

Pengaruh Media Terkondisi Sel Punca Mesensimal (MT-SPM) terhadap Histopatologi Pankreas Tikus Model DM Tipe 2

Effect of Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium on Pancreatic Histopathology in Tipe 2 Diabetic Rats Model

Stefani Santi Widhiastuti^{1*}, Bernadia Branitamahisi², Nor Sri Inayati³, Ida Ayu Preharsini Kusuma⁴, Demas Bayu Handika⁴, Ahmad Hamim Sadewa⁵, Sofia Mubarika Haryana⁵, dan Abdurahman Laqif⁶

¹Fakultas Teknobiologi, Program Studi Biologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta

²Fakultas Kedokteran, Universitas Katolik Seogijapranata

³Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman

⁴Magister Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

⁵Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada

⁶Fakultas Kedokteran, Universitas Negeri Surakarta

E-mail: stefani.santi@uajy.ac.id *Penulis korespondensi

Abstract

Type 2 diabetes mellitus is the most common type of diabetes. Though various types of therapy have been used to treat type 2 diabetes, there are still limitations found. This study was conducted to determine the effect of MSC-CM on pancreatic histopathology and the normal number of Langerhans cells in type 2 diabetic rats. This study was a pure experimental study with the Posttest Control Group design. A total of 27 male Sprague Dawley rats were divided into 3 groups: 9 healthy rats as normal control (K (-)); 9 type 2 diabetic rats as diabetic control (K (+)), induced with 60 mg/kg BW STZ (ip) and 120 mg/kg BW NA (ip), and the treatment group (P) were 9 rats induced by type 2 diabetic and treated with 0.1 ml/200 g BW (i.p) every 3 days for 10 times. On the 30th day after treatment, the rats were sacrificed and the pancreatic tissue was taken for histopathology testing with Hematoxylin-Eosin staining. The results were analyzed with the Image J program. The results showed an improvement in the histopathological profile of the pancreas and there was an increase in the number of normal Langerhans islet cells in the treatment group given MSC-CM compared to the positive control group.

Key words: Type 2 diabetic, MSC-CM, pancreatic histopathology

Abstrak

Diabetes mellitus tipe 2 merupakan jenis diabetes yang paling banyak terjadi. Berbagai macam terapi telah digunakan untuk menangani DM (Diabetes Mellitus) tipe 2, namun masih terdapat keterbatasan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh MT-SPM terhadap histopatologi pankreas dan jumlah sel normal Langerhans pada tikus model diabetes mellitus tipe 2. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan desain *Posttest Control Group*. Sebanyak 27 ekor tikus Sprague Dawley jantan dibagi menjadi 3 kelompok: kontrol normal (K(-)) yaitu 9 tikus sehat, kontrol diabetes (K(+)) yaitu 9 tikus yang diinduksi DM tipe 2 dengan 60 mg/kg BB STZ (i.p) dan 120 mg/kg BB NA (i.p), dan kelompok perlakuan (P) yaitu 9 tikus yang diinduksi DM tipe 2 dan diberi perlakuan dengan 0,1 ml/200 g BB (i.p) setiap 3 hari selama 10 kali. Pada hari ke-30 setelah perlakuan, tikus dikorbankan dan diambil jaringan pankreasnya untuk diuji histopatologi dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin. Hasil tersebut dianalisis dengan program Image J. Hasil penelitian menunjukkan terjadi perbaikan pada profil histopatologi pankreas dan terdapat peningkatan jumlah sel normal di islet Langerhans pada kelompok perlakuan yang diberi MT-SPM dibandingkan kelompok kontrol positif.

Kata kunci: DM tipe 2, MT-SPM, histopatologi pankreas

Diterima: 9 Agustus 2018 , disetujui: 17 September 2018

Pendahuluan

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit endokrin yang paling sering terjadi di dunia. Penyakit ini diklasifikasikan menjadi DM tipe 1, DM tipe 2, DM gestasional, dan tipe spesifik karena sebab lain (*American Diabetes Association*, 2015). *International Diabetes Federation* (IDF) memprediksi adanya kenaikan jumlah pasien DM di Indonesia dari 9,1 juta pada tahun 2014 menjadi 14,1 juta pada tahun 2035 (Perkeni, 2015).

Hampir 95% pasien DM mengalami DM tipe 2 (Xi dan Bu, 2014). Diabetes melitus tipe 2 merupakan penyakit endokrin yang ditandai dengan hiperglikemia kronis yang disebabkan oleh gangguan sekresi insulin, sensitivitas insulin, atau keduanya, yang selanjutnya menyebabkan penurunan fungsi sel β pankreas sehingga diperlukan adanya terapi insulin (Nyenwe dkk., 2011; *American Diabetes Association*, 2015). Tanpa adanya kontrol yang baik, maka beberapa komplikasi dapat terjadi meliputi retinopati, nefropati, dan neuropati.

Beberapa terapi telah digunakan untuk penanganan DM tipe 2, antara lain dengan obat antidiabetik oral, terapi sensitifikasi dan suplai insulin eksogen (Piya dkk., 2010; Hatziavramidis dkk., 2013). Namun, seringkali terjadi episode hipoglikemia pada pasien dengan terapi insulin eksogen (Silverstein dkk., 2005). Transplantasi pankreas merupakan pilihan terapi yang lain, namun terapi ini memiliki beberapa keterbatasan antara lain membutuhkan tindakan pembedahan mayor, sedikitnya jumlah donor, penolakan dari tubuh terhadap jaringan transplant maupun komplikasi yang dapat terjadi setelah transplantasi (Azarpira dkk., 2015). Karena keterbatasan-keterbatasan tersebut maka perlu dicari alternatif terapi lain, salah satunya dengan pengobatan regeneratif yang mencakup penggunaan biomaterial, *growth factor* dan sel punca (Tatullo dkk., 2015).

Sel punca mesensimal (SPM) merupakan salah satu jenis sel punca yang terdapat pada sumsum tulang, jaringan adiposa, darah tali pusat, dan *Wharton jelly* dari tali pusat (Azarpira dkk., 2015). SPM sangat menjanjikan untuk digunakan dalam pengobatan regeneratif. SPM ini mampu memproduksi protein dan sitokin untuk perbaikan jaringan, zat imunomodulator

yang dapat menekan inflamasi karena luka maupun karena penolakan oleh tubuh (Azarpira dkk., 2015; Lozito dkk., 2009), serta memiliki sifat pro-angiogenik sehingga berpotensi untuk terapi, termasuk terapi penyakit diabetes (Xi & Bu, 2014).

Sel punca mesensimal yang belum berdiferensiasi tumbuh dalam media terkondisi yang disebut media terkondisi sel punca mesensimal (MT-SPM). Media ini mengandung berbagai metabolit bioaktif dan memiliki efek yang sama dengan SPM (Wolbank dkk., 2010). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh MT-SPM terhadap profil histopatologi pankreas tikus model DM tipe 2.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni laboratorium dengan desain *Posttest Control Group* menggunakan hewan uji tikus *Sprague Dawley* jantan sebagai subjek penelitian. Penelitian eksperimental murni dilakukan dengan mengontrol semua variabel luar yang memengaruhi jalannya penelitian.

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan, galur *Sprague-Dawley* usia 7-8 minggu dengan berat badan 150-200 gram sebanyak 27 ekor. Bahan lain berupa Pakan Hewan Uji (AIN-93M DIET 02960397 MP Biomedicals), *Streptozotocin* (Sigma-Aldrich), *Trisodium citrate* (Sigma-Aldrich), *HCl* (Sigma-Aldrich), *Nicotin Amide* (Sigma-Aldrich), *Normal Saline* 0.9% (Sigma-Aldrich), MTSPM (Laqif, 2015), bahan pengecatan *Hematoxylin Eosin*.

Alat yang digunakan adalah perangkat pemeliharaan tikus, *syringe*, timbangan berat badan tikus, timbangan analitik, alat bedah, beads, mikropipet (Gilson), vortex, Sentrifuge Universal 320R (Hettich), dan mikrotom.

Pemeliharaan dan Pembuatan Hewan Model

Dua puluh tujuh ekor tikus jantan *Sprague Dawley* yang berumur 7-8 minggu dengan berat 150-200 g diaklimatisasi terlebih dahulu selama 3 hari dengan cara diberi pakan standar *AIN 93*

Maintenance dan dilakukan pemberian air secara *ad libitum*.

Jumlah sampel dihitung dengan rumus Federer. Sebanyak 27 tikus dibagi menjadi tiga kelompok (masing-masing 9 tikus), yaitu kelompok kontrol normal, kontrol diabetes (induksi DM dengan 60 mg/kg BB STZ (i.p) + 120 mg/kg BB NA (i.p)), dan kelompok perlakuan (induksi DM + perlakuan dengan 0,1 ml/200 g BB MT-SPM (i.p) setiap 3 hari selama 10 kali). Pada hari ketigapuluh, hewan model dikorbankan untuk diambil pankreasnya.

Isolasi Jaringan dan Pembuatan Preparat Histopatologi Pankreas

Sampel jaringan pankreas diambil dengan pembedahan sederhana. Anestesi dilakukan dengan menyuntikan Ketamin 40-100 mg/kg BB (i.p.) + Xylazine 5-13 mg/kg BB (i.p.) dalam *syringe* yang sama untuk mendapatkan durasi anestesi 60-80 menit. *Euthanasia* tikus dilakukan dengan *dislokasi cervical* di bawah pengaruh anestesi (AVMA, 2013). Sampel jaringan pankreas segera disimpan dalam wadah berisi Buffer Neutral Formalin (BNF) 10% dan selanjutnya potongan sampel diproses untuk pembuatan blok parafin dan dipotong dengan ketebalan 4 μm . Slide hasil pemotongan digunakan untuk pewarnaan rutin Hematoksin-Eosin.

Pewarnaan HE Pankreas

Pewarnaan preparat pankreas dengan Hematoksin-Eosin diawali dengan deparafinasi, yaitu pencelupan preparat ke dalam xylol 3x, dan dibersihkan sisa-sisa parafinnya dengan kasa. Kemudian dilakukan rehidrasi, yaitu pencelupan gelas objek pada alkohol bertingkat untuk menghilangkan sisa-sisa xylol, mulai dari alkohol absolut 95%, 80%, dan 70%, kemudian pencucian preparat dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa alkohol dan agar jaringan menyerap kembali air sehingga sama seperti keadaan di dalam tubuh. Selanjutnya, dilakukan pewarnaan dengan mencelupkan gelas objek ke dalam larutan Hematoksin, lalu dicuci dengan air mengalir. Setelah itu, gelas objek dicelupkan ke dalam larutan Eosin, lalu dicuci dengan air mengalir. Tahap selanjutnya adalah dehidrasi, yaitu penghilangan air kembali dengan alkohol bertingkat agar preparat dapat disimpan dalam

waktu yang lama. Bersihkan preparat dan tetesi dengan mounting media. Tutup preparat dengan *coverslip* (Muntiha, 2001).

Analisis HE Pankreas

Kenampakan jaringan pankreas diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Dokumentasi setiap pengamatan dan jumlah sel normal Langerhans dihitung dengan *Image J*. Analisa statistik dilakukan dengan *Independent Sample T-Test* menggunakan *software* SPSS versi 23.

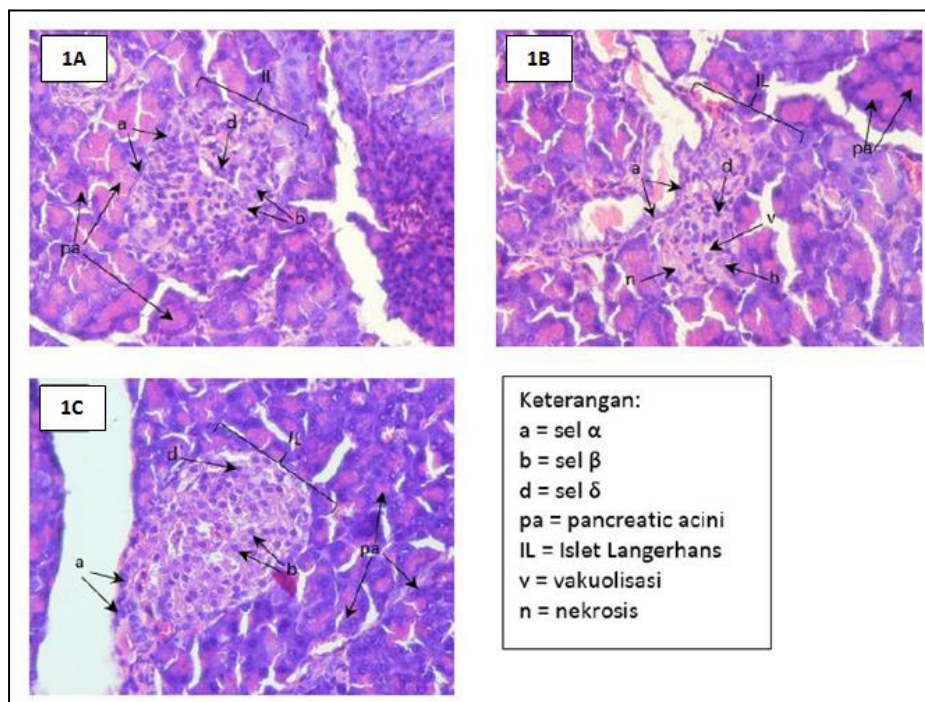
Hasil dan Pembahasan

Profil Histopatologi Pankreas

Jaringan pankreas diwarnai dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE) untuk menunjukkan profil sel Langerhans secara umum. Hasil pewarnaan HE pada jaringan pankreas diperlihatkan pada Gambar 1.

Pada kelompok kontrol diabetes (Gambar 1B) yang diinduksi dengan STZ dan NA, ukuran islet kecil, bentuk pulau tidak beraturan, jumlah sel normal di islet Langerhans sedikit, batas-batas sel tidak jelas karena bertumpuk, serta bentuk sel tidak beraturan. Pada kelompok diabetes juga terjadi vakuolisasi yang menunjukkan terjadinya degenerasi vakuola. Hal ini terjadi karena efek STZ yang dapat merusak sel β secara selektif melalui metilasi DNA sel β , peningkatan stres oksidatif yang menghasilkan radikal bebas, dan peningkatan oksida Nitrat yang semuanya dapat menyebabkan nekrosis pada sel β (Ghasemi dkk., 2014).

Profil islet Langerhans pada kelompok perlakuan (Gambar 1C) hampir sama dengan kelompok kontrol normal (Gambar 1A), berbentuk bulat telur dengan jumlah sel normal di islet Langerhans lebih banyak daripada kelompok kontrol diabetes, memiliki batas-batas sel yang jelas dengan bentuk sel bulat. Kelompok perlakuan juga diinduksi dengan STZ dan NA sehingga seharusnya memiliki profil yang sama seperti kelompok kontrol diabetes. Namun, gambaran histopatologi pankreas menunjukkan ada perbaikan pada kondisi morfologinya, sehingga profilnya hampir serupa dengan kelompok kontrol normal. Pemberian MT-SPM pada kelompok perlakuan dapat memperbaiki kondisi sel Langerhans yang telah dirusak oleh STZ.



Gambar 1. Kenampakan histopatologi pankreas yang diwarnai dengan HE, diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x pada kelompok Kontrol Normal (1A), Kontrol Diabetes (1B), dan Perlakuan (1C). Pada Kontrol Sakit (1B), jumlah sel α , β , dan δ lebih sedikit dibandingkan Kontrol Sehat (1A) dan Perlakuan (1C).

Jumlah Sel Normal Langerhans

Jumlah sel normal Langerhans dianalisis dengan *software Image J*. Sel normal berbentuk bulat, utuh, dengan batas sel yang jelas dan tidak mengalami degradasi inti sel. Pada uji normalitas dengan *ShapiroWilk*, dari ketiga kelompok hanya kelompok perlakuan yang datanya terdistribusi normal ($p > 0,05$) sehingga data jumlah sel normal Langerhans harus ditransformasi untuk menormalkan distribusi data. Jumlah sel normal Langerhans dari ketiga kelompok selanjutnya diuji statistik dengan *Independent Sample T-Test*.

Hasil uji statistik dengan *Independent Sample T-Test* menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan pada sel normal Langerhans bila dibandingkan antara kelompok kontrol normal dengan kontrol diabetes, kontrol normal dengan perlakuan, serta kontrol diabetes dengan perlakuan. Tidak adanya perbedaan signifikan dalam hasil uji statistik kemungkinan karena induksi DM tipe 2 dengan STZ dikombinasikan

dengan NA tidak menyebabkan nekrosis sel Langerhans secara keseluruhan.

Meskipun tidak ada perbedaan yang signifikan, jumlah rata-rata sel normal di islet Langerhans dalam kelompok perlakuan lebih tinggi daripada di kelompok kontrol diabetes. Jumlah rata-rata sel normal di islet Langerhans dari yang terendah adalah kelompok kontrol diabetes (12,67), kelompok perlakuan (17,56), dan yang paling tinggi adalah kelompok kontrol normal (21,11). Ini menunjukkan bahwa ada peningkatan jumlah sel normal pada islet Langerhans karena pemberian MT-SPM.

Peningkatan jumlah sel normal di islet Langerhans pada kelompok perlakuan didukung oleh fitur histopatologi kelenjar pankreas, kemungkinan disebabkan oleh efek FGF, EGF, TGF β -1, dan VEGF yang terkandung dalam MT-SPM. Keempat *growth factor* tersebut memiliki peran penting dalam peningkatan sel β pankreas (Clifford dkk., 2008; Gomez dkk., 2014; Aiello dan Wong, 2000).

Fibroblast Growth Factor (FGF) sudah banyak diketahui berperan memediasi berbagai

macam proses perkembangan. Gittez dkk. (2010) menjelaskan bahwa sinyal FGF mesensimal pankreatik ke epitelium secara spesifik berperan dalam diferensiasi sel acinar. Ligan FGF 1, 7, dan 10 terekspresi di mesenkim pankreas, sedangkan reseptor FGF 2B (FGFR2B), yang merupakan reseptor spesifik untuk ketiga ligan tersebut terekspresi pada epitelium pankreas. Ligan FGF memberikan sinyal kepada FGFR2B sehingga menginduksi proliferasi epithelial pankreas. Ornitz (2015) menyebutkan bahwa FGF berperan dalam mediasi fungsi metabolik tubuh, perbaikan jaringan dan regenerasi sel. Hal serupa diungkapkan oleh Nies dkk. (2016) yang menyatakan FGF berfungsi dalam proliferasi sel, perkembangan sel, dan penutupan luka.

Epidermal Growth Factor (EGF) juga berperan dalam perbaikan sel Langerhans. Song dkk. (2015) telah membuktikan dalam penelitiannya bahwa EGF mampu menginduksi regenerasi sel yang rusak oleh Alloxan. EGF dapat menstimulasi pengambilan glukosa dalam darah, meningkatkan jumlah sel beta hingga 3 kali lipat, serta meningkatkan proliferasi sel β .

Vascular Endothelial Derived Growth Factor (VEGF) membantu regenerasi maupun proliferasi jaringan karena perannya dalam *protein signaling* pada proses angiogenesis atau pertumbuhan pembuluh darah baru (Aiello dan Wong, 2000).

Tabel 1. Pengaruh MT-SPM terhadap Jumlah Sel Normal Langerhans pada Tikus Model DM tipe 2

Parameter	Kontrol Normal	Kontrol Diabetes	Perlakuan	P value
Jumlah sel normal Langerhans	21,11 ± 6,174	12,67 ± 4,183	17,56 ± 8,186	0,131 ^a 0,198 ^b 0,956 ^c

Nilai yang tertera pada 1. adalah rata-rata ± S.E.M, n = 9, uji statistik dilakukan dengan *Independent Sample T-Test*. Huruf a, b, dan c pada p (a,b,c) adalah:

- a: nilai signifikansi antara kelompok kontrol sehat dan sakit
- b: nilai signifikansi antara kelompok kontrol sehat dan perlakuan
- c: nilai signifikansi antara kelompok kontrol sakit dan perlakuan

Simpulan dan Saran

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa MT-SPM yang mengandung metabolit bioaktif dari SPM dapat digunakan sebagai agen pengobatan regeneratif DM tipe 2.

Saran

Perlu dilakukan pengukuran ekspresi gen-gen yang berperan dalam perkembangan sel Langerhans, terutama sel β pankreas. Gen-gen tersebut antara lain PAX4, MAFA, NKX2.2, PDX1, ISL1, NKX6.1, PBX1, dan HLXB9.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan, Kementerian Keuangan Republik Indonesia melalui hibah Bantuan Dana Penelitian Tesis dan

Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan melalui Beasiswa Unggulan Masyarakat Berprestasi.

Daftar Pustaka

- Aiello, L.P. dan Wong, J. 2000. Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Diabetic Vascular Complications. *Kidney Int*, 58: S113-S119.
- American Diabetes Association. 2015. Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 38 (1): S8-S16.
- Azarpira, N., Kaviani, M., dan Salehi, S. 2015. The Role of Mesenchymal Stem Cells in Diabetes Mellitus. *Int J Stem Cell Res Ther*, 2 (2): 1-5.
- Clifford, R.L., Deacon, K., dan Knox, A.J. 2008. Novel Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) By Transforming Growth Factor, Requirement For Smads, B-Catenin, And Gsk3 β . *The Journal Of Biological Chemistry*, 283 (51): 35337-35353.
- Ghasemi, A., Khalifi, S., dan Jedi, S. 2014. Streptozotocin-Nicotinamide-Induced Rat Model of Type 2

- Diabetes (Review). *Acta Physiol Hung*, 101 (4): 408–420.
- Gittes, G.K., Prasad, K., dan Tulachan, S. 2010. Stem Cell Therapy for Diabetes, *Stem Cell Biology and Regenerative 3: Pancreas and Islet Development*. Springer, p.1-40.
- Gomez, K.B., Rodrigues, K.F., dan Fernandes, A.P. 2014. The Role of Transforming Growth Factor-Beta in Diabetic Nephropathy. *J. Med. Genet*, 14: 1-6.
- Hatziavramidis, D.T., Karatzas, T.M., dan Chrousos, G.P. 2013. Pancreatic Islet Cell Transplantation: An Update. *Ann Biomed Eng*, 41: 469-476.
- Lozito, T.P., Taboas, J.M., Kuo, C.K., dan Tuan, R.S. 2009. Mesenchymal Stem Cell Modification of Endothelial Matrix Regulates Their Vascular Differentiation. *J Cell Biochem*, 107 (706): 13.
- Muntiha, M. 2001. Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (H&E). *Temu Teknis Fungsional Non Peneliti*. Balai Penelitian Veteriner, Bogor. Hal 156 - 163
- Nies, V.J.M., Sancar, G., Liu, W., van Zutphen, T., Struik, D., Yu, R.T., Atkins, A.R., Evans, R.W., Jonker, J.W., dan Downes, M.R. 2016. Fibroblast Growth Factor Signaling in Metabolic Regulation. *Front. Endocrinol*, 6:193.
- Nyenwe, E.A., Jerkins, T.W., Umpierrez, G.E., dan Kitabchi, A.E. 2011. Management of Type 2 Diabetes: Evolving Strategies for The Treatment of Patients With Type 2 Diabetes. *Metabolism*, 60: 1–23.
- Perkeni. 2015, Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia, *PB PERKENI*, p.1-2.
- Piya M.K., Tahrani A.A, dan Barnett A.H. 2010. Emerging Treatment Options for Type 2 Diabetes. *Br J Clin Pharmacol*, 70: 631–64.
- Silverstein J., Klingensmith G., Copeland K., Plotnick L., Kaufman F., Laffel L., Deeb I., Grey M., Anderson B., Holzmeister I.A., dan Clark N. 2005. Care of Children and Adolescents with Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, 28 (1) : 186-212.
- Song, I., Patel, O., Himpe, E., Muller, C.J.F., dan Bouwens, L. 2015. Beta Cell Mass Restoration in Alloxan-Diabetic Mice Treated with EGF and Gastrin. *PLoS ONE*, 10 (10): e0140148.
- Tatullo M., Marrelli M., Paduano F. 2015. The Regenerative Medicine in Oral and Maxillofacial Surgery: The Most Important Innovations in the Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Med. Sci.*, 12(1): 72-77.
- Wolbank, S., Martijn van Griensven, Grillari-Voglaurer, R.G., dan Peterbauer-Scherb, A. 2010. Alternative Sources of Adult Stem Cells: Human Amniotic Membrane. *AdvBiochemEngin/Biotechnol*, 123: 1-27.
- Xi, Y. dan Bu, S. 2014. Stem Cells Therapy in Diabetes Mellitus. *J Stem Cell Res Ther*, 4: 199.