400x dengan Pengecatan HE) Pulau langerhans pankreas pada Kelompok Perlakuan Vitamin A dosis 100 (VAP100). Morfologi pulau langerhans tampak mengalami perubahan dari segi ukuran dan jumlah sel-selnya. Pada kelompok ini didapatkan rerata luas pulau langerhans dari sampel preparat sebesar 10951,67  $\mu\text{m}^2$

Keterangan: a) jari-jari terpanjang dengan nilai sebesar 107,48  $\mu\text{m}$ ; b) jari-jari terpendek dengan nilai sebesar 75,39  $\mu\text{m}$

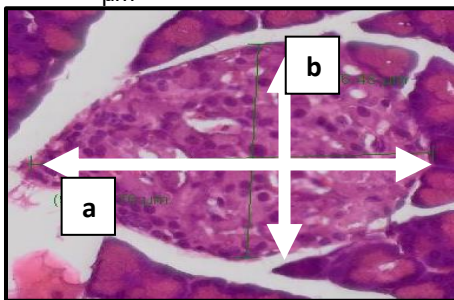
Gambar (Perbesaran 400x dengan Pengecatan HE) Pulau langerhans pankreas pada Kelompok Kontrol Positif (KP). Morfologi pulau langerhans tampak irreguler dengan jumlah sel yang terlihat lebih sedikit dibandingkan kelompok kontrol negatif (KN). Pada kelompok ini didapatkan rerata luas pulau langerhans dari sampel preparat sebesar 8940,706  $\mu\text{m}^2$

Keterangan: a) jari-jari terpanjang dengan nilai sebesar 89,4  $\mu\text{m}$ ; b) jari-jari terpendek dengan nilai sebesar 74,63  $\mu\text{m}$



Gambar (Perbesaran 400x dengan Pengecatan HE) Pulau langerhans pankreas pada Kelompok Perlakuan Vitamin A dosis 150 (VAP150). Morfologi pulau langerhans tampak mengalami perubahan dari segi ukuran dan jumlah sel-selnya. Pada kelompok ini didapatkan nilai jari-jari terpanjang sebesar 233,98  $\mu\text{m}$  dan jari-jari terpendek sebesar 101,89  $\mu\text{m}$  sehingga didapatkan rerata luas pulau langerhans dari sampel preparat sebesar 17852,03  $\mu\text{m}^2$

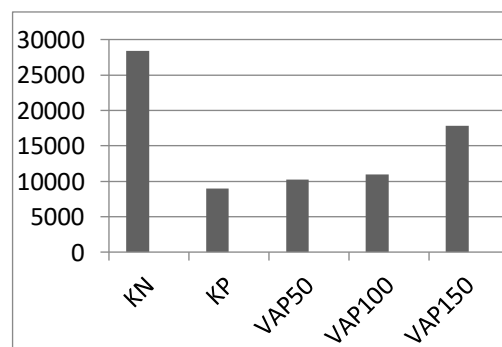
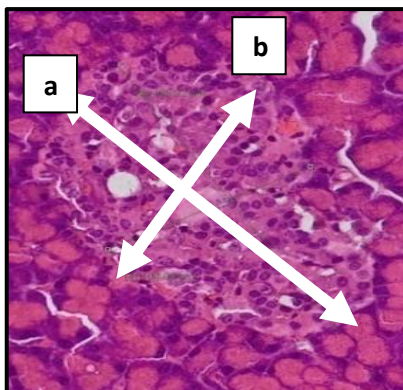
Keterangan: a) jari-jari terpanjang dengan nilai sebesar 233,98  $\mu\text{m}$ ; b) jari-jari terpendek dengan nilai sebesar 101,89  $\mu\text{m}$



Gambar (Perbesaran 400x dengan Pengecatan HE) Pulau langerhans pankreas pada Kelompok Perlakuan Vitamin A dosis 50 (VAP50). Morfologi pulau langerhans tampak mengalami perubahan dari segi ukuran dan jumlah sel-selnya. Pada kelompok ini didapatkan rerata luas pulau langerhans dari sampel preparat sebesar 10275,22  $\mu\text{m}^2$

Keterangan: a) jari-jari terpanjang dengan nilai sebesar 102,85  $\mu\text{m}$ ; b) jari-jari terpendek dengan nilai sebesar 48,74  $\mu\text{m}$

Data ukuran bidang dari pulau langerhans dihitung menggunakan rumus luas elips karena sebagian besar bentuk pulau langerhans yang diamati adalah berbentuk bidang elips. Dengan menghitung hasil perkalian dari konstanta  $\pi$  (Pi) dengan jari-jari minor (terpendek) dan jari-jari mayor (terpanjang). Berikut rerata luas pulau langerhans yang telah dihitung pada setiap kelompok:



Gambar Rata-Rata Luas Pulau Langerhans Pankreas pada setiap kelompok

Tabel diatas menunjukkan bahwa kelompok KN (Kontrol Negatif DM) memiliki rerata nilai luas pulau langerhans yang terbesar sementara kelompok KP (Kontrol Positif DM) memiliki rerata luas pulau langerhans pankreas yang paling kecil diantara kelompok yang ada. Disamping itu, kelompok VAP50 (vitamin A dosis 50) memberikan perubahan luas pulau langerhans paling kecil sedangkan kelompok VAP150 (vitamin A dosis 150) menjadi yang tertinggi dalam memberikan perubahan luas pulau langerhans. Pada kelompok perlakuan vitamin A, didapatkan rerata nilai luas berbanding lurus dengan besar dosis vitamin A yang diberikan. Merujuk pada tabel tersebut dapat diartikan bahwa dosis yang lebih besar berpengaruh terhadap perubahan luas pulau langerhans yang lebih besar pula. Sehingga dari tabel tersebut dapat disimpulkan bahwa dari perlakuan yang telah diberikan, vitamin A dosis 150 merupakan dosis yang paling optimal untuk memperbaiki luas pulau langerhans pada pankreas tikus yang telah diinduksi menjadi model DM tipe 2.

#### Analisis Data

Normalitas distribusi data dianalisis menggunakan uji Saphiro wilk dikarenakan jumlah data kurang dari lima puluh. Hasil dari Uji Normalitas bervariasi dari kisaran 0,212 hingga 0,785. Namun meskipun demikian dapat disimpulkan data yang didapat terdistribusi normal pada setiap kelompoknya karena nilai  $p > 0,05$ .

Untuk menguji apakah sebaran data adalah homogen atau tidak digunakan uji lavene. Dalam langkah ini didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,390. Nilai ini memiliki arti bahwa data yang didapat homogen atau dengan kalimat lain tidak adanya varian antar kelompok data karena  $p > 0,05$ . Dalam melakukan uji one way anova, syarat yang harus dipenuhi adalah data terdistribusi normal dan homogen. Tujuan dari dilakukannya uji ini adalah untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan diantara seluruh kelompok perlakuan. Hasil dari uji

one way anova sendiri terhadap luas pulau langerhans pankreas memberikan hasil signifikansi sebesar 0,001. Dari nilai ini dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan antar kelompok perlakuan yang dibandingkan karena nilai  $p < 0,05$ .

Langkah terakhir dalam uji Post Hoc menggunakan fungsi Tukey didapatkan bahwa tidak ada perbedaan luas pulau langerhans secara signifikan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok VAP50 dan kelompok VAP 100. Namun, terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok VAP150 dengan KN yang artinya vitamin A dosis 150 memberikan pengaruh perbaikan luas pulau langerhans yang semakin mendekati kelompok KN

#### DISKUSI

##### Pengaruh Pemberian Vitamin A Terhadap Luas Pulau Langerhans Pankreas Pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Galur Wistar Jantan Model Diabetes Mellitus Tipe 2

Pada penelitian ini, perlakuan yang diberikan pada tikus-tikus yang telah dimodifikasi menjadi model Diabetes Mellitus berupa vitamin A dalam berbagai dosis antara lain 50 mg (VAP 50), 100 mg (VAP 100), dan 150 mg (VAP 150). Pengamatan secara histologi dengan pengecatan HE, memperlihatkan morfologi pulau langerhans dalam kondisi normal/sehat pada kelompok KN. Kondisi normal ini dapat dinilai dari kelompok sel berbentuk bulat atau oval, dengan sel-sel yang sitoplasmanya bergranulasi. Pada kelompok KP ini juga terlihat sel-sel penyusunnya yang tersusun rapat selaras dengan hasil penelitian dari Kinkar Shobha B et al, 2016. Untuk rerata pulau langerhans dalam kelompok ini menempati nilai tertinggi diantara kelompok-kelompok lain.

Sementara itu, Pada kelompok KP, didapatkan perubahan morfologi pulau langerhans berupa degenerasi sel-sel penyusunnya, pelebaran lumen, dilatasi duktus intercalatus, dan outline dari pulau langerhans tampak irreguler. Kinkar Shobha B et al, 2016 juga menyatakan dalam penelitiannya bahwa pada kelompok pulau langerhans pada tikus yang telah dimodifikasi menjadi model Diabetes (melalui induksi alloxan) menunjukkan berkurangnya densitas sel langerhans secara nyata berupa banyaknya terdapat ruang kosong

antar sel-selnya. Ruang kosong yang terbentuk tersebut merupakan hasil dari proses apoptosis sel-sel beta. Mekanisme apoptosis sel sendiri diawali karena adanya stressor yang besar dari proses hiperglikemia kronis. Glukosa dalam bentuk enadiol yang berlebih akan mengalami autooksidasi dan mengalami reaksi transisi logam. Anion enadiol yang telah terbentuk dari reaksi tersebut akan dikonversi menjadi ketoaldehid reaktif dan hasil akhirnya adalah radikal superoksida. Superoksida pada umumnya akan didegradasi menjadi hidrogen peroksida. Namun apabila jumlah antioksidan non enzimatis (katalase, glutathione peroksidase) dalam tubuh sedikit maka selanjutnya superoksida akan dikonversi menjadi ion hidroksil. Hal inilah yang menyebabkan tingginya kadar radikal bebas pada tubuh penderita diabetes mellitus tipe 2.

Disamping itu, glukosa yang berlebih dapat meningkatkan produksi AGEs. Produk AGEs apabila berinteraksi dengan RAGEs akan menonaktifkan kerja enzim-enzim antioksidan, meningkatkan produksi radikal bebas dan menekan kerja. Tingginya kadar radikal bebas dalam sel membuat AGEs mengaktifkan faktor transkripsi NF-kB yang selanjutnya NF-kB juga akan meningkatkan produksi NO. NO inilah yang menjadi penyebab terjadinya kerusakan pada sel-sel beta pulau langerhans.

Hiperglikemia berkepanjangan membuat meningkatnya kecepatan apoptosis seluler melalui peningkatan ekspresi protein pro apoptosis yaitu caspase-3 dan penurunan protein antiapoptosis yaitu bcl-2 (Cerillio dan Testa, 2009). Apoptosis sel-sel beta juga dapat diinduksi melalui overproduksi radikal bebas superoksida ( $O_2^-$ ) yang dihasilkan di dalam mitokondria. Tingginya kadar radikal bebas Radikal bebas superoksida tersebut akan memicu sitokin-sitokin proinflamasi seperti Nf-kB untuk menghasilkan NO. NO kemudian akan bereaksi dengan ( $O_2^-$ ) untuk menghasilkan ion peroksinitrat yang berdampak pada kerusakan DNA sel sehingga terjadilah apoptosis.

Pada kelompok perlakuan Vitamin A berbagai dosis, didapatkan peningkatan rerata luas pulau langerhans dibandingkan dengan kelompok KP. Dari tiga jenis perlakuan, kelompok VAP 150 yang paling memberikan peningkatan rerata luas pulau

langerhans terbesar. Hasil ini dapat dijelaskan melalui hasil penelitian Helmut Sies, dkk yang menyebutkan bahwa vitamin A (dan derivatnya) dapat mendeaktifkan atau mencegah superoksida yang terbentuk. Vitamin A dianggap menjadi *scavenger* radikal bebas (Maritim, dkk, 2002) dengan cara menurunkan produksi radikal bebas intraseluler yang akan berimplikasi pada turunnya peroksidase sel (Sies, 2000) sehingga apoptosis sel dapat dihindari.

Dalam penelitian ini kelompok VAP150 yang menjadi kelompok dengan pemberian dosis vitamin A paling tinggi belum dapat mencapai luas pulau langerhans yang mendekati kelompok KN. Hal ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti dosis vitamin A yang memang belum atau kurang adekuat dalam memberikan efek terapi berupa regenerasi pulau langerhans. Berdasarkan panduan manajemen suplementasi vitamin A tahun 2009, dosis yang diberikan sebagai suplemen untuk tubuh berkisar dari angka 100.000 hingga 200.000 IU. Besar dosis tersebut diperuntukkan bayi, balita, ibu hamil, dan ibu nifas guna mencegah keadaan defisiensi vitamin A. Faktor pemberian dosis menjadi penting karena overkonsumsi vitamin A dapat menimbulkan banyak efek samping seperti salah satunya adalah toksitas pada tulang. Namun pada penelitian ini, vitamin A dirasa belum mencapai dosis yang optimal untuk menimbulkan efek terapi. Sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut perihal peningkatan dosis vitamin A untuk mendapatkan nilai rerata luas pulau langerhans yang lebih baik pula.

Secara prinsip, hasil penelitian di atas juga berkorelasi dengan penelitian yang dilakukan oleh Rehab Ahmed Rifaai *et al* pada 2012. Ahmed *et al* menyatakan bahwa pada pulau langerhans pankreas tikus model diabetes yang diberikani intervensi berupa quocertin menunjukkan adanya koneksi seluler diantara duktus dan sel-sel pulau langerhans. Telah dilaporkan bahwa sel progenitor atau sel stem pulau langerhans pada pankreas orang dewasa terdapat di dekat duktus pankreas. Beberapa macam stimuli dapat memicu sel stem ini untuk berdiferensiasi menjadi sel-sel endokrin pankreas yang baru.

## **Korelasi Pemberian Dosis Vitamin A dengan Luas Pulau Langerhans Pankreas**

Secara statistik pemberian vitamin A memiliki pengaruh terhadap luas pulau langerhans pankreas. Dari analisa tersebut disimpulkan bahwa korelasi antara berbagai dosis vitamin A dengan luas pulau langerhans memiliki hubungan korelasi yang cukup kuat. Artinya, pemberian terapi vitamin A memang berpengaruh secara signifikan dalam perbaikan luas pulau langerhans pankreas. Selain itu sifat korelasi antara dosis vitamin A dengan luas pulau langerhans ini bersifat positif. Semakin tinggi dosis yang diberikan semakin besar luas pulau langerhans.

Meningkatnya luas pulau langerhans yang berbanding lurus dengan naiknya dosis vitamin A yang diberikan dapat dijelaskan melalui dua mekanisme seluler. Mekanisme pertama, yaitu mengenai efek kerja vitamin A sebagai antioksidan dalam menghambat pembentukan dan sebagai *scavenger* ROS. Selain itu vitamin A juga berperan untuk menghambat teraktivasinya jalur metabolisme glukosa lain seperti poliol sorbitol dan hexamin serta menekan terbentuknya PKC, AGEs, dan reseptor AGEs (RAGEs) (Kowluru, 2015). Apabila jalur metabolisme dan produk metabolisme berhasil dihambat maka secara otomatis juga akan menghambat proses apoptosis sehingga sel-sel pulau langerhans yang mengalami kerusakanpun dapat dicegah.

Proses eliminasi ROS yang terbentuk oleh vitamin A sendiri dapat dipahami melalui beberapa reaksi kimiawi seperti: pembentukan senyawa baru (reaksi antara radikal bebas dengan vitamin A); transfer elektron; dan abstraksi hidrogen pada senyawa radikal bebas (Krinsky dan Johnson, 2005)

Mekanisme kedua yang dapat menjelaskan peran vitamin A dalam meningkatkan luas pulau langerhans adalah kemampuan vitamin A untuk mempropagasi terjadinya proliferasi sel. dari teori yang menyatakan bahwa ketika Asam Retinoat (metabolit dari retinol) berikatan dengan ligannya dalam inti sel, baik itu RAR ataupun RXR, selanjutnya ikatan ini akan menyebabkan disosiasi *corepressor* dan rekrutmen protein koaktivator pada sel sehingga akan mempromosikan terjadinya asetilasi histone dan aktivasi transkripsi mRNA.

Teraktivasinya proses transkripsi inilah yang selanjutnya akan menginisiasi proses proliferasi sel-sel dalam pulau langerhans (Yadley dan Malafa, 2015)

## **Dosis Optimal Vitamin A Dalam Perbaikan Luas Pulau Langerhans Pankreas Pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Galur Wistar Jantan Model Diabetes Mellitus Tipe 2**

Dalam penelitian ini dosis optimal yang dapat dicapai adalah dosis 150mg/kgBB. Pada dosis vitamin A sebesar 150mg/KgBB atau 150.000 IU didapatkan perubahan luas pulau langerhans yang paling besar diantara dosis vitamin A lainnya. Namun dosis vitamin A 150mg/KgBB belum dapat memberikan perubahan luas pulau langerhans yang mendekati dengan kelompok KN. Hal ini mengartikan bahwa besar dosis vitamin A yang lebih tinggi dianggap dapat memberikan hasil yang lebih baik pula yaitu perubahan luas pulau langerhans seperti pada kelompok tikus normal tanpa diinduksi menjadi Diabetes Mellitus tipe 2.

## **KESIMPULAN**

Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian vitamin A berpengaruh terhadap perbaikan luas pulau langerhans pankreas model Diabetes Mellitus.

## **SARAN**

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efek perbaikan luas pulau langerhans dari tikus model Diabetes Mellitus tipe 2 dengan dosis vitamin A yang lebih tinggi dan atau waktu perlakuan yang lebih lama dengan jumlah sampel penelitian yang memenuhi standard minimal penelitian.



## **The Influence of Vitamin A Provision to Pancreatic Langerhans Island Wide on Rat (*Rattus norvegicus*) Male Wistar Strain Type Diabetes Mellitus Model 2**

drg.Prasetyo Adi, MS.\*, dr. Eviana Norahmawati, Sp.PA(K).\*\*, Yussika Fernanda\*\*\*

\* Biomolecular Biochemistry Laboratory Faculty of Medicine Universitas Brawijaya

\*\* Anatomy Pathology Laboratory Faculty of Medicine Universitas Brawijaya

\*\*\* Medical Study Program Faculty of Medicine Universitas Brawijaya

### **ABSTRAK**

Diabetes Mellitus is a metabolic disease caused by abnormalities of production or insulin work resulting in a state of hyperglycemia that leads to carbohydrate, fat, and protein metabolism disorders. Long-term hyperglycemia due to insulin resistance in the pancreatic langerhans island implicates the glucose autooxidation process, thus increasing the production of Reactive Oxygen Species (ROS). High levels of ROS and weak antioxidant defense in cells will cause apoptosis of the pancreatic langerhans island. The objective of this study was to analyze the effect of vitamin A on wide island of pancreas langerhans on rat (*Rattus norvegicus*) male wistar strain model of diabetes mellitus type 2 using true experimental design in vivo in laboratory. This study had five groups that received certain treatment, including: KN (Normal group given normal diet only); KP (DM Positive Group, given a high fat diet and no STZ induction); VAP50 (DM Positive Group treated with vitamin A dose 50); VAP100 (DM Positive Group treated with Vitamin A dose 100); VAP150 (DM Positive Group treated with vitamin A at a dose of 150). From the observation and measurement of pancreas langerhans island can be concluded that there is wide difference of langerhans island between treatment groups. The KN group became the largest island-wide langerhans group while the KP group was the group with the smallest langerhans island area. This is due to the ROS effect that causes cell apoptosis. In addition, there was an increase in the area of islands in sequence in the VAP50, VAP100, and VAP150 groups because of the influence of vitamin A that acts as an antioxidant and can induce cell proliferation. This research proves that there is influence of vitamin A to wide island of langerhans and there is a strong correlation between dose of vitamin A with wide island of langerhans, with optimal dose is 150mg/kgBB

Keywords: Diabetes Mellitus type 2, Area of Island of Langerhans Pancreas, Vitamin A, Reactive Oxygen Species (ROS), Antioxidant



## INTRODUCTION

Diabetes Mellitus is a metabolic disease caused by abnormalities of production or insulin work resulting in a state of hyperglycemia that leads to carbohydrate, fat, and protein metabolism disorders (Heydari *et al*, 2009). Clinically, Diabetes Mellitus is characterized by distinct symptoms such as polyuria, polydipsia, polyphagia, and weight lost for no apparent cause, and abnormalitas values on blood glucose measurement (Syam, Fahria Ari *et al*, 2014). WHO predicted a rise in type 2 diabetes mellitus in Indonesia from 8.4 million in 2000 to 21.3 million in 2030. The International Diabetes Federation predicts an increase in the number of people with Type 2 Diabetes Mellitus in Indonesia from 9.1 million in 2014 to 14.1 million by 2035 (PERKENI, 2015).

Based on these predictions we can conclude that the prevalence of type 2 Diabetes Mellitus will continue to soar. However, as the day progresses, efforts to suppress the numbers are still concerned with older therapeutic methods. Current type 2 Diabetes Mellitus therapy focuses on lifestyle modification, medication of anti-hyperglycemic drugs, and Insulin as Hormone Replacement Therapy. Lifestyle modifications include medical nutrition therapy and physical health management to be a first and foremost step in starting type 2 Diabetes Mellitus therapy. While anti-hyperglycemic drug medication and insulin injection are the next step of therapy according to clinical situation and condition of Type 2 Diabetes Mellitus (Perkeni, 2015 ). Until now the two main points are still a protab management of Diabetes Mellitus type 2 patients, especially anti-hyperglycemic medication is very developed and used by patients Diabetes Mellitus. Although anti-hyperglycemic and insulin felt able to treat symptoms and complaints from type 2 Diabetes mellitus, but these drugs also have some weaknesses. Among them are hypoglycemic side effects, allergic reactions, weight gain, gastrointestinal disorders, and increased risk of fracture in menopausal women. In addition, the price of some medicines is still quite expensive (Setyawati and Lintin, 2016) and the need for high discipline to adhere to drug consumption is another

factor that is lacking in antihyperglycemic medications and insulin (Widodo *et al*, 2016). Referring to the current conditions, our society has been quite well educated and made additional efforts in dealing with type 2 Diabetes Mellitus. From herbal ingredients to synthesis are extensively researched to develop the treatment of Type 2 Diabetes Mellitus in the future.

Vitamin A is one of the most important vitamins your body needs. Vitamin A itself is a term used to refer to different substances that have the same biological and chemical properties as retinoids, retinol, retinal acid, from embryogenesis to growth and development of the body after birth. Not only serves as a metabolite that is used to control the differentiation of epithelial cells, eye health, reproduction, and resistance to infection, vitamin A has now become the treatment of malignant diseases such as promielositik leukemia and Kapocis's Sarcom (Eun-Jung Rhee, 2012). According to Steven A. Trasino, the loss of dietary vitamin A has implications for lower vitamin A levels in the pancreas, hyperglycemia, diminished insulin secretion massively. In addition, also found remodeling island langerhans pancreas, Beta cell apoptopsis, increased Alfa cell life, hiperglukagonemia, and changes in the size distribution of the island langerhans become smaller. Similarly, a study by Chertow *et al* showed that in mice fed a low-retinoid diet causing glucose intolerance and acute glucose-induced release of insulin release

## METHOD

This research uses true experimental design *in vivo* in the laboratory using Randomized post test only controlled group design design. The sample is *Rattus novergicus* strain model of Wistar strain male aged 6-8 weeks with weight 120 - 160 gram in healthy condition . Mice were given a high-fat diet on the whole group. In group of KP and VAP50, VAP100, VAP150 high fat diet and STZ induction. Every week fasting blood glucose levels were measured in each mouse sample. Then at week 11 in the VAP group were given vitamin A injections according to each group's dose.

## DATA PROCESSING

The wide area data from langerhans island was calculated using elliptical area formula. Then the results of the next calculation will be analyzed using SPSS for windows version 20.0 with 95% confidence level or  $\alpha = 0.05$ . Data analysis was conducted with the final goal of distinguishing whether or not a significant difference from each langerhans island was studied.

The first step is to do a saphiro wilk test to determine the distribution of the data distribution. The second step is to test the homogeneity/variation between data. The third is One Way Anova Test which aims to find out whether there are significant differences between data groups. The last test statistic is the Post Hoc Test. This step is done to get any group conclusion that has meaningful difference.

## RESULT

The sample used in this study was the rat *Rattus novergicus* male wistar strain maintained for three months with given some food intake and treatment treatment. The mice used here have gone through some of the requirements of 6-8 weeks of age, healthy marked by active moves, white and clean mice. The mice used were a total of 6 individuals per rat treatment group but who were successfully treated, surgical, and used as preparations were as many as twenty rats from the total number of rats preserved. During the maintenance period, rats were given normal or high fat intake of the food according to the type of treatment group. Then every week a mouse weight measurement and fasting blood glucose (GDP) values were performed in each group to evaluate the hyperglycemia status. After the study was completed, the rats were removed and the pancreas organ was taken for use in the paraffin block preparation sample. The preparations are then examined under a microscope to determine the histological features of anatomic pathology from the sample of each treatment group. In histology observation in Anatomical Pathology Laboratory, each sample

preparation was measured in length and width and then calculated wide island of langerhans.

### Histology and Wide of Langerhans Island of Pancreas

Preparations in this study were observed using an olympus microscope at the Anatomy Pathology Laboratory of UB's Medical Faculty. From the observation result histology from pancreatic langerhans island of each treatment group is as follows:

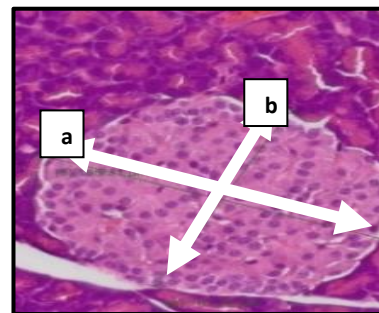


Figure of (Magnification 400x with HE Painting) Island of pancreas langerhans in Negative Control Group (KN). The morphology of langerhans island appears oval / round. In this group, the average island of langerhans was obtained from the sample preparation of 28355.25  $\mu\text{m}$

Description: a) the longest radius with a value of 258.57  $\mu\text{m}$ ; b) the shortest radius with a value of 133.8  $\mu\text{m}$

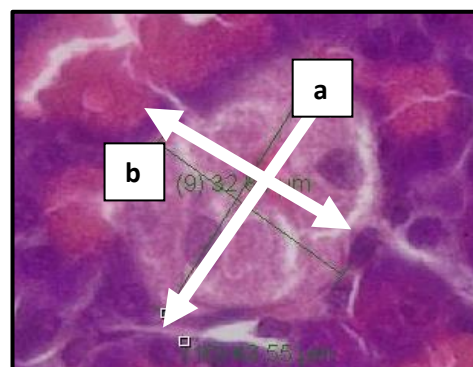


Figure of (Magnification 400x with HE Painting) Island pancreas langerhans on Positive Control Group (KP). The morphology of the langerhans island appears irregular with fewer visible cell counts than the negative control group (KN). In this group, the average island of langerhans was obtained from the sample preparation of 8940,706  $\mu\text{m}$

Description: a) the longest radius with a value of 89.4  $\mu\text{m}$ ; b) the shortest radius with a value of 74.63  $\mu\text{m}$

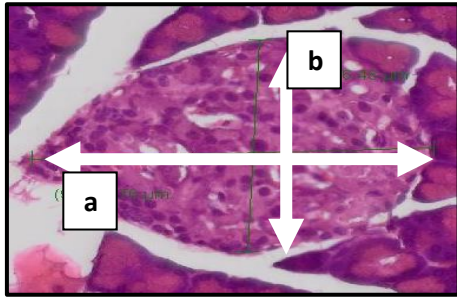


Figure of (Magnification 400x with HE Painting) Island langerhans pancreas on Group Treatment Vitamin A dose 50 (VAP50). The morphology of the langerhans island appears to be changing in terms of size and fvb of the number of cells. In this group, the average island of langerhans was obtained from the sample of 10275,22  $\mu\text{m}$

Description: a) the longest radius with a value of 102.85  $\mu\text{m}$ ; b) the shortest radius with a value of 48.74  $\mu\text{m}$

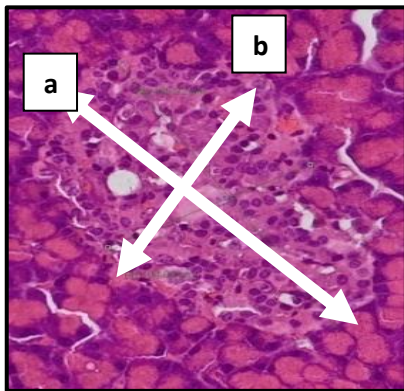


Figure of (Magnification 400x with HE Painting) Island langerhans pancreas on Group Treatment Vitamin A dose 100 (VAP100). The morphology of the langerhans island appears to be changing in terms of size and number of cells. In this group, the average island of langerhans was obtained from samples of 10951,67  $\mu\text{m}$

Description: a) the longest radius with a value of 107.48  $\mu\text{m}$ ; b) the shortest radius with a value of 75.39  $\mu\text{m}$

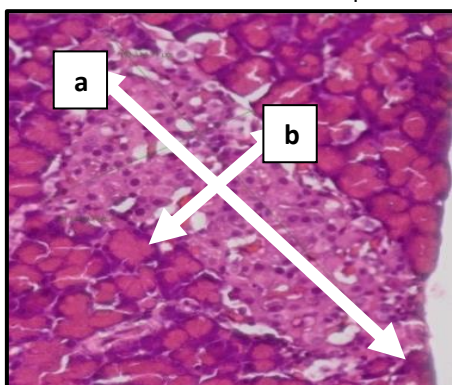


Figure of (Magnification 400x with HE Painting) Island langerhans pancreas on Group Treatment Vitamin A dose 150 (VAP150). The morphology of the langerhans island appears to be changing in terms of size and number of cells. In this group obtained the value of the longest radius of 233.98  $\mu\text{m}$  and the shortest radius of 101.89  $\mu\text{m}$  so that the average island of langerhans is obtained from the sample preparation of 17852.03  $\mu\text{m}$

Description: a) the longest radius with a value of 233.98  $\mu\text{m}$ ; b) the shortest radius with a value of 101.89  $\mu\text{m}$

Field size data from langerhans island were calculated using elliptical area formula because most of the islands of langerhans shape observed were elliptical in shape. By calculating the product of the constellation  $\pi$  (Pi) with the minor (shortest) radius and the major (longest) radius. Here is the average island area of langerhans that has been calculated in each group:

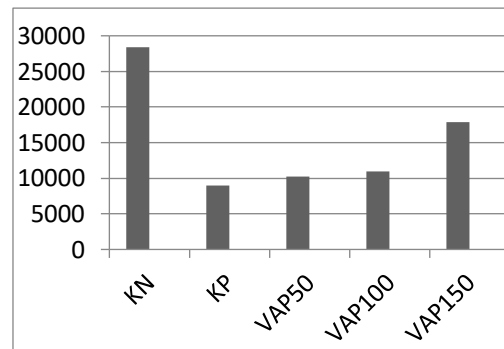


Figure Average Area of Langerhans Island Pancreas in each group

The table above shows that the KN (Negative Control DM) group has the largest mean value of the island of langerhans while the KP (DM Positive Control) group has the smallest pancreatic langerhans island width among the groups. In addition, the VAP50 group (vitamin A doses of 50) gave the smallest change in the smallest islet island whereas the VAP150 group (vitamin A dose 150) was the highest in providing wide-ranging island langerhans. In the vitamin A treatment group, the mean value of the area was proportional to the large dose of vitamin A given. Referring to the table can be interpreted that larger doses affect the larger island langerhans larger changes as well. So from the table it can be concluded that from the treatment that has been given, vitamin A dose 150

is the most optimal dose to improve the island of langerhans in pancreas mice that have been induced into a model of type 2 diabetes. Data analysis

Normality of data distribution was analyzed using Saphiro wilk test because the amount of data is less than fifty. The results of the Normality Test vary from the range of 0.212 to 0.785. However, it can be concluded that the data obtained normal tedistribusi on each group because  $p > 0,05$ .

To test whether the distribution of data is homogeneous or not used lavene test. In this step we get a significance value of 0.390. This value means that the data obtained homogeneous or with other sentences in the absence of variants between groups of data because  $p > 0.05$

In conducting the one way anova test, the conditions that must be met are normal and homogeneous distributed data. The purpose of this test is to determine whether there are differences among all treatment groups. The results of one way anova test itself on the wide island of pancreas langerhans gave a signification result of 0.001. From this value, it can be concluded that there is a difference between the treatment groups that are bandied because the p value  $< 0.05$ .

The final step in the Post Hoc test using the Tukey function was found that there was no significant difference in the langerhans island area between the positive control group and the VAP50 group and the VAP 100 group. However, there was a significant difference between the VAP150 group and the KN which meant vitamin A dose 150 had an effect improving the area of langerhans island which is increasingly approaching the KN group

## DISCUSSION

The Influence of Vitamin A Provision on the Area of Langerhans Island Pancreas In Rats (Rattus Norvegicus) Male Wistar Blood Model Diabetes Mellitus Type 2

In this study, the treatment given to mice that have been modified to Diabetes Mellitus model in the

form of vitamin A in various doses, among others 50 mg (VAP 50), 100 mg (VAP 100), and 150 mg (VAP 150). Histologic observation by HE painting, showed the langerhans island morphology under normal / healthy conditions in the KN group. This normal condition can be assessed from a group of round or oval cells, with cells whose cytoplasm is granulated. In this group of KP it also appears that its constituent composite cells are in harmony with the research results of Kinkar Shobha B et al, 2016. For the mean of langerhans islands in this group occupies the highest values among other groups.

Meanwhile, in the KP group, the morphological changes of the langerhans island in the form of degeneration of the constituent cells, the widening of the lumen, the dilatation of the intercalatus ducts, and the outline of the langerhans island appear irregular. Kinkar Shobha B et al., 2016 also stated in his research that in the langerhans island group in mice that have been modified to Diabetes model (through alloxan induction) showed a decrease in the density of langerhans cells significantly in the form of the amount of empty space between cells. The empty space formed is the result of the apoptotic process of beta cells. The mechanism of cell apoptosis itself begins because of a large stressor of chronic hyperglycemia process. Glucose in excessive eniamol form undergoes an autocesion and undergoes a metallic transition reaction. Anion enadiol formed from the reaction will be converted to reactive ketoaldehyde and the end result is a superoxide radical. Superooksida will generally be degraded to hydrogen peroxide. However, if the amount of non-enzymatic antioxidants (catalase, glutathione peroxidase) in the body slightly then superoxide will then be converted into hydroxyl ions. This is what causes high levels of free radicals in the body of patients with diabetes mellitus type 2.

In addition, excess glucose can increase the production of AGEs. AGEs products when interacting with RAGEs will deactivate antioxidant enzymes, increase free radical production and suppress work. High levels of free radicals in cells make AGEs activate the NF-kB transcription factor which furthermore NF-kB will also increase NO

production. NO is the cause of damage to beta cells langerhans island.

Prolonged hyperglycaemia increases the rate of cell apoptosis through increased apoptotic protein expression of caspase-3 and decreased antiapoptosis protein bcl-2 (Cerillio and Testa, 2009). Apoptosis of beta cells can also be induced through overproduction of superoxide free radicals (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) produced in mitochondria. High levels of free radicals Superoxide free radicals will trigger proinflammatory cytokines such as Nf-kB to produce NO. NO will then react with (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) to produce the peroxyrite ions that affect cell DNA damage so apotheism occurs.

In the treatment group of Vitamin A various doses, an increase in the mean island area of langerhans was compared with the KP group. Of the three types of treatment, the VAP 150 group gave the largest increase in the largest area of the largest langerhans island. This result can be explained by the results of Helmut Sies et al. Study that vitamin A (and its derivatives) can deactivate or prevent superoxide being formed. Vitamin A is considered to be a free radical scavenger (Maritim et al 2002) by reducing the production of intracellular free radicals that will have implications for the decrease in cell peroxidase (Sies, 2000) so that cell apoptosis can be avoided.

In this study the VAP150 group that became the group with the highest dosage of vitamin A could not reach the wide island langerhans approaching the KN group. This can be influenced by several factors such as vitamin A doses that are not yet or inadequate in providing therapeutic effects of regenerating the island langerhans. Based on vitamin A supplementation management guidelines in 2009, the doses administered as a body supplement range from 100,000 to 200,000 IU. Large doses are intended for infants, toddlers, pregnant women, and postpartum mothers to prevent vitamin A deficiency. Dosing factor is important because overkonsumsi vitamin A can cause many side effects such as one of them is toxicity in bone. However, in this study, vitamin A felt not yet mencapai optimal dose to menimbulkan

therapeutic effects. So further research is needed on increasing the dosage of vitamin A to get the mean value

### **The Correlation of Vitamin A doses Provision with Pancreatic Langerhans Island Wide**

Statistically vitamin A has an influence on the wide island of pancreatic langerhans. From the analysis it was concluded that the correlation between various doses of vitamin A with wide island langerhans has a strong correlation relationship. That is, the provision of vitamin A therapy does affect signifikan in improving the island of langerhans pancreas. In addition, the correlation between the dose of vitamin A with the island of Langerhans is positive. The higher the dose given the greater the area of langerhans island.

Increasing the area of the langerhans island that is directly proportional to the increased dose of vitamin A given can be explained through two cellular mechanisms. The first mechanism, namely the effect of vitamin A work as an antioxidant in inhibiting the formation and as a scavenger ROS. In addition, vitamin A also plays a role to inhibit the activation of other glucose metabolism pathways such as sorbitol and hexamine polyols and suppress the formation of PKC, AGEs, and AGEs receptors (RAGEs) (Kowluru, 2015). If metabolic pathways and metabolism products successfully inhibited it will automatically also inhibit apoptosis process so that langerhans island cells that are damaged can be prevented.

The process of elimination of ROS formed by vitamin A itself can be understood through several chemical reactions such as: the formation of new compounds (the reaction between free radicals with vitamin A); electron transfer; and hydrogen abstraction in free radical compounds (Krinsky and Johnson, 2005)

A second mechanism that could explain the role of vitamin A in increasing the area of the langerhans island is the ability of vitamin A to propagate the proliferation of cells. from the theory that when Retinoic acid (the metabolite of retinol) binds to its ligand in the cell nucleus, whether RAR or RXR,

this bond will lead to dissociation of the corepressor and recruitment of coactivator proteins in cells, thus promoting the occurrence of histone acetylation and mRNA transplank activation. The activation of this transcription process will further initiate the process of proliferation of cells within the langerhans island (Yadley and Malafa, 2015)

#### Optimal Dosage of Vitamin A In Wide Improvement of Langerhans Island Pancreas In Rats (Rattus Norvegicus) Wistar Male Destruction Model Diabetes Mellitus Type 2

In this study the optimal dose that can be achieved is a dose of 150mg / kgBW. At a dose of vitamin A of 150mg / KgBB or 150,000 IU, the largest island of Langerhans was found to be the largest among other vitamin A doses. However, the dose of vitamin A 150mg / KgBB has not been able to provide a wide change of langerhans island approaching the KN group. This means that a higher dose of vitamin A is considered to provide better results as well as changes in the area of the island langerhans as in the group of normal mice without induced into Diabetes Mellitus type 2.

#### **KESIMPULAN**

The conclusion of this study is the provision of vitamin A has an effect on the wide improvement of island langerhans pancreas Diabetes Mellitus model.

#### **SUGGESTION**

Further research is needed on the effect of extensive island langerhans from Type 2 Diabetes Mellitus models with higher doses of vitamin A and / or longer treatment time with the number of research samples meeting minimum research standards.