

**SKRIPSI**

**HUBUNGAN PENINGKATAN KADAR GLUKOSA DARAH  
DENGAN JUMLAH SEL PULAU LANGERHANS  
KELENJAR PANKREAS**

**(Studi Eksperimental pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar Jantan)**



OLEH :

*Heru Setyo Drabowo*

BANYUWANGI – JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
S U R A B A Y A  
1 9 9 7**

HUBUNGAN PENINGKATAN KADAR GLUKOSA DARAH  
DENGAN JUMLAH SEL PULAU LANGERHANS KELENJAR PANKREAS  
(Studi Eksperimental pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar Jantan)

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga


oleh

HERU SETYO PRABOWO


NIM. 069211925

Menyetujui,

Komisi Pembimbing

  
Soepartono Partosoewignjo, MS., drh.


Pembimbing Pertama

  
Moh. Moenif, MS., drh.

Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN.

Menyetujui,  
Panitia Penguji,



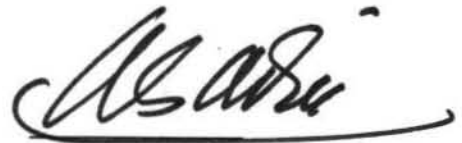
Budi Santoso, drh.

Ketua



Retno Sri Wahyuni, MS., drh.

Sekretaris



Ahmad Sadik, drh.

Anggota



Soepartono Partosoewignjo, MS., drh.

Anggota



Moh. Moenif, MS., drh.

Anggota

Surabaya, 12 Agustus 1997

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga,

Dekan,



Prof. Dr. H. Rochiman Sasmita, MS., drh.

NIP. 130 350 739

HUBUNGAN PENINGKATAN KADAR GLUKOSA DARAH  
DENGAN JUMLAH SEL PULAU LANGERHANS KELENJAR PANKREAS  
(Studi Eksperimental pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar Jantan)

Heru Setyo Prabowo

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara peningkatan kadar glukosa darah dengan jumlah sel pulau Langerhans kelenjar pankreas.

Hewan percobaan yang dipakai dalam penelitian ini adalah 40 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan berumur 1,5 - 2 bulan. Hewan percobaan diinduksi hiperglikemik dengan cara penyuntikan *alloxan* sebesar 160 mg/kg bb. Hewan percobaan dibagi menjadi tiga perlakuan dan satu kontrol. P0 merupakan kontrol tanpa perlakuan. P1 merupakan perlakuan penyuntikan *alloxan* dan dibedah setelah 72 jam. P2 disuntik *alloxan* dan dibedah setelah 120 jam. P3 disuntik *alloxan* dan dibedah setelah 168 jam. Sebelum hewan dibedah, masing-masing perlakuan diukur kadar glukosa darah puasanya. Waktu pengukuran tepat sebelum hewan dibedah. Pengukuran kadar glukosa darah menggunakan metode enzimatik glukose oksidase. Pankreas hewan percobaan diambil dan dijadikan sediaan histopatologi. Jumlah sel pulau Langerhans dihitung dan dibandingkan dengan peningkatan kadar glukosa darah.

Rancangan percobaan yang dipakai adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hasil penelitian dianalisis dengan analisis korelasi. Terdapat hubungan yang sangat bermakna ( $p < 0,01$ ) antara peningkatan kadar glukosa darah dengan jumlah sel pulau Langerhans. Koefisien korelasi menunjukkan nilai negatif. Ini menunjukkan bahwa penurunan jumlah sel pulau Langerhans mengakibatkan peningkatan kadar glukosa darah.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa peningkatan kadar glukosa darah berhubungan dengan jumlah sel pulau Langerhans.

7      24      24  
      3  
      72      7  
                  168  
      3      5      7

## KATA PENGANTAR

Insulin mempunyai hubungan erat dengan glukosa darah dalam kaitannya dengan penyakit *diabetes mellitus*. Kadar glukosa darah yang tinggi sebagai manifestasi klinik penyakit *diabetes mellitus* berhubungan dengan ketersediaan insulin sebagai pembawa glukosa darah ke sel. Sekresi insulin dipengaruhi oleh sel beta pulau Langerhans. Menurunnya jumlah sel dalam pulau Langerhans kelenjar pankreas, khususnya sel beta akan mengakibatkan penurunan jumlah sekresi insulin.

Penelitian untuk mengetahui hubungan antara peningkatan kadar glukosa darah dengan jumlah sel pulau Langerhans kelenjar pankreas telah dilakukan dan dituangkan dalam tulisan ini.

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Dekan selaku pimpinan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Soepartono Partosoewignjo MS., drh. sebagai pembimbing pertama dan Moh. Moenif MS., drh. sebagai pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan dan arahan. Dr Diah Kusumawati SU., drh. dan segenap karyawan Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Unair Jalan Setail yang telah banyak membantu penelitian ini. Ayah, ibu, kakak dan adik yang memberikan dorongan dan semangat. Buat Papin yang juga selalu memberi dorongan dan semangat.

Akhirnya penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna. Walaupun demikian, penulis berharap semoga hasil yang dituangkan dalam skripsi ini bermanfaat.

Surabaya, Agustus 1997

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL .....	v
DAFTAR LAMPIRAN .....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	vii
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
I. 1. Latar Belakang .....	1
I. 2. Perumusan Masalah .....	2
I. 3. Tujuan Penelitian .....	3
I. 4. Manfaat Penelitian .....	3
I. 5. Hipotesis Penelitian .....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	4
II. 1. Kelenjar Pankreas .....	4
II. 2. Insulin .....	6
II. 3. Glukosa Darah .....	8
II. 4. Perubahan Patologik Kelenjar Pankreas .....	10
II. 5. <i>Alloxan</i> .....	11
II. 6. Hewan Percobaan .....	12

BAB III.	MATERI DAN METODE .....	14
	III. 1. Tempat dan Waktu Penelitian .....	14
	III. 2. Bahan dan Materi Penelitian .....	14
	III. 3. Metode Penelitian .....	15
	III. 4. Peubah yang Diamati .....	18
	III. 5. Rancangan Penelitian dan Analisis Statistik .....	18
BAB IV.	HASIL PENELITIAN .....	20
	IV. 1. Kadar Glukosa Darah .....	20
	IV. 2. Jumlah Sel Pulau Langerhans .....	20
BAB V.	PEMBAHASAN .....	22
BAB VI.	KESIMPULAN DAN SARAN .....	25
	VI. 1. Kesimpulan .....	25
	VI. 2. Saran .....	25
	RINGKASAN .....	26
	DAFTAR PUSTAKA .....	28
	LAMPIRAN .....	31

**DAFTAR TABEL**

Tabel	Halaman
1. Rata-rata Kadar Glukosa Darah Masing-masing Perlakuan .....	20
2. Jumlah Rata-rata Sel Pulau Langerhans Masing-masing Perlakuan .....	20



**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran	Halaman
1. Kadar Glukosa Darah Masing-masing Perlakuan .....	31
2. Jumlah Sel Pulau Langerhans Kelenjar Pankreas .....	32
3. Rata-rata Jumlah Sel Pulau Langerhans Kelenjar Pankreas .....	34
4. Analisis Statistik .....	35
5. Suntikan Intraperitoneal (ip) .....	38
6. Pengambilan Sampel Darah .....	39
7. Pengukuran Kadar Glukosa Darah .....	41
8. Pengambilan Pankreas .....	43
9. Pembuatan Sediaan Histopatologi .....	44

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kelenjar Pankreas .....	4
2. Pulau Langerhans Kelenjar Pankreas Normal .....	5
3. Proinsulin dan Insulin .....	7
4. Mekanisme Mempertahankan Kadar Glukosa Darah Stabil .....	9
5. Struktur Kimia <i>Alloxan</i> .....	11
6. Skema Alur Kerja Penelitian .....	19
7. Pleksus Vena Optalmika dan Lokasi Penusukan Pipet Mikrohematokrit .....	40
8. <i>Reagent Carrier</i> Sebelum Bereaksi .....	42
9. <i>Reagent Carrier</i> Setelah Bereaksi .....	42
10. Gambaran Histopatologi Pulau Langerhans Kontrol .....	47
11. Gambaran Histopatologi Pulau Langerhans Perlakuan P1 .....	47
12. Gambaran Histopatologi Pulau Langerhans Perlakuan P2 .....	48
13. Gambaran Histopatologi Pulau Langerhans Perlakuan P3 .....	48
14. Peralatan Penelitian yang Digunakan .....	49
15. Pengambilan Sampel Darah .....	49
16. Reflotron .....	50
17. Hewan Percobaan Setelah Dianestesi dan Siap Didedah .....	50
18. Hewan Percobaan Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) Galur Wistar .....	51
19. Hewan Percobaan Setelah Didedah .....	51

## BAB I

## PENDAHULUAN

## I. 1. Latar Belakang

Peningkatan kesejahteraan yang dicapai oleh suatu masyarakat dapat menyebabkan perubahan pola hidup yang cenderung mengakibatkan pergeseran pola penyakit. Diperkirakan di negara berkembang pola penyakit mengalami pergeseran dari *communicable disease* ke arah *non communicable disease* antara lain penyakit kardiovaskuler, hipertensi, obesitas dan penyakit metabolik khususnya *diabetes mellitus* (Tjokropawiro, 1987).

Jumlah penderita penyakit ini terus meningkat. Atas dasar hasil penelitian penyakit *diabetes mellitus* (dengan metode *urine screening test*) di Kotamadya Surabaya dan analisis poliklinik diabetes seluruh Indonesia, dapat disimpulkan bahwa terdapat 1.336.360 penderita *diabetes mellitus* di Indonesia (Tjokropawiro, 1991).

*Diabetes mellitus* merupakan suatu penyakit gangguan metabolisme yang ditandai oleh tingginya kadar glukosa darah penderita. Gejala umum penyakit ini adalah penderita banyak minum (polidipsi), banyak makan (polifagi) dan banyak kencing (poliuri) dengan keadaan tubuh yang kurang tenaga. Bila keadaan tidak terawat penderita dapat mengalami koma hiperglikemia, gangguan visual, gagal ginjal, penyakit kardiovaskuler, serangan jantung dan katarak (Frei *et al*, 1985).

Penelitian mengenai *diabetes mellitus* tergantung insulin telah banyak dilakukan. Peranan hewan percobaan sangat besar dalam perkembangan penelitian suatu penyakit.

Hewan percobaan berperan sebagai model percobaan kejadian penyakit yang pada akhirnya bisa diterapkan pada kejadian penyakit sebenarnya pada manusia.

Hewan percobaan bisa dijadikan menderita *diabetes mellitus* dengan induksi bahan kimia tertentu. Dalam hal ini bisa dibuat berbagai penelitian berkenaan dengan *diabetes mellitus*.

Penyakit *diabetes mellitus* berkaitan dengan insulin yang merupakan hormon penanggung jawab terhadap masuknya glukosa darah ke dalam sel. Ketersediaan insulin dalam jumlah cukup mutlak diperlukan oleh penderita *diabetes mellitus* yang tergantung insulin. Penderita *diabetes mellitus* yang tergantung insulin mengalami kerusakan pada kelenjar pankreasnya sehingga tidak bisa menghasilkan insulin dalam jumlah cukup. Sel beta sebagai sel penghasil insulin mengalami kerusakan akibat sebab-sebab tertentu.

Perubahan patologik pulau Langerhans kelenjar pankreas mengiringi penyakit *diabetes mellitus* tergantung insulin (Tarui *et al*, 1989). Perubahan ini meliputi atrofi dan penurunan jumlah pulau Langerhans, penurunan jumlah sel beta, peningkatan jumlah sel alfa dan infiltrasi sel leukosit pada pulau Langerhans (Tarui *et al*, 1989).

## **I. 2. Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang di depan, timbul permasalahan seberapa besar peningkatan kadar glukosa darah yang diakibatkan oleh penurunan jumlah sel pulau Langerhans kelenjar pankreas?

### **I. 3. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hubungan antara peningkatan kadar glukosa darah terhadap jumlah sel pulau Langerhans kelenjar pankreas.

### **I. 4. Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan gambaran hubungan peningkatan kadar glukosa darah dengan jumlah sel pulau Langerhans kelenjar pankreas dalam hubungannya dengan penyakit *diabetes mellitus*.

### **I. 5. Hipotesis Penelitian**

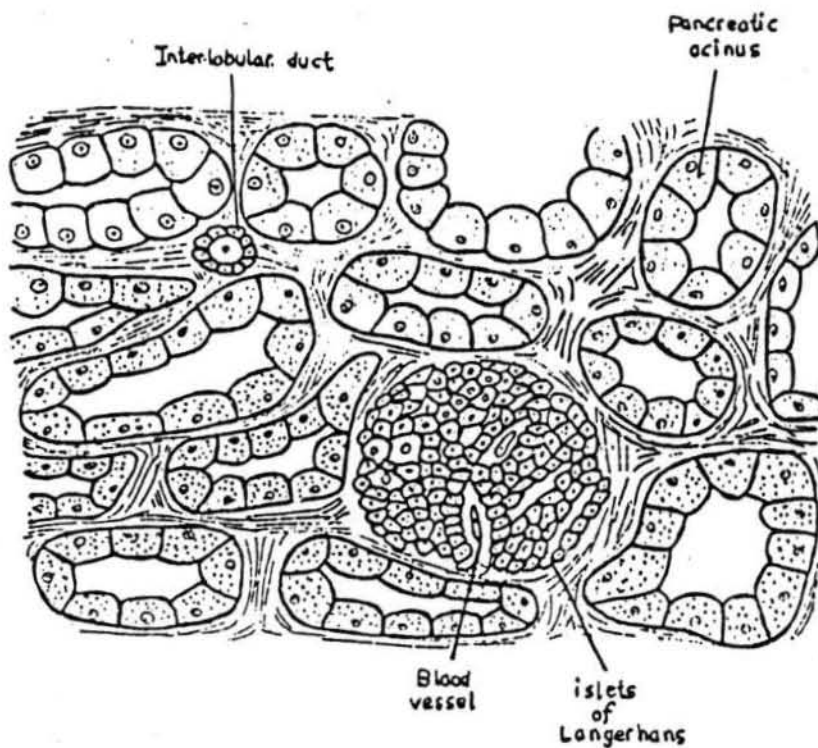
Peningkatan kadar glukosa darah mempunyai hubungan dengan jumlah sel pulau Langerhans kelenjar pankreas.

## BAB II

## TINJAUAN PUSTAKA

## II. 1. Kelenjar Pankreas

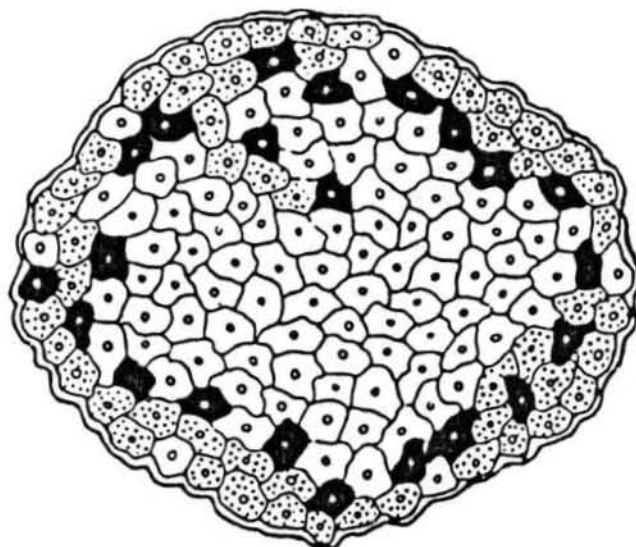
Kelenjar pankreas merupakan kelenjar campuran dari kelenjar eksokrin dan endokrin. Kelenjar eksokrin berbentuk asiner dan menghasilkan getah pencernaan. Kelenjar endokrin berisi sekumpulan sel epitel yang disebut pulau Langerhans. Kelenjar pankreas mengandung sekitar satu juta atau lebih pulau Langerhans (McDonald, 1971). Sel-sel dari pulau Langerhans dipisahkan oleh sistem pembuluh darah kapiler yang disebut *sinusoid* (Nagabhushanam *et al*, 1983).






Gambar 1: Kelenjar Pankreas (Nagabhushanam *et al*, 1983).

Pulau Langerhans merupakan timbunan sel yang membebaskan hormonnya secara langsung ke dalam sirkulasi (Turner dan Bagnara, 1988). Pulau Langerhans berdiameter 20 sampai 300 mikron dan jaringan pulau Langerhans total menyusun hanya satu sampai dua persen massa kelenjar pankreas.

## NORMAL ISLET



A CELLS		Glucagon
D CELLS		Somatostatin
B CELLS		Insulin

Gambar 2: Pulau Langerhans Kelenjar Pankreas Normal (Nair dan Karki, 1992)

Katzung (1992) menyebutkan bahwa pulau Langerhans mengandung empat macam sel, yaitu sel alfa, sel beta, sel delta dan sel F. Sel alfa menghasilkan hormon glukagon. Persentase jumlah sel alfa adalah 20 persen dari total pulau Langerhans. Sel beta menghasilkan hormon insulin. Persentase sel beta adalah 75 persen dari total jumlah sel

pulau Langerhans. Sel delta menghasilkan hormon somatostatin, berjumlah 3 - 5 persen dan sel F menghasilkan peptida pankreas berjumlah kurang dari dua persen.

Keempat sel pulau Langerhans tersebut bisa dibedakan dengan teknik pewarnaan histokimia dan mikroskop elektron. Sel alfa, beta, delta dan F mempunyai organel sitoplasmik yang berkembang baik dan berperan dalam biosintesis hormon-hormon polipeptida (Capen, 1988).

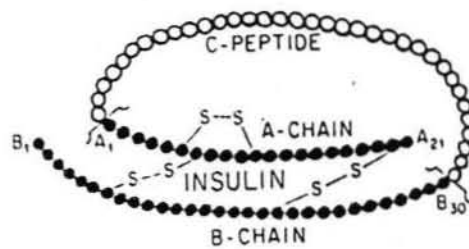
Sel alfa cenderung terletak di bagian perifer dari pulau Langerhans, sedangkan sel beta terletak di bagian tengah dari pulau Langerhans. Sel delta terletak di antara sel alfa dan sel beta (Nagabhushanam *et al*, 1983).

## II. 2. Insulin

Insulin adalah produksi utama kelenjar endokrin kelenjar pankreas yang disekresi oleh sel beta dari pulau Langerhans. Insulin merupakan hormon anabolik yang bekerja pada bermacam jaringan termasuk hati, lemak, otot. Insulin mempunyai peranan penting dalam metabolisme karbohidrat, protein dan lemak (Katzung, 1992).

Insulin merupakan polipeptida yang terdiri dari dua rantai asam amino, dihubungkan oleh jembatan disulfida. Insulin mempunyai berat molekul 5734, terdiri dari 51 asam amino berupa dua rantai peptida, yaitu rantai A yang terdiri dari 21 asam amino dan rantai B yang terdiri dari 30 asam amino. Rantai A dan B dihubungkan oleh jembatan disulfida pada asam amino nomor enam dan sebelas. Pada rantai A terdapat sebuah jembatan disulfida intra subunit (Goodman dan Gillman's, 1990).





Gambar 3: Proinsulin dan Insulin. Proinsulin adalah polipeptida yang bentuknya melingkar. Bila rantai C peptida putus, insulin dilepaskan (Kaneko, 1989).

Pfeifer *et al* (1981) yang dikutip oleh Kaneko (1989) menyatakan bahwa pelepasan insulin dirangsang oleh glukosa, asam amino, hormon (glukagon, gastrin, sekretin, pankreosimin) dan obat-obatan seperti sulfonilurea dan isoproterenol. Pelepasan insulin dihambat oleh hipoglikemia, somatostatin dan obat-obatan seperti dilantin dan phenotiasin.

Masuknya glukosa darah melalui membran sel otot dan sel lemak dirangsang oleh insulin. Proinsulin, yaitu bentuk tidak aktif dari insulin disintesis sebagai rantai peptida tunggal dalam pankreas. Proinsulin terkemas dalam granula dan diubah menjadi insulin aktif melalui kerja peptidase. Pengaktifan proinsulin menjadi insulin serupa dengan pengaktifan proenzim menjadi enzim aktif.

Setelah dilepas ke dalam aliran darah, insulin memulai rantai kejadian dengan menembus penghalang masuknya glukosa darah ke sel otot dan sel lemak. Ketika glukosa memasuki sel, konsentrasi glukosa darah menurun. Menurunnya konsentrasi glukosa darah adalah efek hipoglikemik dari insulin (Wilbraham dan Matta, 1992).

Insulin memperlancar transport glukosa dari luar ke dalam sel dengan cara difusi yang dipermudah. Insulin bekerja pada sel sasaran melalui reseptor khusus.

39, 40, 9/1/92  
13, 14, 15, 16, 19, 21  
8

Kompleks hormon-reseptor pada permukaan membran luar sel mengaktifkan enzim adenilat siklase yang melekat pada permukaan dalam membran sel. Adenilat siklase mengkatalisis perubahan ATP menjadi cAMP. cAMP melekat pada enzim protein kinase. Protein kinase yang teraktifkan mengkatalisis pengalihan gugus fosforil dari ATP. Fosforilasi pada protein membran sel mengakibatkan membran sel menjadi permeabel untuk glukosa sehingga glukosa bisa memasuki sel (Wilbraham dan Matta, 1992).

### II. 3. Glukosa Darah

2

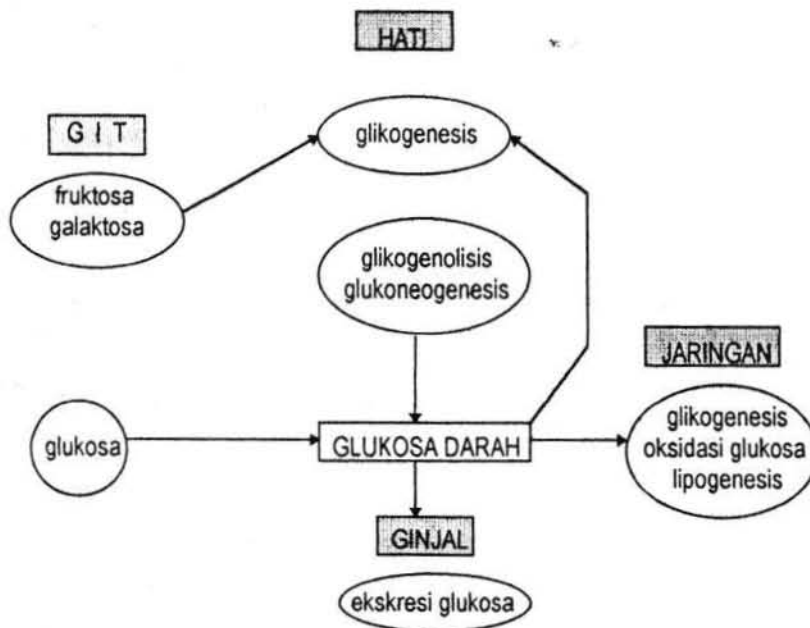
Karbohidrat yang masuk ke saluran pencernaan akan dipecah menjadi monosakarida. Monosakarida yang terbentuk ini merupakan sumber energi bagi aktifitas sel-sel tubuh. Monosakarida utama yang berperan sebagai sumber energi sel-sel tubuh adalah glukosa. Glukosa hasil pemecahan karbohidrat ini selanjutnya memasuki sirkulasi darah. Untuk dapat digunakan sebagai sumber energi, glukosa yang ada di sirkulasi darah harus masuk ke dalam sel-sel tubuh. Masuknya glukosa darah ke dalam sel dibantu oleh insulin melalui difusi yang dipermudah (Calbreath, 1992).

Kadar glukosa darah dipertahankan tetap konstan dalam tubuh. Kenaikan glukosa darah dipertahankan tetap minimal. Kadar glukosa darah hewan nir ruminan adalah antara 80 - 100 mg / 100 ml dengan tingkat kenaikan dan penurunan sekitar 10 - 20 persen (McDonald, 1971). Kadar glukosa darah yang tercatat pada satu waktu adalah hasil dari keseimbangan antara glukosa yang masuk dan keluar sirkulasi darah (Kaneko, 1989).

Keseimbangan masuk dan keluarnya glukosa dalam sirkulasi darah melibatkan mekanisme katabolisme dan anabolisme glukosa darah itu sendiri. Bila glukosa tidak dibutuhkan untuk kebutuhan yang mendesak, maka glukosa dirakit menjadi glikogen

di dalam hati. Proses katabolisme senyawa glikogen terjadi pada saat pasok glukosa rendah. Proses katabolisme senyawa glikogen itu disebut glikogenolisis. Apabila glikogen hati tidak mampu memenuhi kebutuhan glukosa tubuh, maka proses selanjutnya adalah glukoneogenesis yaitu proses sintesis glukosa dari bahan baku bukan karbohidrat.

Peningkatan kadar glukosa darah masih bisa diatasi oleh mekanisme hemostasis tubuh sampai pada ambang batas ginjal. Nagabhushanam *et al* (1983) menyebutkan bahwa ambang batas glukosa darah ginjal pada hewan nir ruminan adalah 160 - 180 mg / 100 ml. Bila kadar glukosa darah naik melewati ambang batas glukosa darah ginjal, glukosa akan keluar lewat urine. Glukosa bisa ditemukan pada urine. Hal ini bisa terjadi karena tubulus ginjal sudah tidak mampu meresorpsi kenaikan glukosa darah (McDonald, 1971)



Gambar 4 : Mekanisme Mempertahankan Kadar Glukosa Darah Tetap Stabil (Newcomer, 1971).

## II. 4. Perubahan Patologik Kelenjar Pankreas

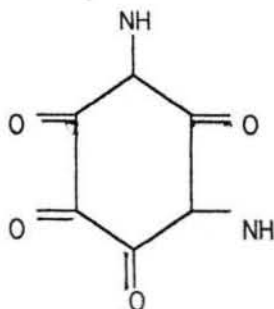
Defisiensi insulin disebabkan oleh perubahan degeneratif sel beta pulau Langerhans. Mekanisme patogen *diabetes mellitus* mengakibatkan defisiensi insulin menjadi lebih berat. Hal ini berhubungan kerusakan sekunder sel-sel pulau Langerhans atau degenerasi selektif sel-sel pulau Langerhans (Capen, 1988).

Perubahan biasanya mengenai pulau Langerhans dan parenkimnya pada keadaan atropi (Runels *et al*, 1960). Perubahan yang terjadi adalah secara kualitatif dan kuantitatif, yaitu jumlah sel berkurang dan terjadi degenerasi hidrofik (Ressang, 1982). Stadium awal dari degenerasi hidrofik, sel mengalami pembengkakan seluler akut. Sel menunjukkan perubahan patologik paling dini yaitu masuknya cairan ekstra seluler ke dalam sel. Banyak terjadi perubahan pada tingkat ultra struktur dan biokimia sebagai akibat kerusakan sel dan dapat menuju pada kematian sel. Perubahan ini dapat kembali normal atau melanjut sampai menimbulkan kematian sel. Bila sel mengalami kematian maka perubahan yang akan tampak adalah batas sel yang tidak jelas, sitoplasma mengambil warna Eosin lebih banyak sehingga berwarna lebih merah daripada sel normal dan warna intinya tidak jelas.

Perubahan patologik kelenjar pankreas akibat sitotoksik bahan kimia yang digunakan pada penelitian *diabetes mellitus*: pengecilan pulau Langerhans, pengurangan jumlah sel beta, degranulasi dan vakuolisasi sel-sel beta (Ressang, 1982). Wahed *et al* (1964) menemukan perubahan patologik kelenjar pankreas akibat penyuntikan *alloxan*. Perubahan patologik tersebut meliputi piknotis, karyoreksis, karyolisis sel beta, dilatasi sinusoid dan infiltrasi sel leukosit pada pulau Langerhans. Klöppel *et al* (1992) menunjukkan perubahan berupa infiltrasi sel polimorfonuklear dan nekrosis sel-sel pulau Langerhans pada tikus yang disuntik *alloxan*.

## II.5. Alloxan

Sejak ditemukannya penyuntikan *alloxan* (2,4,5,6 tetraoksipirimidin) oleh Dunn, Sheehan dan Letchie pada tahun 1943 (Wahed *et al*, 1963) yang dapat menyebabkan nekrosis sel beta kelenjar pankreas, defisiensi insulin dan *diabetes mellitus*, maka bahan kimia ini digunakan secara luas untuk menghasilkan efek diabetes secara eksperimental (Frei *et al*, 1985)



Gambar 5: Struktur kimia *alloxan* ( 2,4,5,6 tetraoksipirimidin) (Wahed *et al*, 1963).

Pola perubahan glukosa darah setelah penyuntikan *alloxan* dosis efektif adalah trifasik: hiperglikemik sementara kemudian hipoglikemik yang diikuti dengan hiperglikemik setelah 24 - 40 jam setelah injeksi *alloxan* (Newcomer, 1971). Efek diabetogenik akan tampak setelah hari kedua penyuntikan dan dapat bertahan sampai dua minggu pertama. Setelah itu kadar glukosa darah kembali ke kadar normal (Wahed *et al*, 1963). *Diabetes mellitus* eksperimental yang diinduksi dengan *alloxan* sangat mirip dengan kejadian alamiah *diabetes mellitus* (McDonald, 1971).

Mekanisme aksi yang jelas dalam menghasilkan perusakan yang selektif belum diketahui. Klöppel *et al* (1992), mencoba mengajukan hipotesis bahwa daya destruksi selektif *alloxan* terhadap sel beta mungkin berhubungan dengan struktur *alloxan* yang

menunjukkan kemiripan dengan glukosa. Hal ini diperkuat oleh pernyataan Colca *et al* (1983) bahwa efek *alloxan* dapat dicegah dengan masuknya glukosa ke dalam sel. Frei *et al* (1985) meneliti mekanisme kerja *alloxan* menginduksi pengeluaran ion Ca dari mitokondria yang mengakibatkan proses oksidasi terganggu. Keluarnya ion Ca ini mengakibatkan gangguan hemostasis yang merupakan awal dari matinya sel. *Alloxan* juga telah diketahui menghambat sintesis proinsulin oleh kelenjar pankreas (Uchigata *et al*, 1982).

*Alloxan* dapat juga digunakan sebagai pengobatan *malignant insulinoma* dan tumor malignan kelenjar endokrin yang lain (Klöppel *et al*, 1992).

## II. 6. Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan sehat berumur 1,5 - 2 bulan dengan berat badan 100 - 150 g. Hewan ini lebih umum digunakan sebagai hewan percobaan dalam laboratorium untuk penelitian sebab ukurannya relatif kecil dan mempunyai sensitifitas yang tinggi terhadap sebagian besar obat. Tikus putih juga merupakan hewan percobaan yang paling terstandarkan dibanding hewan percobaan lain yang dipakai di laboratorium. Hal ini disebabkan karena tikus dapat ditemakkan dan menghasilkan galur yang seragam dan murni.

Kelebihan lain hewan ini adalah lambungnya mempunyai kemiripan anatomi dan fungsi dengan manusia. Tikus putih merupakan hewan omnivora dimana nutrisinya mirip dengan nutrisi manusia (Ghosh, 1971).

Parameter-parameter biokimia yang dapat diukur dengan menggunakan tikus putih ini meliputi 20 macam uji kimia klinik, diantaranya uji glukosa darah (Loeb dan Quimby, 1989).

### BAB III

## MATERI DAN METODE

### III. 1. Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan percobaan dan pemeriksaan kadar glukosa darah dilakukan di Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Jalan Setail Surabaya. Pembuatan dan pengamatan sediaan histopatologi pankreas hewan percobaan dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Penelitian berlangsung mulai 20 Januari sampai 7 Maret 1997.

### III. 2. Bahan dan Materi Penelitian

#### Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan 40 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan berumur 1,5 - 2 bulan dengan berat badan 100 - 150 g. Tikus putih diperoleh dari Unit Pengembangbiakan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta. Induksi hiperglikemik menggunakan *alloxan* yang diperoleh dari Sigma Amerika Serikat. Pemeriksaan kadar glukosa darah menggunakan Glukosa Reflotron kit yang diperoleh dari Boehringer Mannheim Jerman. Anestesi hewan percobaan menggunakan khloroform. Formalin 10 persen digunakan untuk penyimpanan organ pankreas sebelum dijadikan sediaan histopatologi.



## Peralatan Penelitian

Penelitian ini menggunakan empat buah kandang percobaan yang terbuat dari kaca bening dengan penutup anyaman kawat. Pipet mikrohematokrit berlapis heparin digunakan sebagai alat pengambil sampel darah. Alat-alat yang lain adalah alat suntik dan jarum suntik sekali pakai berukuran 1 ml dan 2,5 ml, peralatan pembedahan, papan bedah, pot plastik tempat organ pankreas, timbangan berat badan tikus, timbangan analitik Sartorius, labu Erlenmeyer dan gelas ukur untuk membuat larutan *alloxan*. Glukosa darah diukur dengan alat Reflotron dari Boehringer Mannheim Jerman. Mikroskop digunakan untuk mengamati sediaan histopatologi.

### III. 3. Metode Penelitian

Hewan percobaan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan sebanyak 40 ekor dibagi ke dalam tiga perlakuan dan satu kontrol secara acak. Masing-masing perlakuan, termasuk kontrol terdiri atas sepuluh ekor tikus putih :

- P0 : Kontrol, diukur kadar glukosa darah dan dibedah setelah P3 selesai
- P1 : Perlakuan penyuntikan *alloxan*, diukur kadar glukosa darah dan dibedah 72 jam setelah penyuntikan *alloxan*
- P2 : Perlakuan penyuntikan *alloxan*, diukur kadar glukosa darah dan dibedah 120 jam setelah penyuntikan *alloxan*
- P3 : Perlakuan penyuntikan *alloxan*, diukur kadar glukosa darah dan dibedah 168 jam setelah penyuntikan *alloxan*.

Tikus putih diadaptasikan pada lingkungan penelitian selama tujuh hari. Selama penelitian berlangsung, tikus putih diberi makan dan minum secara bebas (*ad libitum*).

Pakan yang diberikan adalah Par-G Pellet dari Galina dan air minum dari PDAM tanpa dimasak.

Induksi hiperglikemik menggunakan *alloxan*, yang dilarutkan dalam NaCl fisiologis (0,9 persen) dengan konsentrasi larutan 1,6 persen b/v (Widyowati, 1994).

Metode penelitian ini dibagi menjadi empat tahap yaitu induksi hiperglikemik, pengukuran kadar glukosa darah, pengambilan organ pankreas dan pembuatan sediaan histopatologi.

### **Induksi Hiperglikemik**

Induksi hiperglikemik menggunakan *alloxan*. Dosis yang digunakan seragam sebesar 160 mg/kg bb dengan cara penyuntikan intraperitoneal (Lampiran 5). Perlakuan P1, P2 dan P3 mendapatkan perlakuan penyuntikan *alloxan*. P0 tidak mendapat perlakuan penyuntikan *alloxan* dan berfungsi sebagai kontrol. P1, P2 dan P3 masing-masing dibedakan dari waktu pengukuran kadar glukosa darah dan waktu pembedahannya.

### **Pengukuran Kadar Glukosa Darah**

Pengukuran kadar glukosa darah antar perlakuan dibedakan dari waktu pengukurannya. P1 diukur kadar glukosa darahnya 72 jam setelah penyuntikan *alloxan*. P2 diukur 120 jam setelah penyuntikan *alloxan* dan P3 diukur 168 jam setelah penyuntikan *alloxan*. P0 diukur kadar glukosa darahnya setelah P3 selesai. Semua pengukuran kadar glukosa darah dilakukan setelah tikus putih dipuasakan 16-20 jam.

Pengukuran kadar glukosa darah menggunakan Reflotron Glukosa kit dengan alat Reflotron (Lampiran 7). Sampel darah didapat dengan cara penusukan pada pleksus vena optalmika (sinus orbitalis) menggunakan pipet mikrohematokrit (Lampiran 6). Volume darah yang dibutuhkan adalah 100  $\mu$ l.

### **Pengambilan Organ Pankreas**

Pengambilan organ pankreas dilakukan langsung setelah pengukuran kadar glukosa darah masing-masing perlakuan. P1 dibedah 72 jam setelah penyuntikan *alloxan*. P2 dibedah 120 jam setelah penyuntikan *alloxan* dan P3 dibedah 168 jam setelah penyuntikan *alloxan*. P0 dibedah langsung setelah pengukuran kadar glukosa darah selesai dilakukan (Lampiran 8).

Sebelum pengambilan organ pankreas dilakukan anestesi menggunakan kloroform. Organ pankreas selanjutnya dijadikan sediaan histopatologi.

### **Pembuatan Sediaan Histopatologi**

Organ pankreas dijadikan sediaan histopatologi dengan menggunakan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE). Sediaan histopatologi selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 dan 450 kali (Lampiran 9).

Penghitungan sel pulau Langerhans kelenjar pankreas dilakukan dengan cara pengambilan tiga irisan kelenjar pankreas dalam sediaan histopatologi untuk tiap ulangan dalam satu perlakuan. Masing-masing irisan kelenjar dipilih secara acak dua pulau Langerhans kemudian dihitung jumlah sel pulau Langerhansnya. Tiap ulangan dalam satu perlakuan dilakukan enam kali penghitungan. Rata-rata masing-masing ulangan dijumlah dan dirata-rata lagi sehingga didapatkan rata-rata jumlah sel satu perlakuan. Rata-rata jumlah sel masing-masing perlakuan didapatkan setelah 60 kali penghitungan.

Sel-sel yang dihitung adalah sel yang terlihat jelas batas selnya. Penghitungan dilakukan dengan bantuan petak-petak bujursangkar yang lebar masing-masing sisinya 1 mm dan ditempatkan pada lensa okuler mikroskop. Hal ini dilakukan untuk menghindari penghitungan ganda sel pulau Langerhans. Jumlah sel dihitung dengan alat *counter*.

### **III. 4. Peubah yang Diamati**

Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar glukosa darah dan jumlah sel pulau Langerhans kelenjar pankreas.

### **III. 5. Rancangan Penelitian dan Analisis Statistik**

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan analisis korelasi untuk menentukan hubungan antara peningkatan kadar glukosa darah dengan jumlah sel pulau Langerhans kelenjar pankreas (Scheffler, 1987).



Keterangan: Sebelum pengukuran kadar glukosa darah dan dibedah, tikus putih dipuasakan dahulu selama 16-20 jam.

Gambar 6: Skema Alur Kerja Penelitian.

**BAB IV****HASIL PENELITIAN****IV. 1. Kadar Glukosa Darah**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan tentang hubungan antara kadar glukosa darah dengan jumlah sel pulau Langerhans kelenjar pankreas, rata-rata kadar glukosa darah masing-masing perlakuan adalah sebagai berikut:

Tabel 1: Rata-rata Kadar Glukosa Darah Masing-masing Perlakuan.

Perlakuan	Rata-rata Kadar Glukosa Darah
P0	76,6 ± 13,31
P1	118,89 ± 16,30
P2	138,2 ± 17,08
P3	141,3 ± 18,11

**IV. 2. Jumlah Sel Pulau Langerhans Kelenjar Pankreas**

Jumlah rata-rata sel pulau Langerhans kelenjar pankreas masing-masing perlakuan adalah sebagai berikut:

Tabel 2: Jumlah Rata-rata Sel Pulau Langerhans Masing-masing Perlakuan.

Perlakuan	Rata-rata Jumlah Sel
P0	157,3 ± 47,5
P1	60,4 ± 13,74
P2	47,1 ± 4,10
P3	36,9 ± 13,64

Hasil analisis statistik terdapat korelasi antara kadar glukosa darah dengan jumlah sel pulau Langerhans kelenjar pankreas pada tingkat yang sangat bermakna ( $p < 0,01$ ). Koefisien korelasi bernilai negatif sebesar  $r = -0,7009$  (Lampiran 4).

**BAB V****PEMBAHASAN**

Hasil uji statistik menggunakan analisis korelasi menunjukkan hubungan sangat bermakna ( $p < 0,01$ ) dengan koefisien korelasi antar faktor menunjukkan hubungan negatif ( $r = - 0,7009$ ).

Koefisien korelasi menunjukkan arah hubungan antara dua faktor yang diteliti. Koefisien korelasi negatif mengandung arti kenaikan faktor yang satu akan mengakibatkan penurunan faktor yang lain atau sebaliknya (Scheffler, 1987).

Kadar glukosa darah kontrol yang didapatkan pada penelitian ini menunjukkan nilai 76,6 mg/100 ml. Sedangkan pada perlakuan P1, P2 dan P3 menunjukkan kecenderungan kenaikan yang semakin tinggi. Makin lama *alloxan* berada di dalam tubuh tikus putih, makin tinggi kadar glukosa darah yang diukur pada penelitian ini. Di sisi lain, jumlah sel pulau Langerhans kelenjar pankreas menunjukkan gejala penurunan seiring dengan kenaikan kadar glukosa darah.

*Alloxan* (2,4,5,6 tetraoksipirimidin) merupakan bahan kimia yang strukturnya mirip D - glukosa (Colca *et al*, 1983) dan mempunyai efek meningkatkan kadar glukosa darah dengan cara merusak selektif dari sel beta pulau Langerhans kelenjar pankreas.

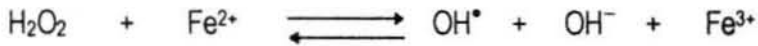
*Alloxan* merupakan oksida lemah dan direduksi menjadi asam dialurat (5 - OH asam barbiturat) oleh thiol. Asam dialurat menghasilkan radikal bebas akibat auto oksidasi *alloxan* dengan  $O_2$ . Proses auto oksidasi *alloxan* disertai dengan terbentuknya radikal superoksida ( $O_2^*$ ) dan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Radikal hidroksil ( $OH^*$ ) yang sangat



reaktif terbentuk dari reaksi Haber-Weiss:



dan reaksi Fenton:



Radikal hidroksil ( $\text{OH}^\bullet$ ) yang sangat reaktif inilah yang berperan terhadap kerusakan sel beta (Frei *et al*, 1985; Uchigata *et al*, 1982).

Uchigata *et al* (1982) menjelaskan bahwa radikal hidroksil ( $\text{OH}^\bullet$ ) dari *alloxan* memegang peranan dalam perusakan sel beta. Proses perusakan sel beta terjadi karena *alloxan* memecah untaian DNA dalam inti sel beta. Pecahnya untaian DNA dalam sel beta ini meningkatkan enzim poli (ADP-ribose) sintetase pulau Langerhans. Peningkatan enzim poli (ADP-ribose) sintetase menyebabkan berkurangnya jumlah NAD dari pulau Langerhans. NAD (nikotinamid adenin dinukleotid) mempunyai kegunaan penting dalam sel (Wilbraham dan Matta, 1992) yaitu: sebagai sumber elektron yang dapat digunakan untuk mereduksi oksigen menjadi air dalam pemaasan sel, NAD dapat dimanfaatkan untuk mereduksi senyawa karbon dalam reaksi sintesis atau anabolisme. Bila NAD berkurang dari sel beta pulau Langerhans, akan terjadi pengaruh terhadap proses metabolisme sel. Terganggunya proses pemaasan sel mengakibatkan tidak dihasilkannya ATP (adenosin tri fosfat) oleh fosforilasi oksidatif dan tanpa ATP yang cukup sel akan mati.

Matinya sel beta pulau Langerhans berakibat berkurangnya ketersediaan proinsulin. Apabila proinsulin berkurang, maka ketersediaan insulin juga akan berkurang. Hal ini disebabkan proinsulin merupakan prekursor dari insulin. Insulin memegang peranan dalam membantu transport glukosa darah ke dalam sel. Insulin bekerja pada sistim membran sel,

sehingga membantu glukosa yang ada dalam sirkulasi darah bisa masuk ke dalam sel (Nagabhushanam *et al*, 1983). Insulin mencapai sel dengan cara berikatan dengan reseptor di membran sel, tetapi insulin tidak ikut masuk ke dalam sel. Ikatan insulin dan reseptor menimbulkan sinyal kimia yang dikirim ke dalam sel (Calbreath, 1992). Reseptor insulin merupakan reseptor yang diaktivasi oleh tirosin protein kinase (Kahn dan Shechter, 1991).

Ketika glukosa memasuki sel, konsentrasi glukosa darah menurun (Wilbraham dan Matta, 1992).

Jumlah sel yang dihitung dalam penelitian ini adalah jumlah sel pulau Langerhans keseluruhan tanpa melihat tipe sel yang ada di dalam pulau Langerhans karena tehnik pewarnaan yang digunakan (Hematoksilin Eosin) tidak dapat membedakan jenis sel yang ada di pulau Langerhans. Sel beta berjumlah kurang lebih 75 persen dari total sel pulau Langerhans (Katzung, 1992) sehingga penurunan jumlah sel pulau Langerhans otomatis juga merupakan penurunan jumlah sel beta. Di lain pihak, sel alfa menunjukkan ketahanan yang lebih tinggi terhadap proses perusakan (Tarui *et al*, 1989).

Kerusakan sel beta menyebabkan menurunnya jumlah sel di pulau Langerhans. Sebagai akibatnya bila jumlah sel beta di pulau Langerhans menurun, sekresi insulin juga akan menurun. Hal ini mengakibatkan proses hemostasis glukosa darah terganggu. Penyerapan glukosa darah ke dalam sel berkurang karena ketidakhadiran pembantu masuknya glukosa darah ke dalam sel. Glukosa dalam darah meningkat, sedangkan sel kekurangan glukosa sebagai sumber energi. Keadaan ini lazim disebut *diabetes melitus* yang tergantung insulin (IDDM = *Insulin Dependent Diabetes Melitus*).

## **BAB VI**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **VI. 1. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil yang didapat dalam penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut:

Peningkatan kadar glukosa darah mempunyai hubungan yang berlawanan dengan jumlah sel pulau Langerhans.

#### **VI. 2. Saran**

Berdasar penelitian yang telah dilakukan, penulis mengajukan saran: perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai berapa penurunan jumlah sel pulau Langerhans terendah yang bisa mengakibatkan peningkatan kadar glukosa darah tertinggi.

## RINGKASAN

Kelenjar pankreas merupakan kelenjar campuran antara eksokrin dan endokrin. Kelenjar eksokrin menghasilkan getah pencernaan, sedangkan kelenjar endokrin menghasilkan hormon. Kelenjar pankreas bagian endokrin berisi 1 - 2 juta pulau Langerhans. Pulau Langerhans berisi empat macam sel yaitu sel alfa, beta, delta dan sel F. Sel beta menghasilkan insulin dan merupakan penyusun pulau Langerhans terbanyak (75 persen) diantara sel yang lain. Insulin bekerja membantu masuknya glukosa darah ke sel. Bila sel beta rusak atau menurun jumlahnya, sekresi insulinpun akan menurun. Menurunnya sekresi insulin menyebabkan masuknya glukosa darah ke dalam sel menjadi berkurang, padahal sel sangat membutuhkan glukosa sebagai sumber energi. Akibatnya kadar glukosa darah akan meningkat dan ginjal tidak mampu lagi meresorpsi. Akhirnya glukosa akan dikeluarkan melalui urine.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara peningkatan kadar glukosa darah dengan jumlah sel pulau Langerhans kelenjar pankreas.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah 40 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan yang dibagi menjadi tiga perlakuan dan satu kontrol. P0 merupakan kontrol, tanpa diberi perlakuan. P1 disuntik *alloxan* dan dibedah setelah 72 jam. P2 disuntik *alloxan* dan dibedah setelah 120 jam. P3 disuntik *alloxan* dan dibedah setelah 168 jam. Dosis yang diberikan seragam untuk perlakuan sebanyak 160 mg/kg bb secara intraperitoneal. Sebelum dibedah hewan percobaan diukur kadar glukosa darah puasanya.

Setelah dibedah, pankreas hewan diambil dan dijadikan sediaan histopatologi. Jumlah sel yang ada di pulau Langerhans dihitung dan dibandingkan dengan kadar glukosa darah.

Analisis statistik menggunakan analisis korelasi untuk melihat hubungan antara peningkatan kadar glukosa darah dengan jumlah sel pulau Langerhans kelenjar pankreas.

Hasil penelitian menunjukkan koefisien korelasi negatif sebesar  $r = - 0.7009$ . Hal ini berarti semakin tinggi kadar glukosa darah, jumlah sel pulau Langerhans kelenjar pankreas akan menurun. Hasil yang didapatkan menunjukkan hubungan yang sangat bermakna ( $p < 0,01$ ). Berdasarkan penelitian ini maka disarankan perlunya upaya menjadikan kadar glukosa darah sebagai alat diagnosis penurunan jumlah sel pulau Langerhans kelenjar pankreas.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. Reflotron manual. Boehringer Mannheim. West Germany.
- Calbreath, D.F. 1992. Clinical Chemistry. A Fundamental Textbook. W.B. Saunders Company. Hartcourt Brace Jovanovich Inc. Philadelphia. London. Toronto. Montreal. Sydney. Tokyo. 255-276.
- Colca, J.R., N. Kotagal., C.L. Brooks., P.E. Lacy., M. Landt and M.L. Mc Daniel. 1983. Alloxan inhibition of a  $Ca^{2+}$  and calmodulin dependent protein kinase activity in pancreatic islets. J. Biol. Chem. 258 (12) : 7260-7263.
- Capen, C.C. 1988. Endocrine System. *In* : R. G. Thomson. Special Veterinary Pathology. B.C. Decker Inc. Toronto. Philadelphia. 419-429.
- Frei, B., K. H. Winterhalter and C. Richter. 1985. Mechanism of alloxan - induced calcium release from rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 260 (12) : 7394-7401.
- Fry, J. 1987. Fact and figure. Diabetes Up Date. 17 Juli. 54-55.
- Goodman and Gillman's. 1990. The Pharmacological Basis of Therapeutic. 8<sup>th</sup> ed. Pergamon Press. New York. 1475, 1484-1487.
- Ghosh, M.N. 1971. Fundamental of Experimental Pharmacology. Scientific Book Agency. Calcuta. 3-11.
- Kahn, C.R. and Y. Shechter. 1991. Insulin, Oral Hypoglycemic Agents and The Pharmacology of The Endocrine Pancreas. *In* : A.G. Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics. Pergamon Press 8<sup>th</sup> ed. Volume II. New York. 1463-1490.
- Kaneko, J. J. 1989. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 4<sup>th</sup> ed. Academic Press. San Diego. New York. Boston. Sydney. Tokyo. Toronto. 45 - 81.
- Katzung, B.G. 1992. Farmakologi Dasar dan Klinik (terjemahan). Penerbit buku kedokteran ECG. Jakarta. 577-591
- Klöppel, G., W. Gepts, P.A. In't Veld. 1992. Morphology of The Pancreas in Normal and Diabetic States. *In* : Alberti, K.G.M.M., R.A. Defronzo, H. Keen, P. Zimmet. International Textbook of Diabetes Mellitus. John Wiley and Sons. Chicester. New York. Brisbane. Toronto. Singapore. 223-251.
- Loeb, W.F., F.W. Quimby. 1989. The Clinical Chemistry of Laboratory Animals. Pergamon Press. New York. 19-23, 73-86.
- McDonald, L.E. 1971. Veterinary Endocrinology and Reproduction. Lea and Febiger. Philadelphia. 68-80.

- Nagabhushanam, R., M.S. Kodarkar., R. Sarojini. 1983. Textbook of Animal Physiology 2<sup>nd</sup> ed. Oxford and IBH Publishing Co. New Delhi. Bombay. Calcutta. 502-535.
- Nair, K.S., S.D. Karki. 1992. Carbohydrate Metabolism In : C.M. Smith., A.M. Reynard. Textbook of Pharmacology. W.B. Saunders Company. Hartcourt Brace Jovanovich Inc. Philadelphia. London. Toronto. Montreal. Sydney. Tokyo. 741-769.
- Newcomer, W.S. 1971. The Pancreas In : J.E. Breazile., C.G. Beames. Jr. and P.T. Cardielhac. Textbook of Veterinary Physiology. Lea and Febiger. Philadelphia. 68-80.
- Ressang, A.A. 1984. Patologi Khusus Veteriner. Team Leader IFAD Project BCDIU. Denpasar. Bali. 85-88.
- Riley, V. 1960. Adaptation of orbital bleeding technique to rapid serial blood studies. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104. 751.
- Runnels, R.A., W.S. Monlux, A.W. Monlux. 1960. Principle of Veterinary Pathology. The Iowa State University Press. Ames. 151-157.
- Scheffler, W.C. 1987. Statistika untuk Biologi, Farmasi, Kedokteran dan Ilmu yang Bertautan. Penerbit ITB Bandung. 168-194.
- Tarui, S., T. Hanafusa, J.I. Miyagawa, A. Miyazaki. 1989. Islet changes in pancreatic diabetes and insulin dependent diabetes mellitus In: S. Baba, A. Tjokropawiro, T. Kaneko, S. Iwai. Malnutrition related diabetes mellitus. MRDM Proc. Sem. International Center for Medical Research. Kobe University of Medicine. Japan. 40-46.
- Tjokropawiro, A. 1987. Diabetes Mellitus. Aspek Klinik dan Epidemiologi. AUP. Surabaya.
- Tjokropawiro, A. 1991. Diabetes Mellitus, Klasifikasi, Diagnosis dan Dasar-dasar Terapi edisi 2. P.T. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 1-7.
- Turner, C.D., J.T. Bagnara. 1988. Endokrinologi Umum (terjemahan). Airlangga University Press. Surabaya. 323-357.
- Uchigata, Y., H. Yamamoto, A. Kawamura, H. Okamoto. 1982. Protection by superoxyde dismutase, catalase and poly (ADP-ribose) syntetase inhibitors against alloxan and streptozotocin induced islet DNA strand and against the inhibition of proinsulin synthesis. J. Biol. Chem. 257 (14) : 6084-6088.
- Wahed, H.A., H.A. Ghaleb and M.R. Hegazy. 1963. Influence of adrenaline on the diabetogenic effect of alloxan in the rat. J. Pharm. Pharmacol. 16 : 422-426.

Waynfort, H.B., P.A. Flecknel. 1992. *Experimental and Surgical Technique in The Rat*. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich Publisher. London., San Diego., New York., Boston., Sydney., Toronto., Tokyo.

Widyowati, E. 1994. Pengaruh pemberian tablet spirulina terhadap penurunan kadar glukosa darah pada tikus putih. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Wilbraham, A.C., M.S. Matta. 1992. *Pengantar Kimia Organik (terjemahan)*. Penerbit ITB Bandung. 103-133, 378-410.



# L A M P I R A N

## Lampiran 1

## Kadar Glukosa Darah Masing-Masing Perlakuan

No.	Kadar Glukosa Darah (mg/100 ml)			
	P0	P1	P2	P3
1	66	97,9	129	139
2	71	103	144	153
3	68	133	121	125
4	71	105	142	118
5	67	117	178	140
6	70	104	125	149
7	70	114	150	116
8	87	127	123	144
9	102	134	148	148
10	103	151	122	181
x	76,6	118,59	138,2	141,3
SD	13,31	16,30	17,08	18,11

## Lampiran 2

## Jumlah Sel Pulau Langerhans Kelenjar Pankreas

## P0

Sediaan Histologi		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Irisan satu	Pulau 1	110	216	179	202	134	186	99	157	258	71
	Pulau 2	95	346	182	187	87	103	113	214	206	206
Irisan dua	Pulau 1	104	289	134	161	117	224	83	195	101	267
	Pulau 2	69	237	169	157	124	62	93	172	255	156
Irisan tiga	Pulau 1	97	295	158	112	96	191	96	136	98	132
	Pulau 2	96	178	163	234	76	97	102	231	150	182
Rata-rata		95	260,3	164,2	175,5	105,7	143,8	97,6	184,1	178	169

## P1

Sediaan Histologi		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Irisan satu	Pulau 1	45	45	69	58	111	53	64	81	56	74
	Pulau 2	55	43	78	88	43	68	41	23	27	61
Irisan dua	Pulau 1	82	32	44	42	79	66	39	51	55	48
	Pulau 2	45	112	46	96	48	52	31	40	18	24
Irisan tiga	Pulau 1	54	39	51	71	119	76	49	111	37	110
	Pulau 2	23	93	32	133	83	81	28	93	39	71
Rata-rata		50,6	60,7	53,3	81,3	80,5	66	42	66,5	38,6	64,7

## P2

Sediaan Histologi		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Irisan satu	Pulau 1	68	48	56	61	69	67	47	29	45	28
	Pulau 2	49	51	46	65	27	39	62	64	45	115
Irisan dua	Pulau 1	44	31	58	54	75	57	58	29	32	34
	Pulau 2	71	60	40	32	42	24	60	78	55	20
Irisan tiga	Pulau 1	30	77	47	41	64	42	49	43	38	35
	Pulau 2	23	12	50	24	24	49	55	23	15	48
Rata-rata		47,5	46,5	49,5	46,2	50,2	46,3	55,2	44,3	38,3	46,7

## P3

Sediaan Histologi		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Irisan satu	Pulau 1	37	47	43	22	64	22	33	55	23	41
	Pulau 2	31	99	45	24	26	19	15	40	31	31
Irisan dua	Pulau 1	45	88	49	31	22	14	25	69	30	28
	Pulau 2	30	68	37	44	52	21	11	69	37	36
Irisan tiga	Pulau 1	33	64	34	17	87	24	45	33	22	22
	Pulau 2	22	48	37	19	23	24	10	16	25	25
Rata-rata		33	69	40,8	26,2	45,7	20,7	23,2	47	33,2	30,5

## Lampiran 3

## Rata-rata Jumlah Sel Pulau Langerhans Kelenjar Pankreas

No.	Rata-rata Jumlah Sel			
	P0	P1	P2	P3
1	95	50,6	47,5	33
2	260,3	60,7	46,5	69
3	164,2	53,3	49,5	40,8
4	175,5	81,3	46,2	26,2
5	105,7	80,5	50,2	45,7
6	143,8	66	46,3	20,7
7	97,6	42	55,2	23,2
8	184,1	66,5	44,3	47
9	178	38,6	38,3	33,2
10	169	64,7	46,7	30,5
x	157,3	60,4	47,1	36,9
SD	47,50	13,74	4,10	13,64

## Lampiran 4

## Analisis Statistik

Analisis statistik berdasarkan analisis korelasi antara kadar glukosa darah dengan jumlah sel pulau Langerhans kelenjar pankreas:

Subyek	Kadar glukosa darah (mg/100 ml)	Jumlah sel
	X	Y
P0	1 66	95
	2 71	260,3
	3 68	164,2
	4 71	175,5
	5 67	105,7
	6 70	143,8
	7 70	97,6
	8 87	184,1
	9 102	178
	10 103	169
P1	11 97,9	50,6
	12 103	60,7
	13 133	53,3
	14 105	81,3
	15 117	80,5
	16 104	66
	17 114	42
	18 127	66,5
	19 134	38,6
	20 151	64,7
P2	21 129	47,5
	22 144	46,5
	23 121	49,5
	24 142	46,5
	25 178	50,2
	26 125	46,3
	27 150	55,2
	28 123	44,3
	29 148	38,3
	30 122	46,7
P3	31 139	33
	32 153	69
	33 125	40,8
	34 118	26,2
	35 140	45,7
	36 149	20,7
	37 116	23,2
	38 144	47
	39 148	33,2
	40 181	30,5

$$\begin{array}{lll}
 n = 40 & \Sigma y = 3017,4 & \Sigma x^2 = 600587,41 \\
 \Sigma x = 4746,9 & \Sigma xy = 311471,84 & \Sigma y^2 = 346273,48
 \end{array}$$

**Koefisiensi Korelasi :**

$$\begin{aligned}
 r &= \frac{\Sigma xy - \frac{(\Sigma x \Sigma y)}{n}}{\sqrt{\left[ \Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n} \right] \left[ \Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{n} \right]}} \\
 &= \frac{311471,84 - \frac{(4746,9 \times 3017,4)}{40}}{\sqrt{\left[ 600587,41 - \frac{(4746,9)^2}{40} \right] \left[ 346273,48 - \frac{(3017,4)^2}{40} \right]}} \\
 &= -0,7009
 \end{aligned}$$

**t Hitung:**

$$\begin{aligned}
 t &= \frac{r}{\frac{\sqrt{1-r^2}}{n-2}} \\
 &= \frac{-0,7009}{\frac{\sqrt{1-(-0,7009)^2}}{40-2}} \\
 &= -6,009 \\
 |t| &= 6,009
 \end{aligned}$$

$$t(0,05 ; 38) = 2,0278$$

$$t(0,01 ; 38) = 2,7408$$

t hitung lebih besar dari t tabel pada taraf kebermaknaan 1 persen

Kesimpulan : Korelasi sangat bermakna ( $p < 0,01$ )



## Lampiran 5

### Suntikan Intraperitoneal (ip)

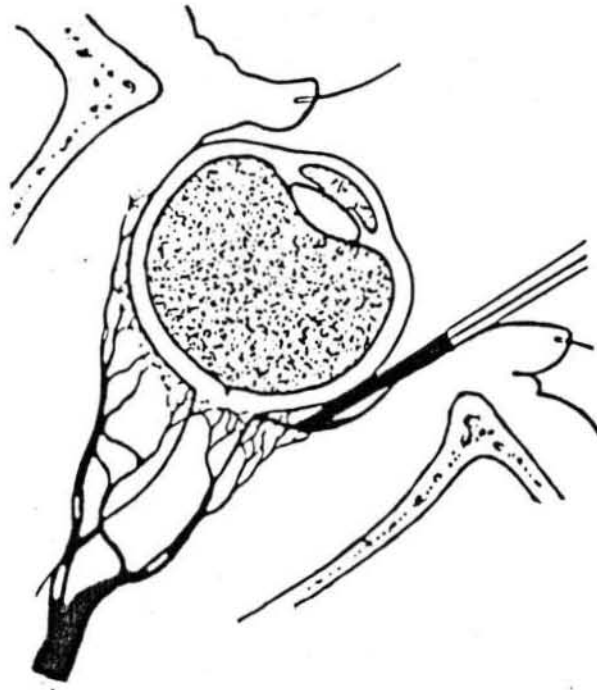
Suntikan intraperitoneal dilakukan untuk pemberian larutan *alloxan*. Waynforth dan Flecknel (1992) menyebutkan bahwa suntikan diberikan lewat kuadran kanan bawah perut. Daerah ini terdapat sebagian besar usus besar. Bagian atas perut merupakan daerah berbahaya untuk suntikan karena di daerah ini terdapat organ hati, lambung dan limpa.

Cara penyuntikan adalah tusukan pendek ujung jarum pada otot perut. Jarum dipegang mendekati vertikal. Cara ini berguna untuk menyisipkan jarum pada ruang peritoneal. Daya tampung ruang peritoneal tikus putih dengan berat badan kurang lebih 200 g adalah 10 ml (Waynforth dan Flecknel, 1992).

## Lampiran 6

### Pengambilan Sampel Darah

Cara pengumpulan sampel darah dalam penelitian ini adalah penusukan pleksus vena optalmika (sinus orbitalis). Hewan percobaan dijepit lehernya dengan sela antara dua jari telunjuk dan jari tengah tangan kiri. Ibu jari dan telunjuk kiri mempertahankan mata tetap terbuka. Kepala dipertahankan agar tidak bergerak. Pipet mikrohematokrit dipegang menggunakan telunjuk dan ibu jari tangan kanan ditusukkan ke bagian medial sudut mata kanan. Penusukan dilakukan secara hati-hati sambil diputar kearah kanan kiri. Kedalaman penusukan kurang lebih 3 mm. Arah tusukan adalah sepanjang sisi orbit sampai mengenai pleksus vena optalmika. Pembuluh darah pleksus vena optalmika mudah pecah bila bersentuhan dengan ujung pipet. Darah akan mengalir melalui pipet dan tidak perlu dilakukan penghisapan.



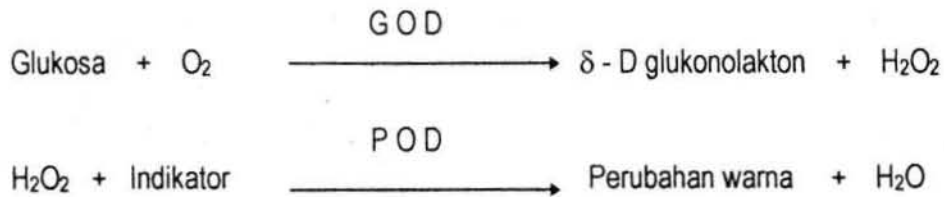
Gambar 7: Pleksus Vena Optalmika dan Posisi Penusukan Pipet Hematokrit (Riley, 1960).

## Lampiran 7

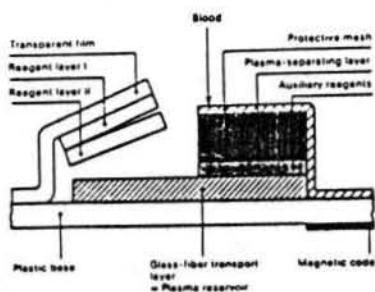
### Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Kadar glukosa darah dalam penelitian ini diukur dengan alat Reflotron. Volume darah yang diperlukan adalah 100  $\mu$ l.

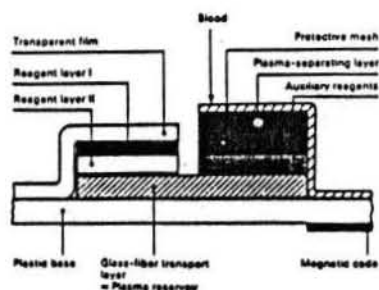
Prinsip pengukuran kadar glukosa darah dengan Reflotron ini adalah reaksi enzimatik glukosa oksidase. Reaksinya adalah :



Glukosa dioksidasi oleh oksigen menjadi  $\delta$  - D glukonolakton dengan dikatalisis oleh enzim glukosa oksidase (GOD).  $\text{H}_2\text{O}_2$  yang terbentuk bersama  $\delta$  - D glukonolakton akan mengoksidasi indikator 3, 3', 5, 5' Tetrametilbenzidin (TMB). Dengan bantuan enzim peroksidase (POD) akan terjadi perubahan warna. Perubahan warna yang terjadi merupakan konsentrasi glukosa darah sampel yang proporsional. Intensitas warna dibaca dengan panjang gelombang 642 nm. Kadar glukosa darah sampel akan muncul pada *display* Reflotron setelah 120 detik secara digital.



Gambar 8: *Reagent Carrier* Glukosa Reflotron Kit Sebelum Bereaksi.



Gambar 9: *Reagent Carrier* Glukosa Reflotron Kit Sesudah Bereaksi.

Reflotron Glukosa kit yang merupakan tempat berlangsungnya reaksi oksidasi glukosa berisi *reagent carrier*. Di dalam *reagent carrier* terdapat lapisan yang bisa memisahkan plasma dari darah. Plasma yang telah memisah dari darah selanjutnya ditampung dalam *plasma reservoir*. Dua lapis reagen yang ada dalam *reagent carrier* selanjutnya akan bereaksi dengan plasma sehingga menyebabkan perubahan warna reagen.

## Lampiran 8

### Pengambilan Pankreas

Sebelum pembedahan, hewan percobaan dianestesi terlebih dahulu. Hewan percobaan dimasukkan dalam tempat tertutup yang di dalamnya telah ditetesi khloroform. Setelah hewan percobaan teranestesi kemudian diletakkan pada papan bedah. Keempat kakinya difiksasi pada papan bedah menggunakan jarum. Dilakukan insisi dalam keadaan terlentang sepanjang garis tengah abdomen. Insisi dilakukan 2/3 panjang abdomen posterior sampai prosesus xiphoideus.

Pankreas tikus putih berbentuk difus, menyebar dan bertaut dengan limpa, lambung dan duodenum. Masing-masing pertautan dengan organ-organ tersebut harus dipisahkan untuk mendapatkan pankreas. Pankreas yang telah didapatkan disimpan dalam larutan formalin 10 persen.

## Lampiran 9

### Pembuatan Sediaan Histopatologi

Cara pembuatan sediaan histopatologi adalah:

1. Fiksasi dan pencucian
2. Dehidrasi dan *clearing*
3. Infiltrasi (*embedding*)
4. Pembuatan balok parafin
5. Pengirisan dengan mikrotom
6. Pewarnaan
7. Penutupan dengan *cover glass*
8. Pemeriksaan mikroskopis.

#### 1. Fiksasi dan Pencucian

Tujuan : Menghentikan proses metabolisme jaringan, mematikan kuman, menjadikan jaringan lebih keras sehingga mudah dipotong, mencegah degenerasi post mortem sehingga struktur sel masih normal dan meningkatkan afinitas jaringan terhadap bermacam warna.

Cara kerja : Pembedahan, organ diambil, dimasukkan formalin 10 persen, pencucian dengan air mengalir 30 menit.

## **2. Dehidrasi dan *Clearing***

Tujuan : Menarik air dari jaringan, membersihkan dan menjernihkan jaringan.

Cara kerja : Organ yang telah dicuci, alkohol 70 persen, alkohol 80 persen, 95 persen, 96 persen, 100 persen I, 100 persen II, xylol I, xylol II, masing-masing selama 30 menit.

## **3. Infiltrasi atau *Embedding***

Tujuan : Menginfiltrasi jaringan dengan parafin. Parafin akan menembus ruang antar sel dan dalam sel. Parafin akan menjadikan jaringan lebih tahan terhadap pemotongan.

Cara kerja : Organ dimasukkan dalam parafin cair I, kemudian dimasukkan dalam oven 55-56 °C selama 30 menit, kemudian dipindahkan ke parafin cair II dan dimasukkan dalam oven yang sama selama 30 menit.

## **4. Pembuatan Balok Parafin**

Tujuan : Memudahkan pemotongan jaringan.

Cara kerja : Organ dimasukkan dalam cetakan besi yang berisi parafin cair 56-58 °C. Cetakan diolesi gliserin untuk mencegah melekatnya parafin pada cetakan. Tunggu sampai parafin mengeras.

## **5. Pengirisan dengan Mikrotom**

Tujuan : Memotong jaringan setipis mungkin agar dapat dilihat di bawah mikroskop.

Cara kerja : Pemotongan dilakukan secara acak. Hasil pemotongan diletakkan dalam air hangat 48 °C sampai jaringan mengembang dengan baik. Letakkan jaringan pada kaca obyek yang sebelumnya diolesi albumin telur, selanjutnya dikeringkan dalam *hot plate*.



## 6. Pewarnaan

Tujuan : Memudahkan melihat perubahan pada jaringan. Digunakan pewarnaan Hematoksilin Eosin. Sediaan akan tampak warna merah untuk sitoplasma dan biru untuk inti sel.

Cara kerja : Pewarnaan dilakukan dengan metode Harris.

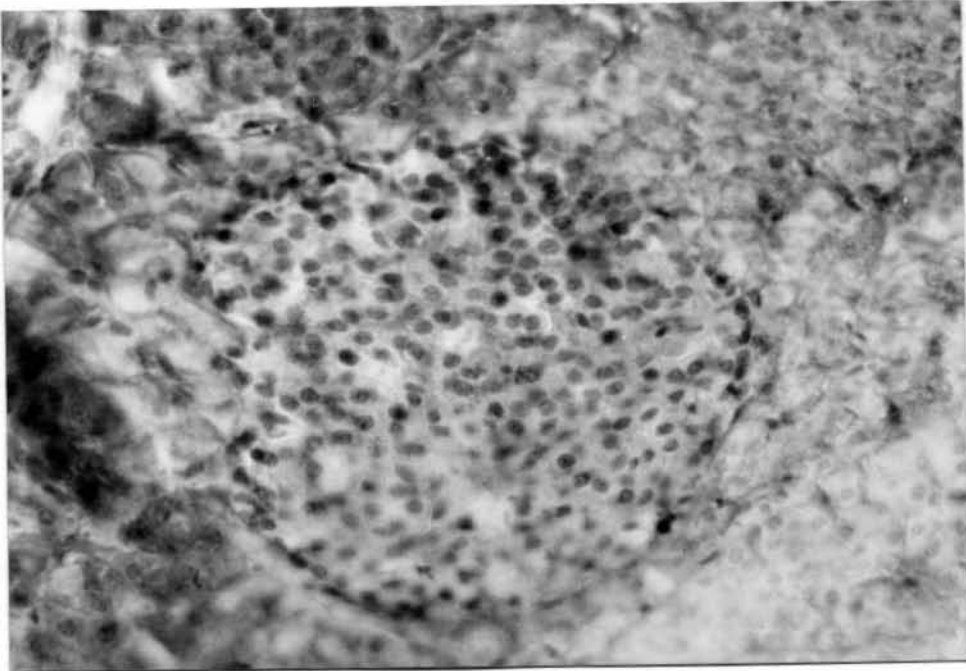
Jaringan tipis yang telah dikeringkan dimasukkan dalam xylol I selama 3 menit dan satu menit pada xylol II. Kemudian berturut-turut alkohol absolut I dan II, alkohol 96%, 80%, 70% dan air kran selama satu menit. Selanjutnya jaringan dimasukkan ke dalam metode Harris selama 5 - 10 menit, air kran lima menit, alkohol asam 3 - 10 kali celupan, air kran empat kali celupan, amoniak enam kali celupan, air kran selama 10 menit, aquadest lima menit, zat warna Eosin 1/4 menit, aquadest lima menit. Selanjutnya dimasukkan dalam alkohol 70%, 80%, 96%, 100% I, 100% II masing-masing dua menit kemudian dibersihkan dari sisa pewarnaan.

## 7. Mounting

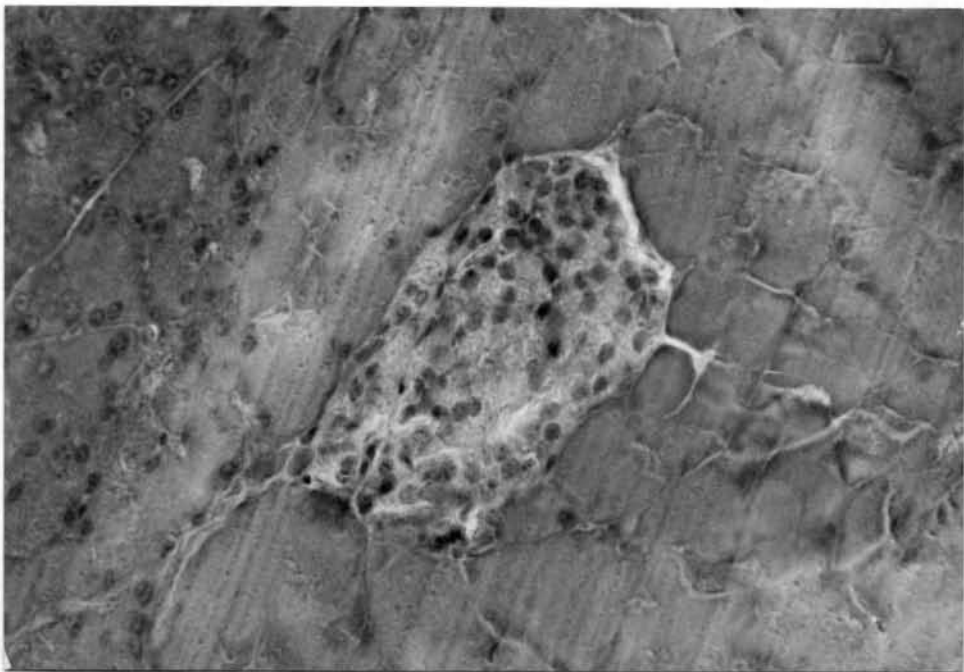
Penutupan obyek glass dengan coverglass. Sebelumnya ditetesi Entelan

## 8. Pemeriksaan Mikroskopis

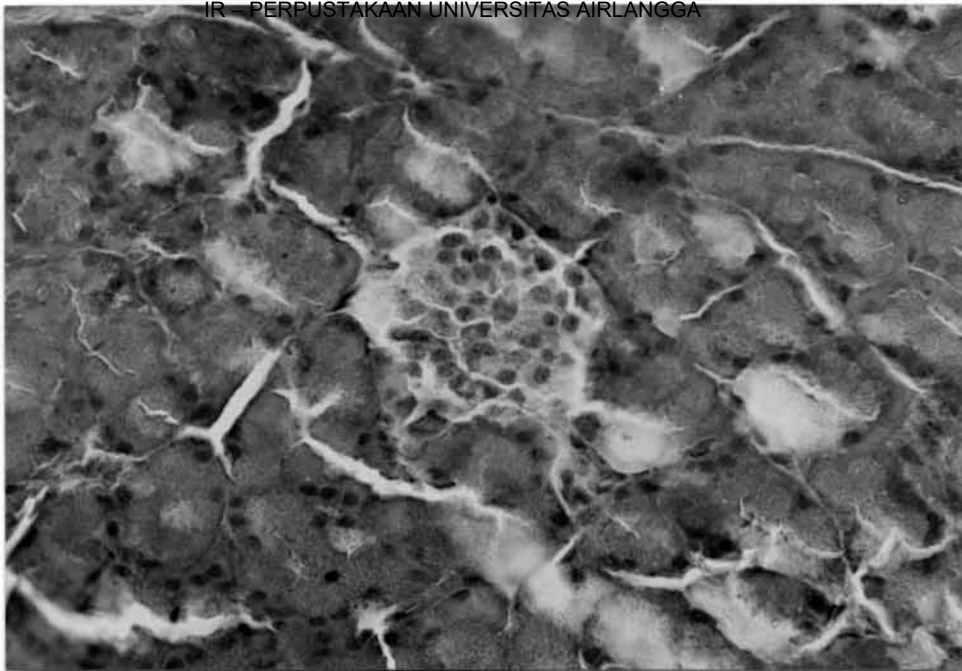
Dilakukan pada pembesaran 100 kali dan 450 kali.



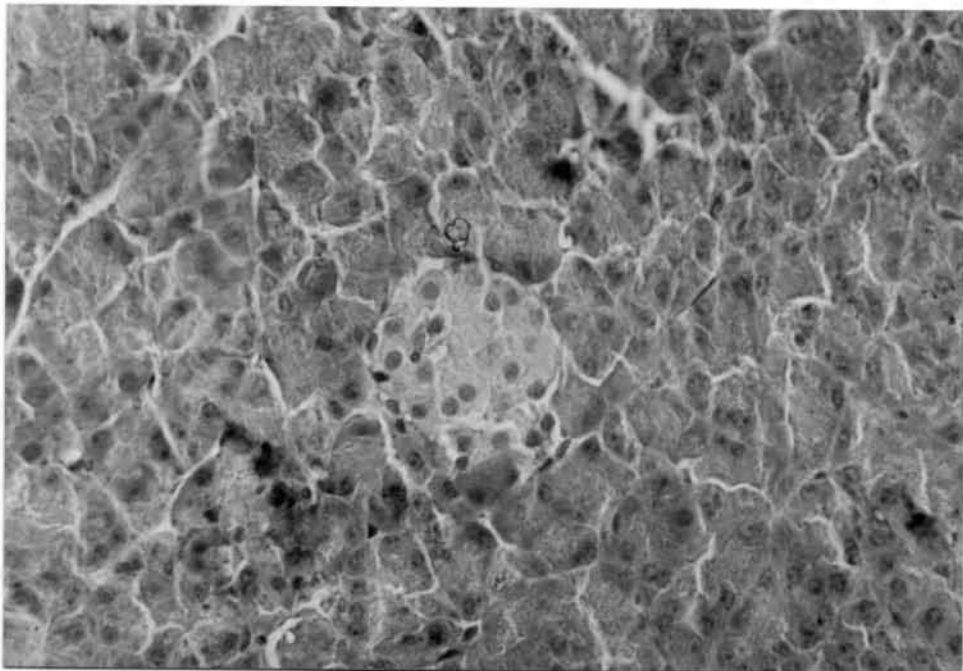
Gambar 10: Gambaran Histopatologi Pulau Langerhans Kelenjar Pankreas Kontrol pada Pembesaran 450x dengan Pewarnaan HE.



Gambar 11: Gambaran Histopatologi Pulau Langerhans Kelenjar Pankreas Perlakuan P1 Pembesaran 450x. Tampak pengurangan jumlah sel pulau Langerhans dibandingkan dengan kontrol.



Gambar 12: Gambaran Histopatologi Pulau Langerhans Kelenjar Pankreas Perlakuan P2 Pembesaran 450x. Tampak pengurangan jumlah sel pulau Langerhans dibandingkan dengan perlakuan P1.



Gambar 13: Gambaran Histopatologi Pulau Langerhans Kelenjar Pankreas Perlakuan P3 Pembesaran 450x. Tampak pengurangan jumlah sel pulau Langerhans dibandingkan dengan perlakuan P2.



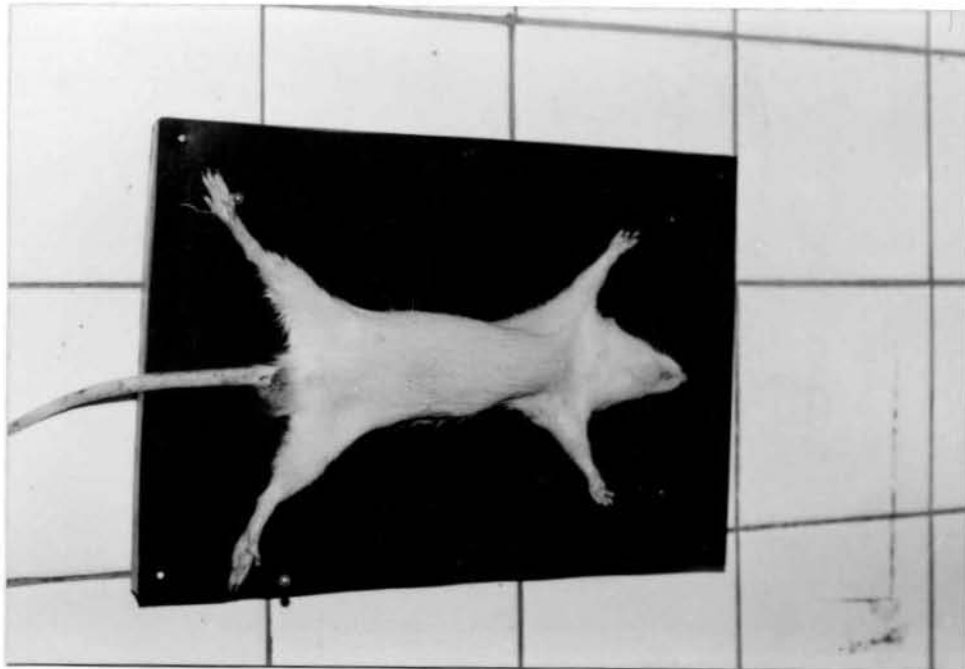
Gambar 14: Peralatan Penelitian yang Digunakan.



Gambar 15: Pengambilan Sampel Darah dengan Cara Penusukan pada Pleksus Vena Optalmika (Sinus Orbitalis) Menggunakan Pipet Mikrohematokrit.



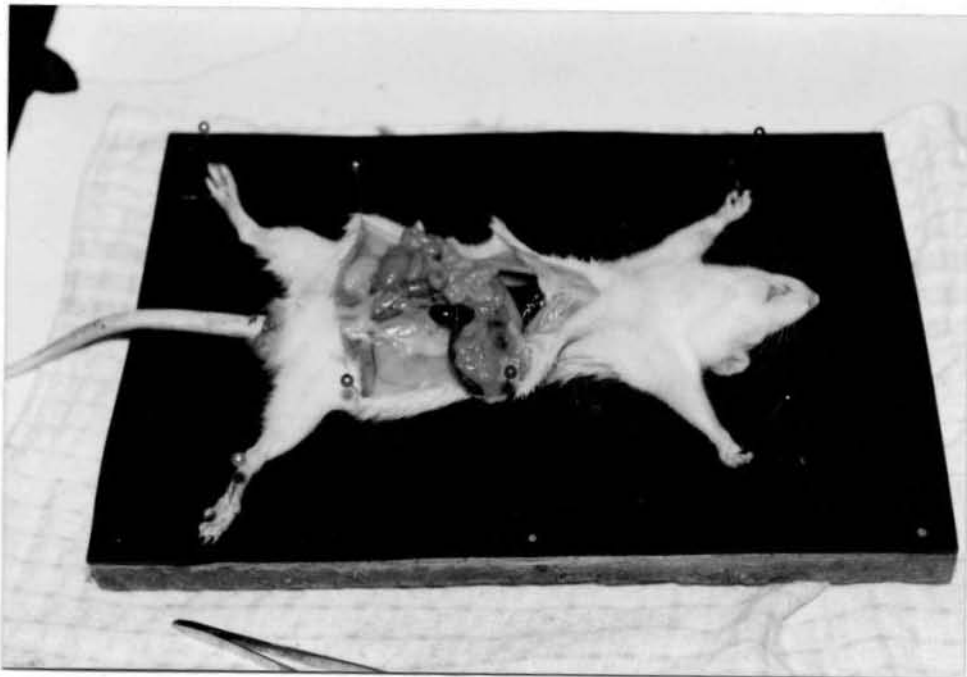
Gambar 16: Reflotron (Alat Pengukur Kadar Glukosa Darah Secara Kuantitatif).



Gambar 17: Hewan Percobaan Setelah Dianestesi dan Siap Didedah.



Gambar 18: Hewan Percobaan Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar Jantan Di Kandang Percobaan.



Gambar 19: Hewan Percobaan Setelah Didedah. Arah Panah Menunjukkan Kelenjar Pankreas.