

Profil Glukosa Darah dan Ultrastruktur Sel Beta Pankreas Tikus yang Diinduksi Senyawa Aloksan

I NYOMAN SUARSANA¹, B.P. PRISOERYANTO², M. BINTANG³ dan T. WRESDIYATI⁴

¹Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Bali

²Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi, FKH, IPB, Bogor

³Lab. Biokimia, Departemen Biokimia, Fakultas MIPA, IPB, Bogor

⁴Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, FKH IPB, Bogor

Email: suarsana65@yahoo.com

(Diterima dewan redaksi 13 April 2010)

ABSTRACT

SUARSANA, I-N., B.P. PRISOERYANTO, M. BINTANG and T. WRESDIYATI. 2010. Profile of blood glucose and ultrastructure of beta cells pancreatic islet in alloxan compound induced rats. *JITV* 15(2): 118-123.

Diabetes is marked by elevated levels of blood glucose, and progressive changes of the structure of pancreatic islet histopathology. The objective of this research was to analyse the glucose level and histopathological feature in pancreatic islet in alloxan compound induced rats. A total of ten male *Sprague Dawley* rats of 2 months old were used in this study. The rats were divided into two groups: (1) negative control group (K-), and (2) positif induced alloxan group (diabetic group =DM). The rats were induced by a single dose intraperitoneal injection of alloxan compound 120 mg/kg of body weight. The treatment was conducted for 28 days. Blood glucose levels of rats were analysed at 0, 4, 7, 14, 21, and 28 days following treatment. At the end of the experiment, rats were sacrificed by cervical dislocation. Pancreas was collected for analysis of histopathological study by Immunohistochemical technique, and ultrastructural study using transmission electron microscope (TEM). The result showed that Langerhans islet of diabetic rat (rat of DM group) showed a marked reduction of size, number of Langerhans islet of diabetic rat decrease, and characterized by hyperglycemic condition. By using TEM, beta cells of DM group showed the rupture of mitochondrial membrane, the lost of cisternal structure of inner membrane of mitochondria, reduction of insulin secretory granules, linkage between cells acinar with free Langerhans islet, and the caryopicnotic of nucleus.

Key words: Alloxan, Beta Cells, Rat, Blood Glucose, Immunohistochemistry

ABSTRAK

SUARSANA, I-N., B.P. PRISOERYANTO, M. BINTANG dan T. WRESDIYATI. 2010. Profil glukosa darah dan ultrastruktur sel beta pankreas tikus yang diinduksi senyawa aloksan. *JITV* 15(2): 118-123.

Diabetes ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah, dan perubahan yang progresif terhadap struktur histopatologi pankreas. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar glukosa darah dan perubahan ultrastruktur sel beta pada jaringan pankreas tikus percobaan yang diinduksi dengan senyawa aloksan. Sebanyak 10 ekor tikus putih jantan strain *Sprague Dawley* umur dua bulan telah digunakan dalam penelitian ini. Tikus percobaan dibagi dalam dua kelompok perlakuan, yaitu (1) kelompok kontrol negatif (K-), dan (2) kelompok positif induksi aloksan (diabetes mellitus=DM). Tikus diinduksi aloksan dosis tunggal 120 mg/kg bb intraperitoneal. Kadar glukosa darah tikus diperiksa pada hari ke 0, 4, 7, 14, 21 dan 28. Pada akhir penelitian, semua tikus percobaan diterminasi dengan cara *dislocatio os cervical*. Segera setelah tikus mati, jaringan pankreas diambil untuk dilakukan pewarnaan dengan imunohistokimia, dan pengamatan ultrastruktur dengan mikroskop elektron transmisi. Hasil penelitian menunjukkan tikus yang diinduksi aloksan, mengalami kerusakan sel beta dan jumlahnya berkurang serta dikarakterisasi dengan kadar glukosa darah yang meningkat (hiperglikemia). Gambaran ultrastruktur pankreas kelompok tikus DM menunjukkan sekretori granula insulin berkurang, pertautan antara sel asinar dengan pulau Langerhans lepas, membran mitokondria bocor (*rupture*), mitokondria kehilangan struktur kristae, dan inti sel beta mengalami kariopiknotis.

Kata kunci: Senyawa Aloksan, Sel Beta, Tikus, Glukosa Darah, Immunohistokimia

PENDAHULUAN

Kelenjar endokrin pankreas tersusun atas pulau Langerhans yang merupakan *cluster* yang tersebar di sepanjang kelenjar eksokrin pankreas. Unit endokrin yang disebut sebagai pulau Langerhans memiliki 4 macam sel, yaitu sel alfa, sel beta, sel delta, dan sel PP

(polipeptida pankreas) (SEUNGBUM *et al.*, 2007). Sel beta menghasilkan hormon insulin dan berperan dalam menurunkan kadar glukosa darah.

Perubahan histopatologis pulau Langerhans pada penderita diabetes telah dilaporkan sejumlah peneliti. Perubahan ini dapat terjadi baik secara kuantitatif, seperti pengurangan jumlah atau ukuran, maupun secara

kualitatif, seperti terjadi nekrosis, degenerasi, dan amyloidosis.

Kerusakan sel-sel beta pankreas dapat disebabkan oleh banyak faktor. Faktor tersebut di antaranya faktor genetik, infeksi oleh kuman, faktor nutrisi, zat diabetogenik, dan radikal bebas (stres oksidatif). Senyawa aloksan merupakan salah satu zat diabetogenik yang bersifat toksik, terutama terhadap sel beta pankreas, dan apabila diberikan kepada hewan coba seperti tikus dapat menyebabkan hewan coba tikus menjadi diabetes. Kerusakan sel beta pankreas menyebabkan tubuh tidak bisa menghasilkan insulin sehingga menyebabkan kadar glukosa darah meningkat (terjadi keadaan hiperglikemia). Kondisi hiperglikemia menurut ROBERTSON *et al.* (2003) dapat menghasilkan pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS=*reactive oxygen species*). ROS yang berlebihan dapat menyebabkan stres oksidatif dan dapat memperparah kerusakan sel beta pankreas.

KIM *et al.* (2006) melaporkan agen diabetogenik senyawa aloksan menyebabkan nekrosis dan degenerasi sel beta pankreas pada tikus, sedangkan SZKUDELSKI (2001) melaporkan, zat diabetogenik aloksan dan streptozotocin bersifat toksik terhadap sel beta pankreas dan dapat menyebabkan insulinitis pada hewan percobaan.

Senyawa aloksan dan senyawa diabetogenik lainnya secara luas telah digunakan untuk membuat model hewan diabetes, karena kemampuan senyawa aloksan secara spesifik membuat kerusakan pada sel beta pankreas (BADOLE *et al.*, 2007) yang menyebabkan produksi insulin berkurang sehingga menimbulkan diabetes tipe 1.

Diabetes ditandai dengan perubahan progresif pada pulau Langerhans (DIANI *et al.*, 2004), termasuk perubahan depleksi atau berkurangnya sekretori granula insulin pada sel beta pankreas, lepasnya pertautan sel pulau Langerhans, dan pergantian sel-sel eksokrin oleh jaringan ikat (fibrosis).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil kadar glukosa darah dan menganalisis perubahan ultrastruktur sel beta jaringan Pankreas tikus yang diinduksi dengan aloksan.

MATERI DAN METODE

Penyiapan dan perlakuan hewan percobaan

Pada penelitian ini digunakan 10 ekor tikus jantan putih galur *Sprague Dawley* umur dua bulan. Tikus percobaan dibagi menjadi dua kelompok perlakuan, tiap perlakuan terdiri atas lima ekor tikus, yaitu: (1) Kelompok kontrol negatif (K-), yaitu tikus normal dan (2) Kelompok positif diabetes mellitus (DM), yaitu

tikus yang di induksi dengan senyawa aloksan dosis tunggal 120 mg/kg bb intraperitoneal (KIM *et al.*, 2006). Tahap percobaan meliputi, masa adaptasi selama dua minggu dengan pemberian ransum standar dan air minum secara *ad libitum*. Perlakuan pada seluruh kelompok dilakukan selama 28 hari. Pada akhir penelitian, semua tikus diterminasi dengan cara dislokasio *os cervical*. Tikus dibedah segera setelah tikus mati dan diambil organ pankreas guna pemeriksaan histopatologi.

Pengukuran kadar glukosa darah pada tikus percobaan

Kadar glukosa darah tikus percobaan ditentukan dengan metode biosensor glukosa oksidase, menggunakan alat *Blood glucose Test Meter GlucoDr™* model AGM-2100 (diproduksi oleh Allmedicus Co Ltd., Korea). Darah diambil melalui ujung ekor tikus yang sebelumnya dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian diurut perlahan-lahan selanjutnya ujung ekor ditusuk dengan jarum kecil (*syringe* 1 cc). Darah yang keluar kemudian disentuhkan pada strip glukometer. Kadar glukosa darah akan terbaca di layar *GlucoDr™* setelah 11 detik dan kadar glukosa darah dinyatakan dalam mg/dl. Kadar glukosa darah diukur pada hari ke-0, 7, 14, 21 dan 28.

Deteksi hormon insulin pada sel beta Pankreas secara imunohistokimia

Jaringan pankreas difiksasi selama 24 jam dalam larutan 10% buffer formalin, selanjutnya diproses dengan metode standar menggunakan parafin. Pewarnaan imunohistokimia menggunakan metode BEESLEY (1995). Preparat jaringan diinkubasi dengan H₂O₂ dalam methanol selama 15 menit untuk menghilangkan aktivitas peroksidase endogen, kemudian jaringan diinkubasi dalam serum normal (BSA) selama 45 menit untuk menutupi bagian antigen yang tidak spesifik. Setelah dicuci dengan PBS, jaringan kemudian diinkubasi dalam antibodi primer monoklonal anti-insulin pada suhu 4°C selama 24 jam. Kemudian jaringan diinkubasi dalam antibodi sekunder Dako Envision Peroksidase (Dako K 1941) pada suhu 37°C selama 60 menit. Hasil reaksi antigen-antibodi divisualisasikan dengan menggunakan *diamino benzidine* (DAB) selama 25 menit, yang selanjutnya dikounterstain dengan hematoxilin. Penghitungan sel-sel beta pankreas dilakukan per lapang pandang pada pembesaran 400x. Pengamatan terhadap pewarnaan imunohistokimia adalah menghitung rata-rata jumlah sel beta pankreas (buah), yang dihitung dari 10 pulau Langerhans per sediaan.

Pengamatan ultrastruktur sel beta pankreas dengan mikroskop elektron

Sampel yang digunakan adalah jaringan pankreas dengan ukuran sekitar 1,5x1, 4x1,5 mm³, difiksasi menggunakan *glutaraldehyde* 2% dalam *sodium cacodylate buffer* di dalam *microwave* selama 15 detik. Selanjutnya diembing dalam nitrogen cair dan disimpan pada suhu -80⁰C. Proses lanjutnya, potongan beku dilakukan dengan *cryotome* ketebalan 10-15 µm pada suhu -20⁰C. Potongan jaringan kemudian difiksasi ulang dengan *glutaraldehyde* 2% selama 2 jam, setelah itu dengan osmium tetraoksida 1% yang dilanjutkan dengan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dan diembing dengan *epoxy resin*. Hasil embing kemudian dilakukan pemotongan ultrathin ukuran 50-60 nm. Potongan *ultrathin* jaringan yang bagus diambil dan diletakkan di atas grid dan diwarnai dengan pewarna rutin yaitu *uranyl acetate* dan *lead citrate*. Setelah pewarnaan, potongan ultrathin dikeringkan terlebih dahulu minimal satu malam sebelum diobservasi dengan mikroskop elektron transmisi (TEM).

Rancangan penelitian dan analisis data

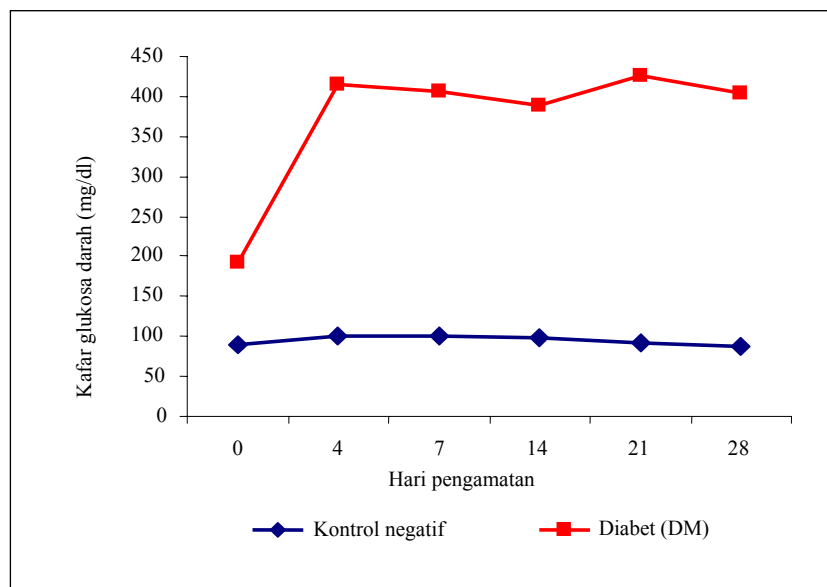
Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan Uji T tidak berpasangan (*Independent-Sample T Test*) (STEEL dan TORRIE, 1993). Perubahan ultrastruktur pada pulau Langerhans, khususnya sel beta dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji kadar glukosa darah pada tikus percobaan (tikus normal dan diabetes) diperlihatkan pada Gambar 1.

Pada Gambar 1 terlihat kadar glukosa darah tikus selama pengamatan sangat bervariasi. Salah satu faktornya adalah adanya daya tahan individu tikus yang berbeda terhadap aloksan sehingga menyebabkan kondisi awal keadaan diabetes tidak seragam (KIM *et al.*, 2006), dengan kadar glukosa darah 100-200 mg/dl. Apabila dibanding antara kelompok tikus kontrol negatif (K-) sampai pada akhir percobaan (hari ke-28), maka pada kelompok tikus positif diabetes (DM) kadar glukosa darah naik sebesar 359,18% dan berbeda nyata (P < 0,05).

Guna mengetahui jumlah sel-sel beta pada pulau Langerhans, telah dilakukan pengamatan dengan pewarnaan imunohistokimia. Pengamatan menggunakan antibodi monoklonal terhadap insulin sehingga akan terdeteksi hormon insulin pada inti dan sitoplasma sel beta pankreas. Pada tikus dewasa, sebaran sel-sel beta pada pulau Langerhans berada di tengah-tengah, sementara sel-sel lainnya seperti sel alfa, delta, dan sel PP tersebar di bagian perifer (KIM *et al.*, 2007). Hasil pengamatan jumlah sel-sel beta dan pewarnaan imunohistokimia disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 2.



Gambar 1. Respon kadar glukosa darah hewan percobaan

Tabel 1. Jumlah sel beta pulau Langerhans pankreas tikus percobaan

Perlakuan	Rata-rata jumlah sel beta
Kontrol negatif (K-)	84,56 ± 9,40 ^b
Diabet (DM)	9,33 ± 1,77 ^a

Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan hasil uji berbeda nyata ($P < 0,05$)

Tabel 1 menunjukkan bahwa kelompok tikus kontrol negatif (K-) mempunyai jumlah sel beta lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) bila dibandingkan dengan kelompok tikus positif diabetes (DM). Data ini menunjukkan sel beta jaringan Pankreas pada tikus diabetes mengalami kerusakan akibat induksi senyawa aloksan.

Perlakuan kontrol (K-) pada Gambar 2, tampak sel beta memenuhi pulau Langerhans dibagian tengah dan jumlahnya sangat banyak (84,56 ± 9,4 buah), sedangkan perlakuan diabetes (DM) terlihat sel beta jumlahnya sangat sedikit (9,33 ± 1,77 buah) dan ini berarti telah terjadi kerusakan sel beta akibat diinduksi dengan aloksan. Kerusakan sel beta menyebabkan produksi insulin berkurang sehingga ketika hormon insulin dideteksi pada sel beta menggunakan pewarnaan imunohistokimia, hasilnya sel beta jumlahnya sangat sedikit.

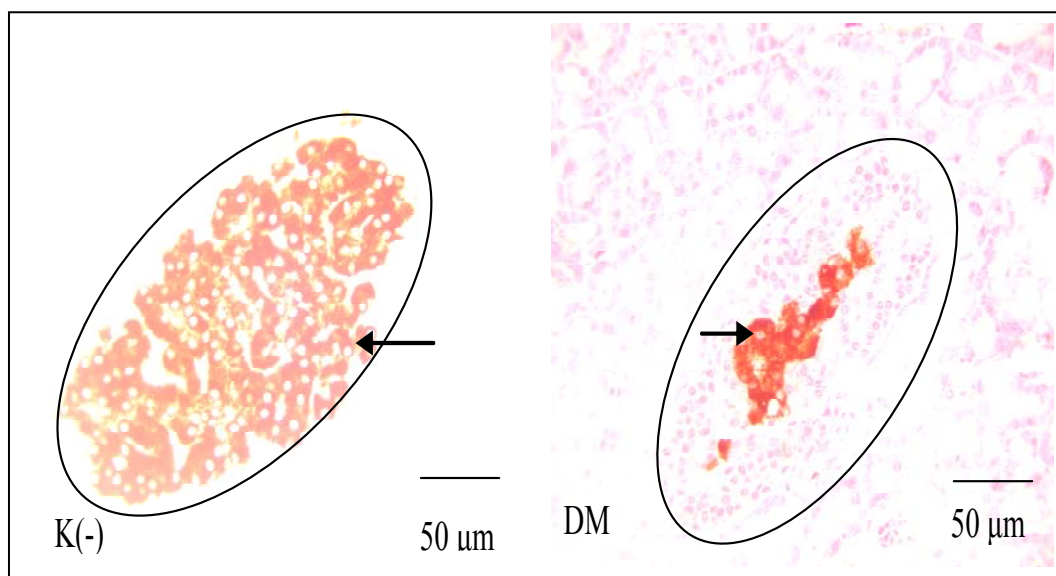
Menurut SZKUDELSKI (2001), aloksan di dalam tubuh mengalami metabolisme oksidasi reduksi menghasilkan radikal bebas dan radikal aloksan.

Radikal ini mengakibatkan kerusakan pada sel beta pankreas. Pada pulau Langerhans terlihat pengurangan jumlah massa sel, beberapa pulau Langerhans mengalami kerusakan, dimana ukuran menjadi lebih kecil bahkan ada yang hancur dan menghilang. Akibat kerusakan sel beta, sel beta tersebut tidak mampu menghasilkan insulin sehingga terjadi penyakit diabetes yang dikarakterisasi dengan keadaan hiperglikemia.

Hiperglikemia menurut ARONSON (2008) dapat memperparah kerusakan sel beta. Alasannya, kondisi hiperglikemia kronis cenderung meningkatkan pembentukan radikal bebas (ROS) melalui jalur metabolisme glukosa seperti autooksidasi glukosa, metabolisme pembentukan metilglioksal, dan fosforilasi oksidatif (ROBERTSON *et al.*, 2004). ROS yang berlebihan ini meningkatkan kejadian stres oksidatif dan merusak sel beta pankreas.

Pengamatan ultrastruktur pada kelompok tikus kontrol negatif K(-) terlihat jelas ditemukan sel alpha, sel beta, dan sel delta (Gambar 3). Tampak jelas zimogen di bagian sel asinar, sekretori granula insulin, dan glukagon. Pada kelompok tikus positif diabetes (DM), terlihat pertautan sel asinar dengan pulau Langerhans lepas, sekretori granula insulin sangat berkurang, membran sel mitokondria *rupture* (bocor), serta beberapa mitokondria kehilangan kristae dan inti sel beta mengalami kariopiknotis.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengaruh aloksan tampak nyata pada tikus diabetes yang menyebabkan kerusakan sel beta pulau Langerhans



K(-) = kontrol negatif, DM = kelompok positif diabetes mellitus
Tanda panah (→): sel beta

Gambar 2. Foto mikrograf sel beta pulau Langerhans dengan pewarnaan imunohistokimia

meskipun terdapat variasi di antara individu tikus. Menurut SZKULDELSKI (2001) terdapat variasi perubahan histopatologi pulau Langerhans akibat induksi aloksan. Hal ini dapat dipengaruhi oleh cara pemberian (intravena, sub-kutan, intraperitoneal) dan ketahanan dari masing-masing individu hewan.

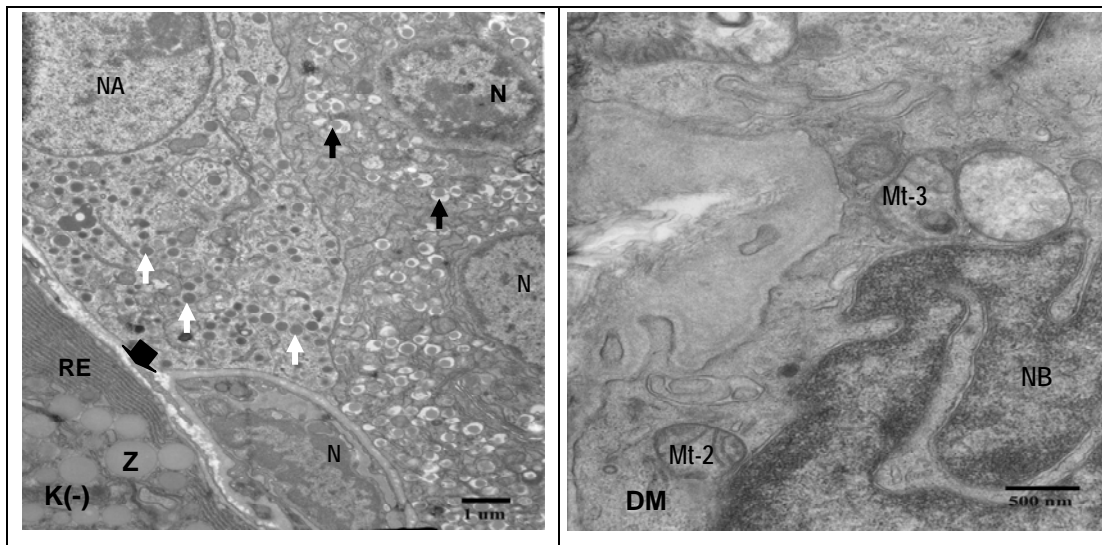
Beberapa peneliti telah melaporkan perubahan histopatologi sel beta pulau Langerhans pada kondisi diabetes. Menurut JORNS *et al.* (1997), efek senyawa aloksan terhadap sel beta menyebabkan nekrosis dan degenerasi bahkan dilaporkan 40-50% sel beta mengalami nekrosis. Demikian juga hasil penelitian BOUDREAU *et al.* (2006) yang menunjukkan bahwa inti sel beta mengalami kariolisis, komponen sitoplasma mengalami disintegrasi, batas-batas sel tidak jelas, dan terdapat masa debris yang mengandung fragmen-fragmen inti serta nekrosis. Selain nekrosis, menurut HAYDEN *et al.* (2007) terdapat deposisi amiloid sekitar 60-70% di dalam sel beta pulau Langerhans dan merupakan patogenesis diabetes mellitus tipe 2.

Kondisi morfologi pulau Langerhans pada diabetes tipe 2 secara detail diteliti oleh DENG *et al.* (2004). Hasilnya dilaporkan bahwa pada keadaan normal, jumlah sel beta diperkirakan 65% dan sel alpha 35%.

Pada tikus diabetes derajat sedang, ditemukan hampir 67% pulau Langerhans berdiameter kurang dari 150 μm , sedangkan pada tikus normal jumlah pulau Langerhans yang berdiameter lebih dari 150 μm sekitar 50%. Selain terjadi perubahan pada ukuran, dan bentuk juga terjadi fragmentasi pulau Langerhans. Pada kondisi diabetes derajat sedang, jumlah sel beta secara nyata berkurang bahkan pada diabetes parah sel beta tidak ditemukan namun sel alpha masih ditemukan di bagian perifer pulau Langerhans.

KESIMPULAN

Sel beta pankreas tikus yang diinduksi aloksan mengalami kerusakan dan dikarakterisasi dengan kondisi hiperglikemia. Pengamatan ultrastruktur jaringan pankreas tikus positif diabetes (DM) terlihat ukuran, jumlah, maupun bentuk pulau Langerhans mengalami penurunan. Sekretori granula insulin berkurang, pertautan antara sel asinar dengan pulau Langerhans lepas, membran mitokondria bocor (*rupture*), mitokondria kehilangan struktur kristae dan inti sel beta mengalami kariopiknotis.



RE : retikulum endoplasma
 NA : nukleus sel alpha
 NB : nukleus sel beta
 ND : nukelus sel delta
 Z : zimogen
 Kepala panah: batas sel asinar degan pulau Langerhans
 Mt-1: mitokondria kehilangan krista

Mt-2 : membran mitokondria bocor
 Mt-3 : mitokondria dengan *cristae centralized*
 NB-1 : inti sel beta piknotis
 (K-) : kontrol negatif
 DM : kelompok positif diabetes mellitus
 Panah hitam : granula sekretori insulin
 Panah putih : granula sekretori glukagon

Gambar 3. Ultrastruktur sel beta pulau Langerhans pankreas tikus percobaan

DAFTAR PUSTAKA

- ARONSON, D. 2008. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv. Cardiol.* 45: 1-16.
- BADOLE, S.L., N.M. PATEL, P.A. THAKURDESAI and S.L. BODHANKAR. 2007. Interaction of Aqueous Extract of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel-Champ with Glyburide in Alloxan Induced Diabetic Mice. *eCAM*: 1-6.
- BEESELEY, J.E. 1995. *Immuno-cytochemistry: A Practical Approach*. IRL. Press Oxford University Press, NEW YORK. pp. 15-41.
- BOUDREAU, M.D., H.W. TAYLOR, D.G. BAKER and J.C. MEANS. 2006. Dietary exposure to 2-aminoanthracene induces morphological and immunocytochemical changes in pancreatic tissues of fisher-344 rats. *Toxicol. Sci.* 93: 50-61.
- DENG, S., M. VATAMANJUK, X. HUANG, N. DOLIBA, M.M. LIAN, A. FRANK, E. VELIDEDEDEOGLU and F. MARKMAMM. 2004. Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 53: 624-632.
- DIANI, A.R., G. SAWADA, B. WYSE, F.T. MURRAY and M. KHAN. 2004. Pioglitazone preserves pancreatic islet structure and insulin secretory function in three murine models of type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286: 116-122.
- HAYDEN, M.R., P.R. KARUPARTHI, C.M. MANRIQUE, G. LASTRA, J. HABIBI and J.R. SOWERS. 2007. Longitudinal ultrastructure study of islet amyloid in the HIP rat model of type 2 diabetes mellitus. *Exp. Biol. Med.* 232: 772-779.
- JORNS, A., R. MUNDAY, M. TIEGE and S. LENZEN. 1997. Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islet in vitro. *J. Endocrinol.* 155: 283-293.
- KIM, J.S., J.B. JU, C.W. CHOI and S.C. KIM. 2006. Hypoglycemic and antihyperlipidemic effect of four korean medicinal plants in alloxan induced diabetic rats. *Am. J. Biochem. Biotech.* 2: 154-160.
- KIM, S., S. JUN-SEOP, K. HYUN-JUNG, K.C. FISHER, L. MI-JI and K.C. HAN-WHA. 2007. Streptozotocin-induced diabetes can be reversed by hepatic oval cell activation through hepatic transdifferentiation and pancreatic islet regeneration. *Lab. Investigation* 87: 702-712.
- ROBERTSON, R.P., J. HARMON, P.O. TRAN, Y. TANAKA and H. TAKAHASHI. 2003. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 52: 581-587.
- ROBERTSON, R.P., J. HARMON, P.O. TRAN and V. POITOUT. 2004. β -Cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53: S119-S124.
- SEUNGBUM, K., S. JUN-SEOP, K. HYUN-JUNG, K.C. FISHER, L. MI-JI and K. CHAN-WHA. 2007. Streptozotocin-induced diabetes can be reversed by hepatic oval cell activation through hepatic transdifferentiation and pancreatic islet regeneration. *Lab. Investigation* 87: 702-712.
- STEEL, R.G.D. and J.H. TORRIE. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometrik*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- SZKUDELSKI, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50: 536-546.