

**PROFIL SEL β PULAU LANGERHANS JARINGAN
PANKREAS TIKUS DIABETES MELLITUS YANG DIBERI
*VIRGIN COCONUT OIL (VCO)***

AMILIA DAYATRI URAY



**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

2009

Halaman ini merupakan bagian dari dokumen yang diterbitkan oleh IPB University. Untuk informasi lebih lanjut, silakan kunjungi website IPB University di www.ipb.ac.id.
1. Diizinkan untuk digunakan sebagai referensi.
2. Diperbolehkan untuk digunakan sebagai referensi dengan syarat harus mencantumkan nama IPB University.

ABSTRACT

AMILIA DAYATRI URAY. The Profile of Beta Cells on The Islets of Langerhans Pancreatic Tissue of Diabetes Mellitus Rats Treated by *Virgin Coconut Oil* (VCO) . Under the supervision of DRH. TUTIK WRESDIYATI, Ph.D

The aim of this research is to evaluate the effect of virgin coconut oil on the number of beta cells and the islets of Langerhans in the pancreatic tissue of diabetic rats. A total of 25 white male rats (Rattus norvegicus), Sprague Dawley were used for this study. These rats were divided into 5 groups; (1) Negative control (group K-), (2) Positive control (group K+, diabetic rats which was orally treated with aquadest 5 ml),(3) Diabetes mellitus group which was orally treated with VCO A 5 ml (VA), (4) Diabetes mellitus group which was orally treated with VCO B 5 ml (VB), (5) Diabetes mellitus which was orally treated with coconut oil 5 ml (MG). The rats of all group was injected by alloxan (IP, 110 mg/kgBW) to get diabetic condition, except for the negative control. Treatments were done for 28 days. The pancreas tissues were obtained at the end of the treatment and processed using paraffin embedding methods. The tissues were stained with Hematoxillin-Eosin for morphological study and analysis of the number of Langerhans islets, as well as immunohistochemical staining for beta cells analysis. The pancreatic tissues of positive control group showed the number of degenerating and necrotizing cells higher than that of VA and VB group. The number of the islets of Langerhans on the groups of VA, VB and MG were not significantly different compared to that of positive control group. However, the number of beta cells of VA group (22.78 ± 7.08^b) and VB group (18.89 ± 8.27^b) were significantly higher ($p < 0.05$) than that of positive control group (10.11 ± 6.95^a). This study showed that VCO treatment inhibit the rate of pancreatic β cells damage.

Keywords : *Virgin coconut oil, diabetes mellitus, beta cells, islets of Langerhans, rats*

RINGKASAN

AMILIA DAYATRI URAY. Profil sel β Pulau Langerhans Pada Tikus Diabetes Mellitus yang Diberi *Virgin Coconut Oil* (VCO). Dibimbing oleh DRH. TUTIK WRESDIYATI, Ph.D.

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh pemberian minyak kelapa murni atau *virgin coconut oil* (VCO) terhadap jumlah sel beta dan pulau Langerhans pada jaringan pankreas tikus. Sebanyak 25 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* digunakan dalam penelitian ini. Tikus dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu (1) Kontrol negatif (K-), (2) Kontrol positif (K+, tikus diabetes mellitus dan dicekok aquadest 5 ml), (3) Kelompok tikus diabetes mellitus dan dicekok VCO A (VA) sebanyak 5 ml, (4) Kelompok tikus yang dicekok VCO B (VB) sebanyak 5 ml, (5) Kelompok tikus diabetes mellitus dan dicekok minyak goreng (MG) sebanyak 5 ml. Semua kelompok perlakuan diinduksi alloxan dengan dosis 110 mg/kgBB (IP) untuk mendapatkan kondisi diabetes mellitus kecuali pada kelompok kontrol negatif (K-). Perlakuan diberikan selama 28 hari. Organ pankreas disampling di akhir perlakuan kemudian diproses dengan metode embedding parafin. Potongan jaringan diwarnai dengan *Hematoxylin-Eosin* (HE) terhadap morfologi umum pankreas dan jumlah pulau Langerhans serta pewarnaan imunohistokimia terhadap sel β pada pulau Langerhans. Jaringan pankreas kelompok perlakuan K+ dan MG memiliki jumlah sel yang mengalami degenerasi dan nekrosa lebih banyak bila dibandingkan dengan jaringan pankreas kelompok perlakuan VA dan VB. Jumlah pulau Langerhans pada kelompok perlakuan VA, VB, dan MG menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata dengan kontrol positif. Sedangkan jumlah sel β kelompok perlakuan VA (22.78 ± 7.08^b) dan VB (18.89 ± 8.27^b) lebih tinggi secara nyata ($p < 0.05$) dibandingkan jumlah sel β pada kelompok kontrol positif (10.11 ± 6.95^a). Penelitian ini membuktikan bahwa VCO mampu menghambat laju kerusakan sel β jaringan pankreas tikus diabetes mellitus.

Kata kunci : *Virgin coconut oil*, diabetes mellitus, sel β pankreas, pulau Langerhans, tikus putih

**PROFIL SEL β PULAU LANGERHANS JARINGAN
PANKREAS TIKUS DIABETES MELLITUS YANG DIBERI
*VIRGIN COCONUT OIL (VCO)***

AMILIA DAYATRI URAY

Skripsi

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan pada
Fakultas Kedokteran Hewan**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2009**

Misi Cipta, Jalinan, dan Unggul
1. Diutamakan sebagai salah satu pilar dalam pencapaian visi dan misi serta terwujudnya
4. Berprestasi tinggi untuk kemajuan bangsa dan dunia, serta meningkatkan kualitas, kuantitas, dan efisiensi
5. Berprestasi tinggi untuk kemajuan bangsa dan dunia, serta meningkatkan kualitas, kuantitas, dan efisiensi
2. Diutamakan mengutamakan dan meningkatkan kualitas, kuantitas, dan efisiensi

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Jakarta pada tanggal 22 Mei 1986 dari ayah Ali Hanafiah dan ibu Tien Martinah. Penulis merupakan anak ketiga dari tiga bersaudara.

Tahun 2004 penulis lulus dari SMU Negeri 82 Jakarta dan pada tahun yang sama lulus seleksi masuk IPB melalui jalur Seleksi Penerimaan Mahasiswa Baru. Penulis memilih program studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan.

Selama mengikuti perkuliahan, penulis aktif menjadi Pengurus Divisi Hewan Kecil Himpunan Minat Profesi (Himpro) HKSA 2005-2006.

Hikmah Penerbitan: Unsur-unsur yang
1. Diambil sebagai bagian dari karya tulis yang memuat dan memuat unsur-unsur:
a. Pengantar (pembuka) untuk memberikan gambaran umum, latar belakang, permasalahan, dan tujuan dari karya tulis.
b. Pembahasan (isi) yang memuat isi dari karya tulis yang ditulis dan ditulis dengan tujuan untuk memberikan informasi dan pengetahuan yang akurat dan benar.
2. Diambil sebagai bagian dari karya tulis yang memuat dan memuat unsur-unsur:
a. Pembahasan (isi) yang memuat isi dari karya tulis yang ditulis dan ditulis dengan tujuan untuk memberikan informasi dan pengetahuan yang akurat dan benar.
b. Kesimpulan (penutup) yang memuat kesimpulan dari karya tulis yang ditulis dan ditulis dengan tujuan untuk memberikan informasi dan pengetahuan yang akurat dan benar.

LEMBAR PENGESAHAN

Judul Skripsi : **Profil Sel β Pulau Langerhans Jaringan Pankreas Tikus Diabetes Mellitus yang Diberi *Virgin Coconut Oil* (VCO)**
Nama Mahasiswa : **AMILIA DAYATRI URAY**
Nomor Pokok : **B04104150**

Menyetujui,

Pembimbing 1

drh. Tutik Wresdiyati, Ph. D
NIP. 131878930

Mengetahui,
Wakil Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Institut Pertanian Bogor

Dr. Nastiti Kusumorini
NIP. 131669942

Tanggal Lulus :

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang selalu melimpahkan rahmat, kemudahan, dan tuntunanNya sehingga kegiatan penelitian ini dapat terlaksana dan dilaporkan dalam suatu tulisan dengan judul “ Profil sel β Pulau Langerhans Jaringan Pankreas Tikus Diabetes Mellitus yang Diberi *Virgin Coconut Oil* (VCO) “.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. drh. Tutik Wresdiyati, Ph.D, sebagai dosen pembimbing I yang telah membimbing, memberi banyak masukan dan kemudahan, serta mengajarkan hal-hal baru dengan penuh kesabaran dan pengertian selama penelitian dan penulisan skripsi.
2. Bpk. Dadang Supriatna atas bantuan, kerjasama, dan masukan selama penelitian berlangsung.
3. Dr.drh. Sri Murtini, M.Si selaku pembimbing akademik yang telah memberikan semangat dan dukungan pada penulis.
4. Rekan penelitian Novi dan Serina atas kerjasama, semangat, dan kebersamaan selama penelitian ini.
5. Ibu Nisa, Ibu Yuspi, dan Ibu Sussi yang telah banyak membantu pada saat penelitian.
6. Keluarga (Ayahanda, Ibunda, kakak-kakak, dan keponakan tercinta), yang telah memberikan semangat dan doa selama penelitian.
7. A. Farouq Nurrisal yang selalu setia menemani dalam suka dan duka selama penelitian dan penulisan skripsi.
8. drh. Adi dan drh. Ketut untuk keramahan selama peneliti berada di laboratorium Histologi, FKH.
9. Pak Maman yang telah ikut membantu peneliti selama berada di laboratorium Histologi.
10. Teman-teman terbaik (Oki, Adit, Heryu, Jaylow, Kelly, Joker, Bonino) yang ikut membantu dan semua pihak yang memberikan kemudahan selama penelitian dan tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa kesempurnaan semata-mata hanya dimiliki oleh Allah SWT, maka penulis memohon maaf bila terdapat kesalahan di dalam penulisan. Semoga apa yang ada dalam tulisan ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Bogor, November 2008

Amilia Dayatri Uray

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Pankreas	4
B. Insulin	5
C. Diabetes Mellitus	5
D. Alloxan	7
E. <i>Virgin Coconut Oil</i>	8
BAB III. BAHAN DAN METODE	10
A. Tempat dan Waktu Penelitian	10
B. Bahan dan Alat	10
C. Metode	10
C.1. Pembuatan Tikus Diabetes Mellitus	11
C.2. Pengambilan Sampel Organ	11
C.3. Dehidrasi dan Penjernihan	12
C.4. Penanaman Jaringan dalam Parafin (<i>Embedding</i>)	12
C.5. Pemotongan (<i>Sectioning</i>)	13
C.6. Pewarnaan	14
1. Hematoksin-Eosin.....	14
2. Immunohistokimia	15
C.7. Pengamatan dan Analisa Data	16
BAB IV. HASIL	17
A. Morfologi umum	17
B. Profil Sel β	18
BAB V. PEMBAHASAN	22
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	27
DAFTAR PUSTAKA	28

Has Cipta Pionir IPB University
 1. Diambil sebagai bagian dari buku ini
 2. Diperoleh dengan izin dari IPB University

DAFTAR TABEL

1. Hasil uji statistik terhadap jumlah pulau Langerhans	17
2. Hasil uji statistik terhadap jumlah sel beta	19

Hak Cipta: Peminatan/Unit yang bersangkutan
1. Diizinkan mengutip sebagian atau seluruhnya secara bebas untuk keperluan pendidikan dan penelitian
2. Diperbolehkan untuk mengutip sebagian atau seluruhnya untuk keperluan penelitian dan pengajaran
3. Diperbolehkan untuk mengutip sebagian atau seluruhnya untuk keperluan penelitian dan pengajaran
4. Diperbolehkan untuk mengutip sebagian atau seluruhnya untuk keperluan penelitian dan pengajaran
5. Diperbolehkan untuk mengutip sebagian atau seluruhnya untuk keperluan penelitian dan pengajaran
6. Diperbolehkan untuk mengutip sebagian atau seluruhnya untuk keperluan penelitian dan pengajaran
7. Diperbolehkan untuk mengutip sebagian atau seluruhnya untuk keperluan penelitian dan pengajaran
8. Diperbolehkan untuk mengutip sebagian atau seluruhnya untuk keperluan penelitian dan pengajaran
9. Diperbolehkan untuk mengutip sebagian atau seluruhnya untuk keperluan penelitian dan pengajaran
10. Diperbolehkan untuk mengutip sebagian atau seluruhnya untuk keperluan penelitian dan pengajaran

DAFTAR GAMBAR

1. Fotomikrograf hasil pewarnaan Hematoksin Eosin	20
2. Fotomikrograf hasil pewarnaan Immunohistokimia	21

Hak Cipta Peminatan/ Universitas
1. Dilindungi sebagai hak cipta oleh Departemen Hukum dan Peradilan
2. Pengutipan harus mencantumkan sumber
3. Pengutipan hanya untuk keperluan pendidikan, penelitian, dan ilmu pengetahuan, dan wajib mencantumkan sumber
4. Pengutipan tidak diperbolehkan untuk tujuan komersial
5. Dilarang mengutip dan menyalin sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University

LAMPIRAN

1. Prosedur pewarnaan Hematoksilin Eosin 31

2. Prosedur pewarnaan Immunohistokimia terhadap sel beta 32

3. Hasil Penghitungan Jumlah Pulau Langerhans pada Jaringan Pankreas Tikus Perlakuan..... 34

4. Hasil Penghitungan Jumlah Sel Beta pada Pulau Langerhans Jaringan Pankreas Tikus Perlakuan 35

5. Analisis Sidik Ragam (ANOVA) dengan Uji Lanjutan Duncan terhadap Jumlah Pulau Langerhans pada Jaringan Pankreas Tikus Perlakuan 36

6. Analisis Sidik Ragam (ANOVA) dengan Uji Lanjutan Duncan terhadap Jumlah Sel Beta pada Jaringan Pankreas Tikus Perlakuan 37

Hak Cipta Pendaftar: Universitas Indonesia
1. Dilindungi sebagai hak cipta oleh Undang-Undang No. 19 tahun 2002 tentang Hak Cipta dan Perundang-undangan lainnya.
2. Pengalihan, penyalinan, atau bentuk lain yang sejenis, tanpa izin pendaftar, dilarang.
3. Pengalihan, penyalinan, atau bentuk lain yang sejenis, tanpa izin pendaftar, dilarang.
4. Pengalihan, penyalinan, atau bentuk lain yang sejenis, tanpa izin pendaftar, dilarang.
5. Pengalihan, penyalinan, atau bentuk lain yang sejenis, tanpa izin pendaftar, dilarang.
6. Pengalihan, penyalinan, atau bentuk lain yang sejenis, tanpa izin pendaftar, dilarang.
7. Pengalihan, penyalinan, atau bentuk lain yang sejenis, tanpa izin pendaftar, dilarang.
8. Pengalihan, penyalinan, atau bentuk lain yang sejenis, tanpa izin pendaftar, dilarang.
9. Pengalihan, penyalinan, atau bentuk lain yang sejenis, tanpa izin pendaftar, dilarang.
10. Pengalihan, penyalinan, atau bentuk lain yang sejenis, tanpa izin pendaftar, dilarang.

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Diabetes mellitus merupakan penyakit yang tidak asing lagi bagi dunia kedokteran. Penyakit ini selalu menjadi perhatian bagi para peneliti mengenai bagaimana mekanisme dan pengendaliannya. Secara umum, ada dua tipe diabetes, yaitu diabetes mellitus tipe I (*Insulin Dependent Diabetes Mellitus*), merupakan penyakit autoimun yang dipengaruhi oleh faktor genetik yang seringkali terjadi pada anak-anak, dan diabetes mellitus tipe II (*Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus*), biasanya timbul pada penderita dengan usia di atas 40 tahun disertai dengan kegemukan (Adeghate & Ponery 2004). Ada tiga penyebab terjadinya diabetes, yang pertama yaitu jumlah sekresi hormon insulin berkurang, sehingga tidak mampu mengambil glukosa dari sirkulasi darah dan tidak mampu mengontrol kadar glukosa sehingga kadar glukosa tetap tinggi dan terbuang melalui urin. Penyebab yang kedua adalah resistensi insulin, jumlah insulin cukup tetapi insulin tersebut tidak sensitif lagi sehingga tidak mampu bekerja secara optimal dan glukosa tidak dapat masuk ke dalam sel yang mengakibatkan penggunaan glukosa sebagai energi terhambat sehingga menyebabkan kekurangan energi pada sel. Hal seperti itu kemudian akan menimbulkan respon tubuh untuk mencari energi dari sumber lain seperti *glikogenolisis* dan *glukoneogenesis* sehingga dapat dihasilkan produk sampingan berupa radikal bebas yang berbahaya bagi sel-sel didalam tubuh. Diabetes mellitus juga dapat terjadi akibat kombinasi dari kedua penyebab tersebut (McClung *et al.* 2004).

Gejala umum yang sering dialami oleh penderita adalah banyak makan, berat badan turun, dan badan lemah. Komplikasi yang dapat timbul akibat diabetes meliitus diantaranya adalah gangguan pembuluh darah besar (makroangiopati), atherosklerosis, infark miokardium, diabetes retinopati, diabetes neuropati, dan diabetes nefropati (Price & Loraine 1997). Komplikasi pada anggota gerak penderita diabetes mellitus akan mempengaruhi kualitas hidup mereka karena berisiko menyebabkan kecacatan permanen, bahkan kematian. Hal inilah yang seringkali terlambat disadari oleh penderita. Menurut situs resmi

World Health Organization (WHO), di seluruh dunia setiap 30 detik terdapat satu kaki penderita kencing manis yang diamputasi. Tanpa amputasi, diperkirakan sekitar 4 persen pengidap diabetes berakhir pada kematian. Faktor-faktor yang dapat memicu terjadinya diabetes adalah merokok, peningkatan level kolesterol dalam tubuh, kegemukan, tingginya kadar glukosa darah, dan kurang olahraga (Sandberg & Phillip, 2008). Menurut WHO, pada tahun 2000 penderita diabetes mellitus sudah mencapai angka 171 juta orang dan pada tahun 2030 diperkirakan jumlahnya akan meningkat dua kali.

Pengendalian yang biasa dilakukan oleh penderita diabetes mellitus adalah dengan menginjeksikan insulin dari luar agar kadar glukosa dalam darah tetap terkontrol. Insulin merupakan suatu hormon yang dihasilkan oleh sel β di dalam pulau Langerhans dan berperan atas kontrol glukosa darah. Kerja insulin pada penderita diabetes mellitus tidak optimal, maka dari itu dibutuhkan penelitian mengenai kerja sel β di dalam pulau Langerhans dan bagaimana upaya yang dilakukan untuk memperbaiki kerja sel β tersebut dalam menghasilkan insulin. Masih banyak penelitian yang dilakukan dalam upaya mencari pengendalian terhadap diabetes mellitus, diantaranya adalah dengan meneliti bahan – bahan tradisional yang dipercaya berkhasiat menyembuhkan beragam penyakit termasuk diabetes.

Virgin coconut oil (VCO) adalah produk olahan kelapa yang belakangan ini populer dan banyak dikonsumsi oleh berbagai kalangan masyarakat karena dipercaya baik untuk kesehatan. VCO merupakan alternatif pengolahan daging buah kelapa yang sangat berprospek dibandingkan diolah menjadi minyak goreng. VCO di pasaran dalam dan bahkan luar negeri mempunyai nilai jual 10 – 20 kali lipat dari harga jual minyak kelapa. Harga jual yang menarik ini disebabkan banyaknya nilai guna VCO buat kehidupan manusia, misalnya untuk kesehatan tubuh dan industri kosmetika. Namun, belum ada laporan ilmiah tentang khasiat VCO untuk penderita diabetes mellitus sehingga perlu dilakukan kajian ilmiah untuk mempelajari khasiat VCO terhadap penderita diabetes mellitus, terutama pada pengendalian kadar glukosa darah dan penghambatan laju kerusakan sel β pulau Langerhans jaringan pankreas melalui teknik immunohistokimia.

Tujuan

Penelitian ini dilakukan untuk :

1. Mempelajari perubahan morfologi umum jaringan pankreas tikus diabetes mellitus yang diberi VCO.
2. Menghitung jumlah sel β dan pulau Langerhans jaringan pankreas tikus diabetes mellitus yang diberi VCO.

TINJAUAN PUSTAKA

Pankreas

Pankreas terletak pada rongga abdomen, memiliki permukaan yang membentuk lobulasi, berwarna putih keabuan hingga kemerahan (Frandsen 1992). Organ ini merupakan kelenjar majemuk yang terdiri atas jaringan eksokrin yang menghasilkan enzim – enzim pankreas (amylase, peptidase, dan lipase), dan jaringan endokrin yang menghasilkan hormon – hormon (insulin, glukagon, dan somatostatin).

Fungsi endokrin pankreas terdapat pada sekelompok sel yang ditemukan oleh Langerhans di tahun 1869, sehingga sekelompok sel tersebut dinamakan sebagai pulau Langerhans. Pada tikus dewasa, pankreas berisi kira-kira 1-2% pulau-pulau Langerhans dengan diameter antara 100-200 μm (Boorman & Beth 1999). Ada lima tipe sel yang ditemukan di pulau Langerhans tikus, masing-masing memiliki kemampuan sekresi hormon yang berbeda-beda, yaitu:

1. Sel alpha, yaitu sel yang menghasilkan hormon glukagon. Sel ini merupakan sel terbanyak kedua yang ditemukan di pulau Langerhans setelah sel beta (20%)
2. Sel beta, yaitu sel yang menghasilkan hormon insulin. Sel β terletak di dalam pulau Langerhans dan memenuhi sekitar 80% dari volume pulau Langerhans.
3. Sel delta, sel ini menghasilkan somatostatin
4. Sel F, sel ini menghasilkan *pancreatic polypeptide* yang belum diketahui jelas fungsinya
5. Sel Gamma

Pada penderita diabetes mellitus tipe I ditemukan perubahan-perubahan pada pankreas berupa pengecilan ukuran dari pankreas, atrofi pada bagian eksokrin pankreas, dan atrofi sel-sel asinar di sekitar pulau Langerhans yang mengalami degenerasi. Sedangkan pada diabetes mellitus tipe II yang terjadi adalah ketidakseimbangan dari sekresi eksokrin pankreas dan gangguan kontrol glukosa darah (Sandberg & Philip 2008).

Insulin

Insulin merupakan hormon yang berperan penting dalam mekanisme penyakit diabetes mellitus dan memiliki peran secara langsung maupun tidak langsung dalam proses biokimia di dalam tubuh. Insulin adalah hormon yang dihasilkan oleh sel β pada pulau Langerhans di pankreas. Kerja utama dari hormon ini adalah meningkatkan pengambilan glukosa darah ke dalam jaringan dan disimpan sebagai glikogen atau lipid (Squires 2003).

Insulin merupakan hormon anabolik yang menjaga agar tidak terjadi hiperglikemia sewaktu terjadi proses pemasukan glukosa atau pada saat terlalu banyak makan karena jumlah glukosa dalam darah merangsang sekresi insulin oleh sel β pada pulau Langerhans pankreas. Pembentukan awal insulin terjadi akibat rangsangan glukosa pada ribosom retikulum endoplasmik kemudian menyebabkan translasi dan transkripsi mRNA menjadi proinsulin. Proinsulin bergerak menuju apparatus golgi kemudian diubah menjadi insulin dan C-peptide yang dibungkus dalam granula sitoplasma. Granula – granula insulin tersebut tetap disimpan pada sel beta sampai waktunya dibutuhkan. Keberadaan asam lemak dapat mempengaruhi insulin. Asam lemak memiliki efek menghambat atau merangsang sekresi insulin. Hal tersebut menegaskan bahwa asam lemak memiliki peran penting terhadap homeostasis glukosa dalam mekanisme pelepasan insulin (Gravena *et al.* 2002).

Reece (2005) menyatakan bahwa prinsip kerja utama dari insulin pada metabolisme karbohidrat di jaringan yang sensitif terhadap insulin adalah menyelenggarakan proses transportasi glukosa ke dalam membran sel. Pada hati, insulin meningkatkan pengambilan glukosa dengan merangsang enzim-enzim di sel hati yang membantu produksi glikogen dan lipogenesis serta menghambat enzim-enzim yang mempercepat terjadinya glikogenolisis.

Diabetes mellitus

Diabetes mellitus merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh ketidakseimbangan kadar glukosa darah karena terjadi penurunan kadar hormon insulin. Ada tiga tipe penyebab terjadinya diabetes, yang pertama yaitu jumlah sekresi hormon insulin berkurang, sehingga tidak mampu mengambil glukosa dari

sirkulasi darah dan tidak mampu mengontrol kadar glukosa sehingga kadar glukosa tetap tinggi dan terbuang melalui urin. Penyebab kedua adalah resistensi insulin, jumlah insulin cukup tetapi insulin tersebut tidak sensitif lagi sehingga tidak mampu bekerja secara optimal dan glukosa tidak dapat masuk ke dalam sel yang mengakibatkan penggunaan glukosa sebagai energi terhambat sehingga menyebabkan kekurangan energi pada sel. Hal seperti itu kemudian akan menimbulkan respon tubuh untuk mencari energi dari sumber lain seperti *glikogenolisis* dan *glukoneogenesis*. Diabetes mellitus juga dapat terjadi akibat kombinasi dari kedua penyebab tersebut (McClung *et al.* 2004). Gejala umum yang sering dialami oleh penderita adalah banyak makan, berat badan turun, dan badan lemah.

Diabetes mellitus memiliki dua tipe, yaitu :

a. Diabetes mellitus tipe I

Tipe I adalah penyakit diabetes yang tergantung pada insulin, merupakan penyakit autoimun yang dipengaruhi oleh faktor genetik. Faktor pemicu yang diduga sebagai penyebab penyakit ini adalah infeksi virus yang menyebabkan berkurangnya sekresi insulin. Umumnya yang menderita penyakit ini masih muda dan gejalanya biasanya timbul pada saat kanak – kanak dan mencapai puncaknya pada usia dewasa. Penderita sangat tergantung pada insulin buatan yang harus disuntikkan karena sekresi insulin dalam tubuhnya sangat terbatas (Adeghate & Ponery 2004).

b. Diabetes mellitus tipe II

Penyakit diabetes tipe ini ditandai oleh resistensi insulin dan gangguan sekresi insulin, biasanya timbul pada penderita dengan usia diatas 40 tahun dan disertai dengan kegemukan. Pada keadaan diabetes mellitus tipe II, pankreas masih mampu untuk menghasilkan cukup insulin, tetapi insulin kurang bekerja optimal karena terjadi resistensi insulin akibat kegemukan. Kegemukan dan resistensi insulin memiliki korelasi yang tinggi terhadap gangguan metabolik (Takada 2008). Individu yang mengalami kegemukan, kandungan glukosa dalam darahnya tinggi. Hal ini diimbangi dengan peningkatan produksi insulin. Insulin yang diproduksi terus menerus akan mengakibatkan sel-sel tidak sensitif lagi dan akibatnya akan terjadi resistensi insulin. Diabetes mellitus tipe II ini disebabkan

oleh kerusakan fungsi membran sel akibat kehadiran dari asam lemak. Konsumsi asam lemak dalam jumlah sedikit dan dalam jangka waktu yang lama mengakibatkan resistensi insulin dan secara klinis meningkatkan resiko diabetes (Risérus 2006). Namun, sekresi insulin oleh asam lemak ternyata dipengaruhi oleh panjang rantai dari asam lemak tersebut. Semakin panjang rantai asam lemak maka semakin berat kerja tubuh untuk memetabolismenya. Dalam mengabsorpsi asam lemak rantai panjang ini dibutuhkan proses pemecahan terlebih dahulu sebelum dibawa oleh aliran darah menuju ke hati. Asam lemak kemudian dipecah menjadi molekul yang lebih sederhana yaitu lipoprotein yang mampu diabsorpsi oleh vili-vili usus. Setelah dibawa ke hati, lipoprotein itu akan dimetabolisme menjadi energi, lemak, dan kolesterol. Lemak dan kolesterol inilah yang akan meningkatkan resiko terjadinya diabetes yang dapat mengganggu fungsi kerja dari insulin (Carpentier *et al.* 2000).

Komplikasi yang dapat timbul akibat diabetes meliitus diantaranya adalah gangguan pembuluh darah besar (makroangiopati), atherosklerosis, infark miokardium, diabetes retinopati, diabetes neuropati, dan diabetes nefropati (Price & Loraine 1997). Meningkatnya kepeakaan penderita diabetes mellitus terhadap infeksi disebabkan oleh berbagai faktor. Pada umumnya efek hiperglikemia menyebabkan penderita diabetes mellitus lebih mudah terkena infeksi. Hal ini disebabkan karena hiperglikemia mengganggu fungsi neutrofil dan monosit (makrofag) dalam proses kemotaksis, perlengketan, dan fagositosis.

Alloxan

Zat kimia ini merupakan suatu zat yang diberikan untuk menghasilkan diabetes eksperimental pada berbagai vertebrata. Alloxan memberikan suatu cara yang cepat untuk memberikan hasil yang positif terhadap timbulnya diabetes (Walde *et al.* 2002).

Szkudelski (2001) mengemukakan bahwa alloxan merusak sel β pankreas melalui pembentukan spesies oksigen reaktif yang diawali oleh reduksi alloxan. Alloxan akan bereaksi dengan agen-agen pereduksi seperti sistein dan enzim-enzim yang bergugus SH-. Glukokinase merupakan enzim yang berperan penting atas sekresi insulin dan memiliki gugus SH-, maka alloxan memiliki afinitas yang

tinggi terhadap enzim glukokinase. Alloxan akan bereaksi dengan dua gugus SH- dari enzim glukokinase membentuk ikatan dimer dan menyebabkan inaktivasi enzim sehingga sekresi insulin terganggu dan terjadi kerusakan pada sel β dan kemudian timbul keadaan diabetes.

Virgin coconut oil (VCO)

Indonesia kaya akan tumbuhan kelapa. Sejak bertahun-tahun kelapa sering dimanfaatkan untuk berbagai keperluan salah satunya adalah untuk memasak. Saat ini, pemanfaatan kelapa lebih berkembang yaitu salah satunya dengan membuatnya menjadi minyak kelapa murni yang biasa disebut *virgin coconut oil* (VCO). Dalam pemanfaatannya, VCO dapat dikonsumsi secara langsung atau dipakai untuk memasak. Dengan struktur kimia yang tidak mengandung *double bond*, minyak ini bersifat tahan terhadap panas, cahaya, oksigen, dan tahan terhadap proses degradasi (Novarianto 2007). Hingga kini minyak kelapa murni ramai diperbincangkan karena khasiatnya bagi kesehatan. Para ahli pun mulai tertarik untuk meneliti kandungan VCO dan kaitannya dengan kesehatan manusia.

Menurut Situs Web Resmi Pusat Penelitian Kimia LPPI, *virgin coconut oil* adalah minyak kelapa yang diolah tanpa pemanasan atau dengan pemanasan terbatas, hingga minyak ini berwarna bening (jernih) dan beraroma khas kelapa. Sejak tahun 2000, VCO mulai mendapat perhatian lebih dari semua kalangan masyarakat baik oleh lembaga penelitian, praktisi, perguruan tinggi, maupun oleh masyarakat kalangan bawah. Hal ini diakibatkan oleh adanya kandungan-kandungan di dalam VCO yang berkhasiat untuk terapi kesehatan.

VCO memiliki kandungan asam laurat tinggi, yaitu sebuah lemak jenuh dengan jumlah karbon 12 (rantai karbon sedang) yang disebut *Medium Chain Fatty Acid* (MCFA). MCFA mudah diabsorpsi ke dalam sel lalu ke mitokondria, sehingga metabolisme meningkat maka sel-sel dapat bekerja lebih efisien membentuk sel-sel baru dan cepat mengganti sel-sel yang rusak dengan lebih cepat (Inggita *et al.* 2006).

Secara empiris, dilaporkan bahwa VCO memiliki khasiat terhadap penyakit diabetes melitus karena memiliki kandungan seperti asam laurat yang dapat menstimulir sekresi insulin di dalam pankreas. Efek pertama VCO dalam

membantu pencegahan komplikasi diabetes melitus adalah membantu memberi energi kepada sel tubuh terutama sel β (sebab minyak kelapa dapat dengan mudah diserap tanpa bantuan enzim) sehingga akan meningkatkan sekresi insulin dan penggunaan glukosa darah. Setelah masuk tubuh, VCO yang mengandung asam laurat dan asam kaprat ternyata mempunyai efek yang sangat potensial dalam menstimulir terjadinya sekresi insulin oleh sel-sel β (Garfinkel *et al.* 1992).

Penelitian yang dilakukan Nevin dan Rajamohan (2004) melaporkan juga bahwa VCO memiliki khasiat menurunkan kadar lipid dalam serum maupun jaringan serta menurunkan oksidasi LDL (*Low Density Lipoprotein*) yang berbahaya bagi tubuh, hal-hal tersebut disebabkan VCO memiliki kandungan polifenol yang aktif yang berperan sebagai antioksidan.

Selain memiliki khasiat untuk penyakit diabetes mellitus VCO juga berguna dalam mengatasi penyakit lain yang disebabkan oleh virus, jamur, bakteri ataupun protozoa seperti yang diungkapkan oleh Marry G. Enig, Ph.D., Direktur *Nutritional Sciences Division, Enig Association* Amerika Serikat bahwa hampir 50% dari asam lemak di dalam VCO merupakan asam laurat yang dapat dimetabolisme menjadi monolaurin di dalam tubuh manusia atau hewan. Monolaurin inilah yang menjadi antiviral, antibakteri, dan antiprotozoa yang dapat menghancurkan virus yang berlapis lipid seperti HIV, herpes, influenza, dan bermacam-macam bakteri patogen lainnya seperti *Listeria monocytogenes* dan *Heliobacter pylori*, serta protozoa seperti *Giardia lamblia* (Fife 2004).

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bersama Hewan Percobaan Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian dan SEAFast Center, Institut Pertanian Bogor, dan Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

Penelitian dilakukan mulai bulan Juli 2007 sampai dengan Juli 2008.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah minyak murni kelapa (VCO) yang dibuat menggunakan metode tanpa pemanasan yaitu VCO A dan minyak murni kelapa (VCO) yang dibuat menggunakan metode pemanasan yaitu VCO B, minyak goreng kelapa, tikus putih *Sprague Dawley* dengan berat tubuh 150-250 gram, alloxan, larutan Bouin, larutan dehidrasi (alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 95%, dan alkohol absolut), larutan perjernih (xylol), hematoksin, eosin, antibodi monoklonal insulin (Sigma I2018), PBS, diaminobenzidine, serum normal, H₂O₂, metanol, *Distiled Water* (DW), antibodi terkonjugasi, parafin, entelan (perekat), neofren.

Metode

Penelitian ini menggunakan tikus jantan putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* sejumlah 25 ekor dan dibagi menjadi lima kelompok, yaitu :

- (1) Kelompok K (-) atau kontrol negatif, tikus pada kelompok ini tidak diberi perlakuan apapun.
- (2) Kelompok K (+) atau kontrol positif, tikus pada kelompok ini disuntik alloxan dan dicekok aquadest 5 ml.
- (3) Kelompok VCO A, tikus pada kelompok ini disuntik alloxan dan dicekok VCO A 5 ml.
- (4) Kelompok VCO B, tikus pada kelompok ini disuntik alloxan dan dicekok VCO B 5 ml.

- (5) Kelompok minyak goreng kelapa, tikus pada kelompok ini disuntik alloxan dan dicekok minyak goreng kelapa 5 ml.

Seluruh tikus pada setiap kelompok diberi perlakuan selama 28 hari, dan pada akhir perlakuan kemudian dilakukan pengambilan sampel, fiksasi, dehidrasi, perjernihan (*clearing*), infiltrasi parafin, penanaman jaringan (*embedding*), pemotongan (*sectioning*), pewarnaan (*staining*), perlekatan sediaan (*mounting*), dan pembuatan fotomikograf.

Pembuatan Tikus Diabetes Mellitus

Tikus diabetes didapatkan dengan cara menginduksikan aloksan sampai tikus menderita keadaan hiperglikemia yaitu kadar glukosa darah >200 mg/dL. Sebelum diinduksi dengan aloksan, maka tikus harus dihitung bobot badannya untuk menghitung dosis aloksan dan dipuaskan selama semalam. Dosis aloksan yang digunakan adalah 110 mg/kg berat badan dan diinjeksikan secara intraperitoneal. Dua hari pasca injeksi, glukosa darah tikus dihitung dengan menggunakan glukometer dan bila kadar glukosa darah tikus diatas 200mg/dL, maka tikus dinyatakan menderita diabetes. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan setiap empat hari.

Pengambilan Sampel Organ

Sebelum dilakukan pembedahan dan pengambilan sampel organ, kadar glukosa diukur terlebih dahulu. Pengambilan sampel pankreas dilakukan setelah 28 hari perlakuan. Organ pankreas ini difiksasi dengan larutan Bouin yang dibuat *fresh* sebelum digunakan. Bahan-bahan yang digunakan dalam membuat larutan Bouin adalah larutan asam pikrat jenuh, formalin 40%, dan asam asetat glasial dengan perbandingan 15:5:1. Tikus dimatikan dengan cara *dislocasio cervicalis*. Setelah tikus mati, tubuh tikus disayat dan dibuka untuk kemudian diambil organ pankreasnya. Pengambilan sampel organ dilakukan secara hati-hati untuk menghindari kerusakan jaringan. Sampel organ langsung direndam dalam larutan Bouin yang telah diberi label kode tikus dan waktu perendaman. Sampel direndam dalam larutan Bouin selama 24 jam dan setelah itu diganti dengan larutan alkohol 70%. Sebelum masuk pada tahapan selanjutnya, organ pankreas

dipotong-potong kemudian dimasukkan kedalam *tissue cassette*, diberi label, dan dimasukkan kedalam alkohol 70% sebagai *stopping point*.

Dehidrasi dan Penjernihan

Pada tahapan ini dilakukan proses penarikan cairan jaringan dengan alkohol bertingkat dimulai dari memasukkan organ kedalam alkohol 80% selama 24 jam, kemudian alkohol 90% selama 24 jam, alkohol 95% selama 24 jam, alkohol absolut I selama 1 jam, alkohol absolut II selama 1 jam, dan alkohol absolut III selama 1 jam.

Setelah 1 jam berada dalam alkohol absolut III, dilanjutkan dengan proses penjernihan atau *clearing* dengan larutan xylol, yaitu proses menggantikan tempat etanol dalam jaringan. Dimulai dari memasukkan pankreas kedalam xylol I selama 1 jam, kemudian xylol II selama 1 jam, xylol III dengan suhu kamar selama 30 menit, dan dilanjutkan di dalam inkubator dengan suhu 37° selama 30 menit.

Penanaman Jaringan dalam Parafin (*Embedding*)

Setelah melalui proses dehidrasi dan penjernihan, dilakukan proses penanaman dalam parafin atau *embedding* untuk menggantikan kedudukan dehidran dan bahan penjernih. Tahapan ini dibagi menjadi tiga bagian yaitu infiltrasi parafin, penanaman jaringan, dan pembuatan blok jaringan. Proses pertama yang dilakukan adalah dengan memasukkan organ ke dalam parafin I selama 1 jam di dalam inkubator, kemudian dipindahkan ke parafin II selama 1 jam, dan terakhir ke dalam parafin III selama 1 jam dan tetap dilakukan di dalam inkubator.

Proses selanjutnya yang dilakukan adalah penanaman jaringan kedalam parafin menggunakan alat *Tissue Embedding Console*. Bahan yang digunakan dalam proses ini adalah parafin cair, gliserin, blok kayu, pinset, tutup pagoda, pemanas bunsen, dan spatula. Tahap pertama yaitu pengolesan tutup pagoda dengan gliserin dalam kondisi hangat diatas hotplate bersuhu 67°C, kemudian parafin cair dituangkan ke dalam tutup pagoda secara perlahan. Jaringan diletakkan ke dalam parafin dengan menggunakan pinset secara hati-hati. Dalam

satu tutup pagoda dapat diisi dengan lebih dari satu sampel dan letaknya diatur sedemikian rupa untuk memudahkan proses pemotongan kemudian parafin ditambahkan lagi sampai permukaan cembung. Setiap sampel dituliskan nama sampel dengan menggunakan pensil diatas kertas film. Tutup pagoda dipindahkan dari keadaan hangat ke bagian dingin (cold plate) untuk beberapa saat sampai membeku kemudian dipindahkan ke dalam air sampai parafin membeku sempurna. Setelah parafin membeku dengan sempurna, parafin dikeluarkan dari tutup pagoda. Potongan parafin yang membungkus jaringan ditrimming sampai membentuk kotak lalu ditempelkan pada balok kayu yang telah disediakan.

Tahapan selanjutnya adalah pembuatan blok jaringan, dimulai dari memanaskan pisau di atas pemanas bunsen, parafin di sekitar sampel dipotong agar besarnya sesuai dengan blok kayu yang telah disediakan. Kayu tempat penempelan sampel diletakkan pada alas agar statis. Serpihan parafin diletakkan di atas blok kayu, kemudian pisau yang telah dipanaskan diletakkan diatas blok kayu dengan serpihan parafin sampai serpihan parafin menjadi cair. Sampel diletakkan diatas pisau panas dan secara perlahan ditempelkan diatas alas kayu yang telah dialasi parafin cair. Sampel siap untuk dipotong, blok parafin dapat disimpan dalam lemari es sebelum dipotong dengan mikrotom.

Pemotongan (*Sectioning*)

Setelah melakukan penanaman jaringan ke dalam parafin dan diletakkan pada blok kayu, maka jaringan siap dipotong menggunakan mikrotom. Blok parafin dipasang pada mikrotom lalu posisinya diatur agar memperoleh hasil potongan yang optimal. Sediaan dipotong dengan ketebalan 5 μm . Sebelum dipotong, sediaan ditrimming terlebih dahulu untuk membuang parafin yang tidak digunakan serta untuk mendapatkan hasil sayatan yang baik. Setelah mendapat hasil sayatan yang terbaik, maka sayatan diambil dengan potongan kertas yang basah pada bagian ujungnya lalu diapungkan di atas aquades dingin untuk membuka lipatan. Kemudian sayatan dipindahkan ke dalam air hangat dengan suhu 37° untuk menghilangkan kerutan. lalu diletakkan pada gelas objek untuk dilihat hasilnya di bawah mikroskop. Gelas objek yang terlekat oleh jaringan

diberi label sesuai dengan kode sampel dan dikeringkan. Sediaan disimpan di inkubator dengan suhu 37°C selama semalam lalu siap untuk dilanjutkan dengan proses pewarnaan. Khusus untuk pewarnaan immunohistokimia, gelas objek dilem dengan neofren agar sayatan lebih melekat untuk menghindari lepasnya sayatan dari gelas objek selama proses pewarnaan immunohistokimia.

Pewarnaan

1. Pewarnaan Hematoksilin Eosin (Kiernan 1990)

Proses awal dari pewarnaan ini adalah deparafinisasi dengan xylol yang bertujuan untuk menghilangkan parafin pada jaringan. Dimulai dari memasukkan jaringan ke xylol III selama 3 menit, xylol II selama 3 menit, dan xylol I selama 5 menit

Langkah berikutnya adalah proses rehidrasi yang bertujuan mengembalikan cairan kedalam jaringan dengan menggunakan larutan alkohol. Proses rehidrasi yang pertama adalah memasukkan jaringan kedalam alkohol absolut III, II, I masing-masing selama 3 menit, kemudian jaringan dimasukkan kedalam alkohol 95%, 90%, 80% secara bergantian dan masing-masing selama 3 menit, kemudian dimasukkan dalam alkohol 70% selama 5 menit. Setelah dimasukkan kedalam alkohol bertingkat, langkah yang selanjutnya dilakukan adalah memasukkan jaringan kedalam air kran selama 5-10 menit dan terakhir kedalam akuades selama 10 menit.

Setelah masuk kedalam larutan akuades selama 10 menit, jaringan lalu dimasukkan kedalam larutan pewarna hematoksilin selama 3 detik sampai pewarna berhasil mewarnai intisel. Sediaan jaringan kembali direndam dalam air kran selama 5 menit dan selanjutnya akuades selama minimal 5 menit. Pewarnaan kembali dilanjutkan dengan memasukkan sediaan kedalam pewarna eosin selama 2 menit untuk mewarnai sitoplasma jaringan. Sediaan jaringan kembali direndam dalam akuades selama 5 menit.

Tahapan berikutnya adalah dehidrasi yang bertujuan menarik air dari jaringan agar tetap awet dan tidak cepat rusak. Sediaan jaringan dicelupkan 2-3 kali secara berurutan kedalam larutan alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, dan absolut

I. Selanjutnya direndam kedalam larutan alkohol absolut II dan III selama masing-masing 1 menit.

Proses terakhir adalah penjernihan atau *clearing* yaitu dimulai dengan memasukkan sediaan jaringan kedalam larutan xylol I dan xylol II selama masing-masing 1 menit kemudian xylol III selama 3 menit. Setelah melakukan pewarnaan , maka proses selanjutnya adalah *mounting*, yaitu penutupan sediaan dengan menggunakan entelan sebagai perekat.

2. Pewarnaan Immunohistokimia (Wresdiyati *et al.* 2008)

Proses pewarnaan ini dilakukan untuk mendeteksi sel β didalam pulau Langerhans menggunakan antibodi monoklonal insulin. Prinsip pewarnaan ini adalah ikatan antigen (insulin dalam sel β) dan antibodi monoklonal insulin yang divisualisasikan dengan *diaminobenzidine* (DAB) berupa endapan coklat. Pewarnaan dimulai dengan mensterilkan gelas objek dengan *ultrasonic cleaner* menggunakan larutan alkohol 70% selama 20 menit kemudian dipindahkan ke dalam larutan DW1, DW2, dan DW3 selama masing- masing 20 menit. Setiap pergantian, DW yang telah dipakai harus diganti baru. Setelah gelas objek steril maka siap untuk dilem dengan *neofren*. Kemudian dilanjutkan dengan proses deparafinisasi dan rehidrasi seperti pada pewarnaan Hematoksin Eosin, kemudian dilakukan penghilangan aktivitas enzim peroksidase endogen dengan 0,3 ml H_2O_2 didalam methanol 30 ml dalam suhu ruang dan dicelup selama minimal 15 menit. Sediaan jaringan kemudian dicuci dengan menggunakan DW sebanyak dua kali, masing-masing 5 menit lalu dicuci dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sebanyak dua kali, masing-masing 5 menit.

Sediaan jaringan ditetes dengan normal serum sebanyak 60 μ l, diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit, kemudian dicuci kembali dengan PBS sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit selanjutnya diinkubasi dalam antibodi monoklonal insulin (Sigma I2018)) sebanyak 60 μ l per sediaan pada suhu 4°C selama 24 jam. Sediaan dicuci lagi dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 10 menit, kemudian berikutnya diinkubasi dalam antibodi sekunder menggunakan DEPS (*Dako Envision Peroxidase System*) sebanyak 60 μ l per sediaan pada suhu 37°C selama 60 menit. Sediaan dicuci kembali dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit.

Sediaan divisualisasi dengan DAB kit selama 20 menit sebanyak 60 μ l per sediaan dan ditutup dalam ruang gelap lalu sediaan dimasukkan dalam DW sebagai *stopping point* kemudian *counterstain* dengan Hematoksin selama 3 detik lalu direndam dalam DW selama 8 menit. Terakhir dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat 70%, 80%, 90%, 95%, alkohol absolut I, alkohol absolut II selama 1 menit, alkohol absolut III selama 1 menit, *clearing* dengan xylol I, xylol II selama 1 menit, xylol III selama 1 menit, dan *mounting* dengan menggunakan entelan.

Setelah melakukan pewarnaan, maka proses selanjutnya adalah *mounting*, yaitu penutupan sediaan dengan menggunakan entelan sebagai perekat. Sediaan yang telah diproses diletakkan di atas kertas tissue dan pada bagian jaringan dibiarkan basah. Bahan entelan diteteskan secukupnya di atas sediaan dan dengan pinset diletakkan cover glass yang telah bersentuhan dengan bahan entelan lalu diletakkan secara hati-hati sampai bahan entelan menyebar ke seluruh cover glass tanpa ada gelembung udara.

Pengamatan dan analisa data

Pengamatan yang dilakukan terhadap jaringan pankreas yang telah diwarnai dengan HE adalah morfologi umum jaringan pankreas yang meliputi keadaan sel-sel pada pulau Langerhans dan sel-sel asinar, adanya peradangan, serta menghitung jumlah pulau Langerhans per lapang pandang. Sedangkan pada jaringan pankreas yang telah diwarnai secara immunohistokimia terhadap sel β dilakukan penghitungan jumlah β per pulau Langerhans. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus CH-20) dan didokumentasikan dengan pemotretan menggunakan mikroskop foto (Nikon E600). Penghitungan sel β dilakukan pada tiga lapang pandang pada setiap preparat dan penghitungan pulau Langerhans dilakukan pada lima lapang pandang pada setiap preparat. Hasil penghitungan tersebut disusun sebagai rancangan acak lengkap dan dianalisa dengan analisa sidik ragam (Anova) dan apabila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan (Steel & Torrie 1980).

HASIL

Morfologi umum

Pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE) dilakukan untuk melihat secara kualitatif morfologi umum jaringan pankreas tikus perlakuan. Pewarnaan ini terdiri dari dua komponen warna, yaitu hematoksin dan eosin. Hematoksin merupakan zat warna yang bersifat basa sehingga dapat mewarnai inti sel yang bersifat asam sedangkan eosin adalah zat warna yang bersifat asam sehingga dapat mewarnai sitoplasma yang bersifat basa (Banks 1993). Parameter yang diamati dari pewarnaan HE pada preparat pankreas adalah morfologi umum jaringan pankreas dan jumlah pulau Langerhans.

Jaringan pankreas kelompok perlakuan K(+) dan MG memiliki jumlah sel asinar yang mengalami degenerasi hingga nekrosis lebih banyak dibandingkan dengan jaringan pankreas kelompok perlakuan VA dan VB. Jaringan pankreas kelompok perlakuan VA dan VB hanya memiliki sel asinar yang mengalami degenerasi hingga nekrosis dalam jumlah sangat sedikit, hal ini merupakan kondisi yang normal karena di dalam suatu organ atau jaringan pasti terdapat beberapa sel yang mengalami degenerasi atau nekrosis.

Hasil perhitungan jumlah pulau Langerhans per lima lapang pandang pada jaringan pankreas tikus perlakuan tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata jumlah pulau Langerhans pada jaringan pankreas tikus pada pembesaran 20x

Kelompok	Jumlah pulau Langerhans (buah)
K(-)	3.40 ± 1.18 ^b
K(+)	1.40 ± 1.06 ^a
VA	2.13 ± 1.46 ^a
VB	1.93 ± 2.12 ^a
MG	1.53 ± 1.18 ^a

Keterangan: Superscript yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (p<0.05)

Berdasarkan uji statistik analisa sidik ragam (ANNOVA) terhadap jumlah pulau Langerhans memperlihatkan bahwa kelompok perlakuan K(-) memiliki jumlah pulau Langerhans yang paling tinggi secara nyata ($p < 0.05$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya, hal ini terjadi karena pada kelompok perlakuan K(-) tidak diinduksi oleh alloxan sehingga tidak timbul keadaan diabetes, maka dari itu jaringan pankreas kelompok perlakuan K(-) memiliki kondisi yang paling baik.

Sedangkan pada kelompok perlakuan K(+), VA, VB, dan MG memiliki jumlah pulau Langerhans yang tidak berbeda nyata disebabkan oleh jumlah pulau Langerhans yang tidak terlihat banyak berubah karena pada masing-masing kelompok perlakuan tersebut diinduksi oleh alloxan yang menimbulkan keadaan diabetes sehingga kondisi jaringan pankreas tidak jauh berbeda. Namun jumlah pulau Langerhans belum dapat menggambarkan kerusakan dari jaringan pankreas dan sel-sel yang berada didalamnya karena sel-sel yang berada didalam pulau Langerhans tidak terdeteksi oleh pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE). Maka dari itu dilakukan pewarnaan lanjutan dengan immunohistokimia untuk mendeteksi sel β yang berada didalam pulau Langerhans.

Profil sel β

Pengamatan terhadap sel β dilakukan secara kuantitatif yaitu dengan menghitung jumlah sel β pada masing-masing kelompok perlakuan pankreas tikus. Sel β yang terdeteksi dengan pewarnaan immunohistokimia ditunjukkan dengan gambar sel yang berwarna coklat tua pada pulau Langerhans sedangkan sel lainnya berwarna biru. Warna biru didapat dari *counterstain* menggunakan pewarna hematoksilin yang mewarnai sel-sel pankreas selain dari sel β yang berwarna coklat yang terwarnai dengan immunohistokimia Hasil perhitungan jumlah sel β pada pulau Langerhans jaringan pankreas tikus perlakuan per tiga lapang pandang tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata jumlah sel β pulau Langerhans pada jaringan pankreas tikus pada pembesaran 20x

Kelompok	Jumlah sel β di pulau Langerhans (buah)
K(-)	63.44 \pm 15.29 ^c
K(+)	10.11 \pm 6.95 ^a
VA	22.78 \pm 7.03 ^b
VB	18.89 \pm 8.27 ^b
MG	8.67 \pm 3.12 ^a

Keterangan: Superscript yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0.05$)

Hasil uji statistik terhadap jumlah sel β di pulau Langerhans menunjukkan bahwa pada jaringan pankreas kelompok perlakuan K(-) memiliki jumlah sel β yang paling tinggi secara nyata ($p < 0.05$) karena pada kelompok jaringan pankreas kelompok K(-) tidak diinduksi oleh alloxan sehingga tidak mengalami diabetes dan sel-sel β didalamnya masih utuh. Sedangkan pada jaringan pankreas kelompok perlakuan K(+) dan MG memiliki jumlah sel β paling rendah secara nyata ($p < 0.05$) dibandingkan kelompok perlakuan lainnya karena memiliki laju kerusakan sel β yang tinggi.

Jaringan pankreas kelompok perlakuan VA dan VB memiliki jumlah sel β yang lebih tinggi secara nyata ($p < 0.05$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan K(+) dan MG, namun jumlah sel β pada jaringan pankreas kelompok perlakuan VA dan VB masih lebih rendah secara nyata ($p < 0.05$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan K(-).

PEMBAHASAN

Penyakit diabetes mellitus menyebabkan suatu keadaan dimana tubuh tidak dapat mengontrol kadar glukosa darah disebabkan terganggunya sekresi insulin oleh sel β di dalam pulau Langerhans jaringan pankreas. Proses metabolisme glukosa sangat penting untuk dapat menghasilkan energi demi kelangsungan hidup sel-sel di dalam tubuh, namun pada keadaan diabetes mellitus, sel tubuh tidak dapat memetabolisme glukosa sehingga tubuh kekurangan energi. Hal yang demikian akan merespon tubuh untuk mencari energi alternatif yaitu dari glikogenolisis dan glukoneogenesis. Kedua proses tersebut menghasilkan produk samping berupa radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan dari sel-sel tubuh termasuk sel β pankreas.

Alloxan merupakan salah satu cara induksi diabetes mellitus eksperimental yang secara selektif merusak sel β pankreas (Walde *et al.* 2002). Diabetes mellitus yang terjadi pada tikus dalam penelitian ini disebabkan dari induksi alloxan yang merusak sel β pankreas dan menyebabkan sekresi insulin menurun. Menurut Szkudelski (2001), alloxan merusak sel β pankreas melalui pembentukan spesies oksigen reaktif yang diawali oleh reduksi alloxan. Alloxan akan bereaksi dengan agen-agen pereduksi seperti sistein dan enzim-enzim yang bergugus SH-. Glukokinase merupakan enzim yang berperan penting atas sekresi insulin dan memiliki gugus SH-, maka alloxan memiliki afinitas yang tinggi terhadap enzim glukokinase. Alloxan akan bereaksi dengan dua gugus SH- dari enzim glukokinase membentuk ikatan dimer dan menyebabkan inaktivasi enzim sehingga sekresi insulin terganggu dan terjadi kerusakan pada sel β dan kemudian timbul keadaan diabetes.

Alloxan juga merupakan radikal bebas yang dapat merusak biomakromolekul seperti lipid, fosfolipid, dan karbohidrat yang merupakan komponen dinding sel (Lenzen 2007), serta DNA yang berada di dalam intisel. Aktivitas radikal bebas tersebut akan menyebabkan dinding sel mengalami penurunan fungsi dan kerja sel menjadi terganggu sehingga sel menjadi rusak dan mengalami degenerasi hingga nekrosa dengan sitoplasma yang pucat dan inti sel yang rusak. DNA yang berada di dalam intisel juga dapat diserang oleh radikal

bebas. Bilaerusakan DNA tidak terlalu besar maka keadaannya masih dapat diperbaiki, namun proses perbaikan tersebut seringkali menyebabkan sel mengalami mutasi. Kejadian mutasi tersebut yang akhirnya dapat menimbulkan kanker (Aruoma 1998). Morfologi umum jaringan pankreas serta kerusakan sel-sel asinar didalamnya dan jumlah pulau Langerhans dapat dilihat melalui pewarnaan Hematoksin-Eosin(HE)

Jaringan pankreas kelompok perlakuan K(-) memiliki sel asinar yang mengalami degenerasi dan nekrosa paling sedikit dan memiliki jumlah pulau Langerhans paling banyak dibandingkan dengan jaringan pankreas kelompok perlakuan lainnya. Hal tersebut dikarenakan jaringan pankreas kelompok perlakuan K(-) tidak diinduksi oleh alloxan sehingga tidak timbul keadaan diabetes, maka dari itu sel asinar yang mengalami degenerasi hingga nekrosa masih dalam jumlah yang normal.

Sedangkan jaringan pankreas kelompok perlakuan K(+) memiliki jumlah sel asinar yang mengalami degenerasi dan nekrosa lebih banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan VA dan VB karena jaringan pankreas kelompok perlakuan K(+) diinduksi oleh alloxan dan hanya memperoleh perlakuan cekok aquadest sehingga kerusakan sel asinar berjalan dengan cepat. Jumlah sel asinar yang mengalami degenerasi hingga nekrosa paling banyak ditunjukkan oleh jaringan pankreas kelompok perlakuan MG, hal tersebut terjadi karena pankreas kelompok perlakuan MG diinduksi oleh alloxan dan mendapat perlakuan minyak goreng. Jumlah radikal bebas yang banyak akibat kondisi diabetes akan bertambah dengan konsumsi minyak goreng yang mengandung asam lemak tak jenuh rantai panjang. Asam lemak tak jenuh rantai panjang ini akan meningkatkan oksidasi lipid yang juga akan menghasilkan produk samping berupa radikal bebas. Maka jumlah radikal bebas yang terdapat pada pankreas kelompok perlakuan MG menjadi lebih banyak sehingga dapat mempercepat laju kerusakan sel.

Jaringan pankreas kelompok perlakuan VA dan VB memiliki sel asinar yang mengalami degenerasi hingga nekrosa lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok perlakuan K(+) dan MG, karena pada pankreas kelompok perlakuan

VA dan VB diinduksi oleh alloxan dan mendapat asupan VCO ke dalam tubuh, sehingga laju kerusakan sel dapat dihambat.

VCO mengandung asam laurat yang merupakan asam lemak jenuh rantai sedang dan dilaporkan dapat meningkatkan sekresi insulin (Garfinkel *et.al.* 1992). Meningkatnya sekresi insulin menyebabkan pencarian alternatif terhadap glukosa akan berkurang, dan produk samping yaitu radikal bebas yang dihasilkan lebih sedikit. Maka laju kerusakan sel pada jaringan pankreas kelompok perlakuan VA dan VB dapat dihambat sehingga jumlah kerusakan sel menjadi lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok perlakuan K(+) dan MG.

Dengan pewarnaan HE, jumlah pulau Langerhans tidak berbeda secara nyata antara kelompok perlakuan K(+), VA, VB, dan MG. Jumlah pulau Langerhans belum dapat menggambarkan kerusakan sel β . Untuk dapat mendeteksi sel β yang terdapat didalam pulau Langerhans maka dilakukan pewarnaan lanjutan yaitu dengan teknik immunohistokimia.

Deteksi sel β secara immunohistokimia dapat menunjukkan adanya kerusakan sel β pada keadaan diabetes mellitus. Jaringan pankreas kelompok perlakuan K(+) memiliki jumlah sel β paling sedikit dibandingkan dengan kelompok lainnya, ini disebabkan karena jaringan pankreas kelompok perlakuan K(+) diinduksi alloxan dan hanya diberi perlakuan aquadest sehingga terjadi laju kerusakan sel β yang tinggi dan sekresi insulin menjadi sangat sedikit. Pengurangan sekresi insulin yang terjadi pada sel-sel β kelompok perlakuan K(+) diakibatkan oleh inaktivasi alloxan terhadap enzim glukokinase. Glukokinase adalah enzim bergugus SH- yang memiliki peran penting atas sekresi insulin di pankreas, dan alloxan memiliki afinitas tinggi terhadap protein yang memiliki gugus SH- sehingga alloxan akan bereaksi dengan dua gugus SH- dari glukokinase dan membentuk ikatan dimer dan menyebabkan inaktivasi enzim dan bertanggung jawab atas kematian sel β (Szkudelski 2001). Selain itu, alloxan juga mengurangi produksi ATP sehingga menyebabkan terbukanya saluran K^+ dan terjadinya hiperpolarisasi plasma membran. Hal yang selanjutnya terjadi adalah penutupan gerbang voltase Ca^{2+} yang menyebabkan berkurangnya konsentrasi Ca^{2+} sehingga terjadi penurunan sekresi insulin yang mengakibatkan kematian sel β (Drews *et al.* 2000).

Pada kelompok perlakuan MG, jumlah sel β yang dihasilkan tidak jauh berbeda dengan kelompok K(+). Pada keadaan diabetes dilakukan proses alternatif pencarian glukosa yang menghasilkan produk samping berupa radikal bebas. Jumlah radikal bebas yang banyak akibat kondisi diabetes akan bertambah dengan konsumsi minyak goreng yang mengandung asam lemak tak jenuh yang akan meningkatkan terjadinya oksidasi lipid yang juga akan menghasilkan produk samping berupa radikal bebas, sehingga radikal bebas yang terdapat pada pankreas kelompok perlakuan MG akan semakin banyak. Hal tersebut akan semakin membuat sel β pankreas semakin mengalami penurunan fungsi sehingga sekresi insulin terganggu serta laju kerusakan sel β pada jaringan pankreas kelompok perlakuan MG akan semakin cepat dan jumlah sel β menjadi lebih sedikit.

Jaringan pankreas kelompok perlakuan VA dan VB memiliki jumlah sel β yang lebih banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan K(+) dan MG, hal tersebut menunjukkan bahwa terjadi penghambatan laju kerusakan sel β pulau Langerhans pada kelompok perlakuan VA dan VB. Pelepasan insulin pada kelompok VA dan VB dipicu oleh peningkatan konsentrasi Ca^{2+} intraseluler yang dikeluarkan oleh gerbang voltase saluran Ca^{2+} di dalam membran plasma sel β . Asam lemak jenuh rantai sedang berperan penting atas aktivasi saluran Ca^{2+} tersebut yang mengakibatkan mobilisasi dari Ca^{2+} intraseluler sehingga memicu terjadinya pelepasan insulin dari sel β (Gravena *et al.* 2002). Salah satu asam lemak jenuh yang berperan dalam menstimulir sekresi insulin adalah asam laurat, asam palmitat, dan asam kaprat yang terkandung di dalam VCO (Garfinkel *et al.* 1992). Meningkatnya sekresi insulin menyebabkan pencarian alternatif terhadap glukosa akan berkurang, dan produk samping yaitu radikal bebas yang dihasilkan lebih sedikit, maka dari itu kerusakan sel-sel β dapat lebih dihambat sehingga jumlah sel β yang terdapat pada pankreas kelompok perlakuan VA dan VB lebih banyak dibandingkan dengan K(+) dan MG. Namun jumlah sel β pada pankreas kelompok perlakuan VA dan VB masih lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok perlakuan K(-), hal tersebut dikarenakan jaringan pankreas kelompok perlakuan K(-) tidak diinduksi oleh alloxan sehingga tidak timbul keadaan diabetes dan jumlah sel β pada kelompok K(-) masih utuh. Selain mengandung

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Pemberian *virgin coconut oil* pada tikus diabetes mellitus mampu menghambat laju kerusakan sel β pada pulau Langerhans.

Saran

Masyarakat dapat mengonsumsi *virgin coconut oil* dengan dosis tertentu sebagai terapi diabetes mellitus serta diiringi dengan menjaga pola konsumsi makan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adeghate E, Ponery A. 2004. Diabetes mellitus influences the degree of colocalization of calcitonin gene-related peptide with insulin and somatostatin in the rat pancreas. *J Pancreas* 29(4): 311- 319.
- Aruoma OI. 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *JAOCS* 75(2)199-212.
- Boorman GA, Beth WG. 1999. *Pathology of the Mouse*. USA : Cache River Press. pp 191-193.
- Banks WJ. 1993. *Applied Veterinary Histology* 3rd ed. USA : Mosby. pp 6.
- Carpentier A, Mittelman SD, Bergman RN, Giacca A, Lewis GF. 2000. Prolonged elevation of plasma free fatty acids impairs pancreatic β cell function in obese non-diabetic human but not in individuals with type II diabetes. *Journal of Diabetes* 49(3): 399-408.
- Drews G, Kramer C, Dufer M, Krippeit P. 2000. Contrasting effects of alloxan on islets and single mouse pancreatic β cells. *J Biochem* 352: 389-397.
- Fife B. 2004. *The Coconut Oil Miracle*. New York : Piccadilly Books. pp 67-68.
- Frandsen RD. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak*. Ed ke-4. Gadjah Mada University Press: Yogyakarta. pp 864-867.
- Garfinkel M, Lee S, Opara SC, Akwari OE. 1992. Insulinotropic potency of lauric acid, a metabolic rationale for medium fatty acids (MCF) in TPN formulation. *J.Surg* April 52(4);328-33.
- Gravena C, Mathias PC, Ashcroft SJ. 2002. Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. *Journal of Endocrinology* 173(1):73-80.
- Inggita K, Andarini S, Aswin, AAG Anom. 2006. The different effects between palm oil and virgin coconut oil administration on improving lipid profile (cholesterol) of rats with atherogenic diet. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* 22(3) : 113-120.
- Kiernan JA. 1990. *Histological and Histochemical Methods, Theory and Practice*. England : Pergamon Press. pp. 90-101
- Larsson H, Ahren B. 1999. Insulin resistant subject lack islet adaptation to short-term dexamethasone-induced reduction in insulin sensitivity. In: *Diabetologia* (42) : 936-943.

- Lenzen S. 2007. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. In: *Diabetologia* 51(2) : 216-226.
- McClung JP, Roneker CA, Mu W, Lisk JD, Langlais P, Liu F, Lei XG. 2004. Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(24):8852-8857.
- Nevin KG, Rajamohan K. 2004. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. *Journal of Clinical Biochemistry* 37(9) : 830-835.
- Novariantio H. 2007. Kandungan asam laurat pada berbagai varietas kelapa sebagai bahan baku VCO. *J.P.T. Indst* 13(1) : 27-32.
- Price SA, Loraine MW. 1997. *Pathofisiology: Clinical Concepts of Disease Processes*. Michigan : Mosby. pp 103.
- Reece WO. 2005. *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. USA : Lippincott Williams & Wilkins. pp 470.
- Risérus U. 2006. Trans fatty acids, insulin sensitivity and type 2 diabetes. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition* 50(4) : 161-165.
- Sandberg AA, Philip DH. 2008. Interactions of exocrine and endocrine pancreatic diseases. *J. Pancreas* 9(4) : 541-575.
- Squires JE. 2003. *Applied Animal Endocrinology*. UK : CABI Publishing. pp 109.
- Steel RGD, Torrie JH. 1980. *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*. USA : McGraw-Hill. pp 137.
- Szkudelski T. 2001. The mechanisms of alloxan and streptozotocin action in B cells of rat pancreas. *J Physiol Res* 50(6): 537-546.
- Takada J. 2008. Metabolic recovery of adipose tissue is associated with improvement in insulin resistance in a model of experimental diabetes. *Journal of Endocrinology* 198 : 51-60.
- Walde SS, Dohle C, Schott-Ohly P, Gleichmann H. 2002. Molecular target structure in alloxan-induced diabetes in mice. *Journal of Life Sciences* 71(14): 1681-1694.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. 2004. Global prevalence of diabetes. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312>. [2 November 2008].

Wresdiyati T, M Astawan, R Kesenja, PA Lestari. 2008. Pengaruh pemberian Tepung Buah Pare (*Momordica charantia* L.) pada sel β dan SOD pankreas tikus diabetes mellitus. *J. Bahan Alam Ind* VI(5):193-200.

LAMPIRAN

Halaman ini merupakan lampiran yang terdapat dalam dokumen ini dan merupakan bagian integral dari dokumen ini. Hal ini tidak dapat dipisahkan dari dokumen ini dan merupakan bagian integral dari dokumen ini.

1. Diambil dari berbagai sumber yang terdapat dalam dokumen ini dan merupakan bagian integral dari dokumen ini.

a. Diperoleh dari berbagai sumber yang terdapat dalam dokumen ini dan merupakan bagian integral dari dokumen ini.

b. Diperoleh dari berbagai sumber yang terdapat dalam dokumen ini dan merupakan bagian integral dari dokumen ini.

2. Diperoleh dari berbagai sumber yang terdapat dalam dokumen ini dan merupakan bagian integral dari dokumen ini.

Lampiran 1. Prosedur Pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE)

1. Deparafinisasi : Xylol III (3 menit)
Xylol II (3 menit)
Xylol I (5 menit)
2. Rehidrasi : Alkohol absolut III (3 menit)
Alkohol absolut II (3 menit)
Alkohol absolut I (3 menit)
Alkohol 95% (3 menit)
Alkohol 90% (3 menit)
Alkohol 80% (3 menit)
Alkohol 70% (5 menit)
3. Air kran (5-10 menit)
4. Aquadest (10 menit)
5. Hematoxylin (3 detik)
6. Air kran (5 menit)
7. Aquadest (5 menit)
8. Eosin (2 menit)
9. Aquadest (5 menit)
10. Dehidrasi : Alkohol 70%
Alkohol 80%
Alkohol 90%
Alkohol 95%
Alkohol absolut I
Alkohol absolut II (1 menit)
Alkohol absolut III (1 menit)
11. *Clearing* : Xylol I (1 menit)
Xylol II (1 menit)
Xylol III (3 menit)
12. *Mounting*, dilakukan dengan menggunakan entelan sebagai bahan perekat antara gelas objek dengan gelas penutup.

Lampiran 2. Prosedur Pewarnaan Immunohistokimia terhadap sel β

1. Deparafinisasi :
 - Xylol III (3 menit)
 - Xylol II (3 menit)
 - Xylol I (5 menit)
2. Rehidrasi :
 - Alkohol absolut III (3 menit)
 - Alkohol absolut II (3 menit)
 - Alkohol absolut I (3 menit)
 - Alkohol 95% (3 menit)
 - Alkohol 90% (3 menit)
 - Alkohol 80% (3 menit)
 - Alkohol 70% (5 menit)
3. Distilled Water (10 menit)
4. H₂O₂ dalam metanol, suasana gelap (15 menit)
5. Distilled Water (2 x @ 5 menit)
6. PBS (2 x @ 5 menit)
7. Normal serum = 10% dalam PBS, @ preparat 60 μ l. Inkubasi dalam inkubator 37°C selama 60 menit.
8. PBS 3 x @ 5 menit
9. Anti insulin 1: 200, @ preparat 60 μ l. Inkubasi dalam refrigerator selama 24 jam
10. PBS 3 x, @ 10 menit
11. Dako Envision Peroxidase System, @ preparat 60 μ l (dalam gelap).
Inkubasi dalam inkubator 37°C selama 60 menit
12. PBS 3 x, @ 5 menit
13. DAB kit, @ preparat 60 μ l. Inkubasi dalam suasana gelap, suhu ruang, selama 20 menit
14. Cuci dengan distilled water
15. Counterstain dengan Hematoxylin (3 detik)
16. Distilled Water (8 menit)
17. Dehidrasi :
 - Alkohol 70%
 - Alkohol 80%

- Alkohol 90%
- Alkohol 95%
- Alkohol absolut I
- Alkohol absolut II (1 menit)
- Alkohol absolut III (1 menit)
- Xylol I
- Xylol II (1 menit)
- Xylol III (1 menit)

18. *Clearing* :

19. *Mounting*, dilakukan dengan menggunakan entelan sebagai bahan perekat antara gelas objek dengan gelas penutup.

Lampiran 3. Hasil Penghitungan Jumlah Pulau Langerhans pada Jaringan Pankreas Tikus Perlakuan

Kelompok perlakuan	Jumlah pulau Langerhans				
	1	2	3	4	5
K-1	4	2	5	3	2
K-2	4	6	4	4	3
K-4	4	2	3	3	2
K+2	3	2	3	1	1
K+3	0	1	0	1	1
K+5	2	0	2	3	1
VA1	2	2	2	3	2
VA3	1	3	3	0	3
VA4	1	6	2	2	0
VB1	1	1	2	0	1
VB2	3	7	0	2	0
VB4	6	2	1	3	0
MG1	1	0	3	1	2
MG3	0	1	1	2	2
MG5	2	1	0	3	4

Keterangan :

- K- : Kontrol Negatif
- K+ : Kontrol Positif
- VA : VCO A (VCO proses tanpa panas)
- VB : VCO B (VCO proses panas terkendali)
- MG : Minyak Goreng

Lampiran 4. Hasil Penghitungan Jumlah Sel Beta pada Pulau Langerhans Jaringan Pankreas Tikus Perlakuan

Kelompok perlakuan	Jumlah sel Beta		
	1	2	3
K-1	76	78	85
K-2	48	61	76
K-4	47	51	49
K+2	17	23	14
K+3	3	3	3
K+5	11	9	8
VA1	24	27	12
VA3	26	32	17
VA4	31	21	15
VB1	12	9	10
VB2	32	24	26
VB4	15	26	16
MG1	7	8	11
MG3	3	7	8
MG5	11	9	14

Keterangan :

- K- : Kontrol Negatif
- K+ : Kontrol Positif
- VA : VCO A (VCO proses tanpa panas)
- VB : VCO B (VCO proses panas terkendali)
- MG : Minyak Goreng

Lampiran 5. Analisis Sidik Ragam (ANOVA) dengan Uji Lanjutan Duncan terhadap Jumlah Pulau Langerhans pada Jaringan Pankreas Tikus Perlakuan

Kelompok	Jumlah pulau Langerhans (buah)
K(-)	3.40 ± 1.18 ^b
K(+)	1.40 ± 1.06 ^a
VA	2.13 ± 1.46 ^a
VB	1.93 ± 2.12 ^a
MG	1.53 ± 1.18 ^a

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Sig.
PERLAKUAN	4	37.920	9.480	4.496	.003
Galat	70	147.600	2.109		
Total	74	185.520			

Perlakuan	Subset untuk alpha = .05	
	a	b
K+	1.4000	3.4000
MG	1.5333	
VB	1.9333	
VA	2.1333	
K-		

Keterangan :

- K- : Kontrol Negatif
- K+ : Kontrol Positif
- MG : Minyak Goreng
- VA : VCO A (VCO proses tanpa panas)
- VB : VCO B (VCO proses panas terkendali)

Lampiran 6. Analisis Sidik Ragam (ANOVA) dengan Uji Lanjutan Duncan terhadap Jumlah Sel Beta pada Jaringan Pankreas Tikus Perlakuan

Kelompok	Jumlah sel β di pulau Langerhans (buah)
K(-)	63.44 \pm 15.29 ^c
K(+)	10.11 \pm 6.95 ^a
VA	22.78 \pm 7.03 ^b
VB	18.89 \pm 8.27 ^b
MG	8.67 \pm 3.12 ^a

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	Sig.
PERLAKUAN	4	18076.222	4519.056	55.152	.000
Galat	40	3277.556	81.939		
Total	44	21353.778			

Perlakuan	Subset untuk alfa = .05		
	a	b	c
MG	8.6667		
K+	10.1111		
VA		18.8889	
VB		22.7778	
K-			63.4444

Keterangan :

- K- : Kontrol Negatif
- K+ : Kontrol Positif
- MG : Minyak Goreng
- VA : VCO A (VCO proses tanpa panas)
- VB : VCO B (VCO proses panas terkendali)