

## Pengaruh Transplantasi *Allograf Pancreatic Stem Cell* terhadap Kadar Insulin dan *C-Peptide* Tikus Putih Penderita Diabetes Melitus Tipe I

Boedi Setiawan,<sup>1</sup> Hani Plumeriastuti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Klinik Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, <sup>2</sup>Departemen Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya

### Abstrak

Penyakit diabetes melitus merupakan salah satu penyakit degeneratif yang hingga kini masih belum tuntas terapinya dan masih menjadi ancaman serius bagi dunia kesehatan di Indonesia dan dunia. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui kadar insulin dan *C-peptide* tikus putih penderita diabetes melitus tipe I yang diberikan transplantasi *allograf pancreatic stem cell* dengan laparotomi intrapankreatik. Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan (Juli–Desember 2014) di lab. *Stem Cell, Institute of Tropical Diseases*, Universitas Airlangga, Surabaya. Dua belas tikus putih jantan *Rattus novergicus* galur Wistar dibagi secara acak menjadi dua kelompok. Kelompok pertama (P0) disuntik aloksan 150 mg/kg bobot badan tanpa terapi *stem cell*. Kelompok kedua disuntik aloksan dengan dosis 150 mg/kg bobot badan dan diterapi dengan  $1 \times 10^6$ /kg bobot badan *stem cell* pankreas secara laparotomi intrapankreatik (P1). Akhir penelitian adalah pada hari ke-31 percobaan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar glukosa darah pada akhir penelitian berbeda sangat nyata ( $p < 0,01$ ) antara kelompok perlakuan yang menerima terapi *stem cell* (P1) dengan P0 kontrol positif, meskipun nilai kadar glukosa darah rata-rata tidak senormal seperti pada hari ke-1. Tingkat *C-peptide* dan insulin P0 dan P1 berbeda sangat nyata ( $p < 0,01$ ). Dapat disimpulkan bahwa terapi *stem cell* secara laparotomi intrapankreatik dapat menurunkan kadar glukosa darah, serta meningkatkan kadar *C-peptide* dan insulin. [MKB. 2016;48(3):135–39]

**Kata kunci:** Diabetes melitus, insulin, *stem cell*

## Insulin and C-peptide Levels in Diabetes Mellitus Type I White Rats treated with Pancreatic Stem Cell Allograft Transplantation

### Abstract

Diabetes mellitus is one of the degenerative diseases in which the therapy still remains unresolved and is still a serious threat to the global health, including to the health of Indonesian people. The aim of this study was to describe the level of insulin and C-peptide in diabetes mellitus type I white rats treated with pancreatic stem cell allograft through intrapancreatic laparotomy. This study was conducted at the Institute of Tropical Diseases, Universitas Airlangga, Surabaya in a 6 month period (July–December 2014). Twelve male white rats *Rattus novergicus* Wistar strain, were randomly divided into two groups. The first group (P0) was injected by alloxan, 150 mg/kg body weight, without stem cell therapy. Another group was injected by alloxan, 150 mg/kg body weight, and was treated with  $1 \times 10^6$ /kg body weight pancreatic stem cell through intrapancreatic laparotomy (P1). The experiment was finalized on the 31th day of the experiment. The results showed that the blood glucose levels at the end of experiment were highly significantly different  $p < 0.01$  between the treatment group that received stem cell therapy (P1) and P0 positive control, although the average value of blood glucose levels was not as normal as on the first day. C-peptide and insulin levels of P0 and P1 group differed significantly ( $p < 0.01$ ). It can be concluded that stem cell therapy through intrapancreatic laparotomy can reduce blood glucose levels and increase the levels of C-peptide and insulin. [MKB. 2016;48(3):135–39]

**Key words:** Diabetes mellitus, insulin, stem cell

---

**Korespondensi:** Boedi Setiawan, drh., MP, Departemen Klinik Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Kampus C Unair, Jalan Mulyorejo Surabaya 60115, *mobile* 081330449998, *e-mail* boedisetiawan71@gmail.com

## Pendahuluan

Penyakit diabetes melitus merupakan salah satu penyakit degeneratif yang hingga kini masih menjadi ancaman serius bagi dunia kesehatan di Indonesia dan dunia. Berbagai negara telah mengalami pergeseran pola penyakit yang semula (*infectious disease*) menjadi penyakit yang sifatnya kronis dan penyakit degeneratif. Diabetes melitus adalah penyakit degeneratif yang terus meningkat penderitanya. Penderita diabetes melitus di Provinsi Jawa Timur sebanyak 300 ribu penderita dari penduduk 33 juta orang dan di Indonesia total penderita diabetes melitus sebanyak 2,5 juta orang.<sup>1</sup> Diabetes melitus disebabkan oleh pola gaya hidup dan prevalensinya meningkat secara global di dunia. Negara-negara di Asia berkontribusi lebih dari 60% dari populasi diabetes dunia karena bangsa Asia mempunyai predisposisi genetik untuk terkena diabetes melitus.<sup>2</sup>

Diabetes melitus adalah sekelompok penyakit metabolik ditandai dengan hiperglikemia yang dihasilkan dari kerusakan sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya. Beberapa faktor lain seperti hiperlipidemia dan peningkatan stres oksidatif memainkan peran yang penting dalam patogenesis diabetes. Penyakit ini memiliki sifat progresif dan berhubungan dengan risiko tinggi komplikasi.<sup>3</sup>

Berbagai upaya dilakukan untuk mengurangi risiko komplikasi, kematian, dan mengurangi biaya pengobatan diabetes melitus dalam hal ini yang akan diteliti adalah diabetes melitus tipe I. Terapi aktual saat ini terhadap diabetes melitus tipe I adalah pemberian obat hipoglikemik oral dengan menggunakan insulin melalui injeksi dipadu dengan monitoring terhadap kadar gula serta adaptasi perubahan gaya hidup. Selama menjalani terapi pasien dihadapkan dengan dilema terapeutik, yaitu kontrol yang baik dalam waktu yang lama dan komplikasi diabetes melitus tipe 1 berupa gangguan kardiovaskular, hipertensi, kebutaan, nefropati, dan neuropati.<sup>4</sup>

Transplantasi pankreas dan transplantasi sel *islet* pankreas sebagai pengobatan alternatif masih banyak kendala. Pertama-tama karena organ donor yang kurang, biaya yang sangat mahal, serta komplikasi perioperatif yang terkait dengan transplantasi pankreas dan risiko jangka panjang kronik yang bersifat immunosupresi.<sup>4</sup>

Saat ini masih cukup sulit untuk mengetahui sumber utama *stem cell* yang memiliki potensi kuat untuk menghasilkan sel  $\beta$  pankreas produksi insulin. Sel  $\beta$  pankreas adalah sel yang sangat kompleks serta mampu berdiferensiasi. *Adult*

*stem cell*, khususnya yang berasal dari pankreas terlihat menjadi lebih mudah berdiferensiasi menjadi sel  $\beta$  pankreas fungsional yang mengatur kadar glukosa dengan tepat melalui regulasi sekresi insulin.<sup>5</sup> Sel  $\beta$  pankreas memegang peranan penting dalam homeostasis glukosa. Defisiensi dan destruksi sel  $\beta$  pankreas akibat autoimunitas dari sel *host* akan menyebabkan penurunan sekresi insulin dan mengakibatkan diabetes melitus tipe I. *Ex vivo replacement* dan *regeneration  $\beta$  sel pancreas producing insulin* adalah topik utama selama penelitian dekade terakhir.<sup>6</sup>

Secara garis besar, terdapat dua metode transplantasi *stem cell* ke dalam tubuh pasien yang diterapi. Metode pertama adalah secara langsung mengimplantasikan *stem cell* tersebut ke dalam jaringan/organ tubuh pasien yang telah rusak. Metode kedua adalah mengimplantasikan *stem cell* melalui pembuluh darah, baik yang berada dekat dengan lokasi jaringan/organ yang telah rusak atau pembuluh darah manapun yang terdapat di dalam tubuh pasien.<sup>7</sup> Hingga saat ini para peneliti di berbagai pusat riset *stem cell* masih berupaya menemukan metode dan jalur administrasi *stem cell* ke dalam tubuh yang paling optimal.

Berdasarkan latar belakang yang sudah diuraikan sebelumnya maka perlu dilakukan penelitian teknik aplikasi atau jalur administrasi *stem cell* secara laparotomi intrapankreatik dalam keadaan ini *stem cell* diaplikasikan untuk memperbaharui sel  $\beta$  pankreas produksi insulin pada tikus penderita diabetes melitus tipe I.

## Metode

Penelitian ini dilakukan selama enam bulan (Juli–Desember 2014) di lab. *Stem Cell, Institute of Tropical Diseases, Universitas Airlangga, Surabaya*. Sebelum dilakukan penelitian, perlu dipersiapkan terlebih dahulu materi terapi berupa *stem cell* dan juga hewan coba diabetes melitus tipe 1 (DMI).

Sebagai model penyakit pada manusia, tikus lebih banyak menguntungkan dibanding dengan *mouse* serta organisme lainnya. Tikus paling banyak dipergunakan dalam penelitian medis, dan dengan suksesnya isolasi ESC (*embryonic stem cell*) pada tikus maka penggunaan tikus sebagai hewan model semakin meningkat. Tikus adalah model yang sangat baik untuk penyakit kardiovaskular, terutama pada penyakit stroke dan juga hipertensi. Lebih mudah memantau fisiologi tikus. Selain hal tersebut dalam banyak

kasus, fisiologi tikus yang menyerupai kondisi manusia. Tikus lebih cerdas daripada *mouse* dan mampu belajar lebih banyak jenis tugas yang penting untuk penelitian kognitif. Ukuran hewan meningkatkan penggunaannya sebagai model untuk dilakukan prosedur pembedahan dan juga untuk pemberian obat. Dalam model diabetes melitus, fisiologi tikus menyerupai penyakit pada manusia, termasuk kemungkinan terpaparnya racun, stres, diet, dan vaksinasi.<sup>8</sup>

Pembuatan tikus menjadi DMI dengan jalan disuntik aloksan. Hewan coba berupa tikus putih jantan *Rattus norvegicus strain* Wistar yang sehat berumur dua sampai tiga bulan dengan bobot badan 100–150 gram sebanyak 12 ekor, diukur kadar gula darah menggunakan stik merk *Accucheck* dan kadar *C-peptide* dan kadar insulin dengan ELISA, kemudian dibuat menjadi DMI. Tikus disuntik aloksan dengan dosis 150 mg/kgBB secara intraperitoneal.<sup>9</sup> Setelah 96 jam lalu diukur kadar gula darah dengan menggunakan stik merk *Accucheck* serta kadar *C-peptide* dan kadar insulin dengan ELISA, hasilnya dibandingkan antara sebelum disuntik dan sesudah disuntik aloksan. Tikus yang telah disuntik dengan aloksan kemudian diadaptasikan selama 7 hari yang sebelumnya dipastikan apakah sudah menjadi DMI atau belum dengan cara pengukuran kadar gula darah, *C-peptide*, dan kadar insulin.

Pembuatan materi terapi dengan cara isolasi dan kultur sel pankreas. Untuk mendapatkan organ pankreas maka dilakukan laparotomi pada tikus, kemudian organ pankreasnya diambil lalu dicincang sampai halus. Untuk mendapatkan sel pankreas maka terlebih dahulu di-*digest* menggunakan tripsin 16 mL selama 40 menit lalu di-*stirer* pada suhu 37°C. Lalu ditambahkan FBS 1,5 mL dengan tujuan menyetop tripsinasi. Selanjutnya dilakukan proses penyaringan dan juga disentrifus 1.600 rpm selama 10 menit, supernatannya dibuang. Peletnya diambil dan dikultur dalam medium RPMI dan ITS.<sup>10</sup>

Perlakuan tersebut diberikan dengan tahapan sebagai berikut: hewan coba dibagi menjadi 2 kelompok P0 dan P1 P0 tanpa diterapi dengan

*stem cell*, sedangkan P1 diberikan *stem cell* secara laparotomi intrapankreatik dengan dosis 200.000 sel.<sup>10</sup> Kemudian dilakukan pengukuran kadar gula darah, *C-peptide*, dan kadar insulin dengan cara mengukur darah vena yang diambil dari vena ekor. Kadar gula darah diukur dengan menggunakan *A-Q Chek*. Kadar gula acak diukur pada jam 10.00 WIB. Pemeriksaan kadar gula darah, *C-peptide*, dan kadar insulin ini dilaksanakan pada hari ke -1, hari ke-6, dan hari ke-37 penelitian. Data yang diperoleh dilakukan analisis statistik dengan uji-t.

## Hasil

Kadar glukosa darah pada penelitian ini ialah untuk mengetahui apakah hewan coba sudah mengalami hiperglikemik sebagai salah satu gejala klinis diabetes melitus tipe I maka diukur kadar glukosa darahnya. Hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel 1. Kadar gula darah tikus baik pada P0, P1 pada hari ke-6 nilai rata-ratanya di atas 200 mg/dL. Tikus diabetes adalah tikus yang mempunyai kadar glukosa darah >200 mg/dL. Kadar glukosa darah tikus normal 50–135 mg/dL.<sup>9</sup> Langkah selanjutnya setelah hewan coba itu mengalami diabetes melitus tipe I maka dilakukan pemberian terapi dengan transplantasi *stem cell* pada hari ke-7 secara laparotomy intrapankreatik (P1) dan dibandingkan dengan kelompok perlakuan (P0) sebagai kontrol positif, yaitu hewan coba diabetes melitus tipe I yang tidak diberi terapi. Pada hari ke-37 (30 hari perlakuan) dilakukan pengukuran kadar glukosa darah lagi (lihat Tabel 1). Analisis statistik terhadap kadar glukosa darah pada akhir perlakuan (hari ke-37) memperlihatkan perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ ) antara kelompok perlakuan yang mendapat terapi *stem cell* (P1) dan P0 kontrol positif. Kadar glukosa darah rata-rata tidak dapat normal seperti pada hari ke -1.

*Stem cell* yang telah dikultur sebelum ditransplantasikan lalu dikarakterisasi untuk

**Tabel 1 Rata-rata dan Simpangan Baku Kadar Glukosa Darah Hasil Perlakuan**

| Perlakuan | Kadar Glukosa Darah (mg/dL) (X ± SD) Hari ke-1 | Kadar Glukosa Darah (mg/dL) (X ± SD) Hari ke-6 | Kadar Glukosa Darah (mg/dL) (X ± SD) Hari ke-37 |
|-----------|--|--|---|
| P0        | 84,83±3,92                                     | 238,67±40,33                                   | 283,33 <sup>a</sup> ±42,74                      |
| P1        | 85,67±7,44                                     | 258,83±36,22                                   | 127,17 <sup>b</sup> ±7,44                       |

Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ )

Tabel 2 Rata-rata dan Simpangan Baku Kadar *C-peptide* Darah Hasil Perlakuan

| Perlakuan | Kadar <i>C-peptide</i> Darah (ng/L) (X ± SD) Hari ke-1 | Kadar <i>C-peptide</i> Darah (ng/L) (X ± SD) Hari ke-6 | Kadar <i>C-peptide</i> Darah (ng/L) (X ± SD) Hari ke-37 |
|-----------|--|--|---|
| P0        | 0,15±0,10  | 0,09±0,09  | 0,15 <sup>a</sup> ±0,10                                 |
| P1        | 0,39±0,15  | 0,28±0,01  | 0,31 <sup>b</sup> ±0,02                                 |

Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ )

mengetahui apakah *stem cell* tersebut memiliki fungsi yang menyerupai dengan sel  $\beta$  pankreas yang menyekresi insulin maka diukur kadar insulin dan *C-peptide*-nya. Pemeriksaan insulin dan *C-peptide* menggunakan ELISA ditemukan kadar insulin dan *C-peptide* pada supernatan sel kultur, memperlihatkan bahwa sel tersebut menyekresi insulin dan *C-peptide* (Gambar). Pada Tabel 2 dan Tabel 3 terlihat bahwa analisis statistik kadar *C-peptide* dan insulin darah kelompok P0 kelompok P1 berbeda sangat nyata ( $p < 0,01$ ). Hal ini menandakan bahwa pemberian terapi *stem cell* secara laparotomi intrapancreatik mampu meningkatkan kadar *C-peptide* dan insulin.

## Pembahasan

Hasil pengukuran kadar glukosa darah telah memperlihatkan terdapat penurunan setelah pemberian terapi *stem cell* secara laparotomi intrapancreatik, sedangkan kadar *C-peptide* dan insulin terjadi peningkatan. Hal ini menandakan bahwa telah ada perbaikan jaringan pankreas pada kelompok yang diberi terapi *stem cell* (P1). Pankreas adalah suatu organ yang mempunyai kemampuan yang terbatas untuk berproliferasi, walaupun demikian bahwa sel ini masih dapat berproliferasi dan berdiferensiasi secara *in vitro* menjadi sel *islet*.<sup>11</sup>

Karbohidrat dan glukosa pada khususnya merupakan sumber energi yang penting bagi organisme hidup. Sesudah makan, kenaikan

kadar glukosa darah dengan cepat merangsang sekresi insulin yang menyebabkan peningkatan metabolisme dalam beberapa menit melalui transpor glukosa dan disimpan oleh otot serta sel lemak. Insulin menghambat sekresi glukagon serta menurunkan konsentrasi asam bebas serum, dan memberikan kontribusi penurunan produksi glukosa hepatic. Pada orang normal sekitar setengah glukosa yang telah dikonsumsi diubah menjadi energi melalui jalur glikolisis dan sekitar setengahnya disimpan sebagai lemak serta glikogen dengan bantuan insulin dan juga enzim lain.

Produksi insulin konstan dalam sel-sel  $\beta$  tidak terpengaruh oleh kadar glukosa darah. Selanjutnya, insulin disimpan dalam *vacuoles pending release* melalui eksositosis, yang terutama dipicu oleh makanan, yaitu makanan yang mengandung glukosa akan mudah diserap. Pemicu utama sekresi insulin adalah kenaikan kadar glukosa darah setelah makan.<sup>12</sup>

Peningkatan kadar *C-peptide* dan insulin disebabkan karena telah beregenerasinya sel-sel di pulau Langerhans. Hal ini dibuktikan bahwa regenerasi pulau Langerhans yang terbatas dapat terjadi pada pankreatektomi parsial tikus putih muda. Pada kondisi tersebut, regenerasi pulau-pulau Langerhans baru merupakan diferensiasi yang diduga dari epitel duktus, rekapitulasi pembentukan pulau-pulau Langerhans selama embriogenesis dan juga diduga bahwa *stem cell* tersebut pada masa dewasa dapat diaktivasi sehingga terjadi regenerasi.<sup>13</sup>

Transplantasi memakai allograf pankreatik

Tabel 3 Rata-Rata dan Simpangan Baku Kadar Insulin Darah Hasil Perlakuan

| Perlakuan | Kadar Insulin Darah (Pg/L) (X ± SD) Hari Ke-1 | Kadar Insulin Darah (Pg/L) (X ± SD) Hari Ke-6 | Kadar Insulin Darah (Pg/L) (X ± SD) Hari Ke-37 |
|-----------|---|---|--|
| P0        | 0,24±0,13                                     | 0,04±0,01                                     | 0,10 <sup>a</sup> ±0,01                        |
| P1        | 0,49±0,38                                     | 0,11±0,04                                     | 0,24 <sup>b</sup> ± 0,28                       |

Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0,01$ )



*stem cell* secara laparotomi intrapankreatik dapat menyebabkan restorasi pengendalian glukosa, sekresi insulin, *C-peptide*, dan perbaikan sel beta pankreas paling bagus. Hal ini dikarenakan populasi sel pankreas yang dipakai mengandung sel progenitor yang berfungsi langsung secara endokrin dan juga eksokrin sehingga langsung mencapai target sasaran. Terapi insulin hanya dapat mengakibatkan peningkatan pada kadar insulin, tetapi tidak didapatkan perbaikan sel pankreas itu sendiri. Dengan demikian, *stem cell* dapat mengatasi permasalahan diabetes melitus langsung dari akar penyebabnya, yaitu dengan memperbaiki sel pankreas itu sendiri terutama sel  $\beta$  pankreas.<sup>14</sup>

#### Daftar Pustaka

1. Wulandari O, Martini S. Perbedaan kejadian komplikasi penderita diabetes melitus tipe 2 menurut gula darah acak. *J Berkala Epidemiol.* 2013;1(2):182-91.
2. Ramachandran A, Snehalatha C, Shetty AS, Nanditha A. Trends in prevalence of diabetes in Asian Countries. *World J Diabetes.* 2012;3(6):110-7.
3. Dewanjee S, Bose SK, Sahu R, Mandal SC. Antidiabetic effect of matured fruits of *diospyros peregrine* in alloxan induced diabetic rats. *Int J Green Pharmacy.* 2008; 2(2):95-9.
4. Schuetz C, Markmann JF. Immunogenicity of  $\beta$ -cells for autologous transplantation in type 1 diabetes. *Pharmacol Res.* 2015;98(1):60-8.
5. Pandey S. Stem cell transplantation: a future for diabetic patient. *Int J Pharmaceutic Sci Rev Res.* 2010;2(1):68-71.
6. Oliver-Krasinski JM, Stoffers DA. On the origin of the beta cell. *Genes Dev.* 2008; 22(15):1998-2021.
7. Halim D, Murti H, Sandra F, Boediono A, Djuwantono T, Setiawan B. *Stem cell: dasar teori dan aplikasi klinis.* Jakarta: Erlangga; 2010.
8. Iannaccone PM, Jacob HJ. Editorial: rats!. *Dis Model Mech.* 2009;2(5-6):206-10.
9. Chougale AD, Panaskar SN, Gurao PM, Arvindekar AU. Optimization of alloxan dose is essential to induce stable diabetes for prolonged period. *Asian J Biochem.* 2007;2(1):402-8.
10. Purwati, Fedik AR, Sony W, Anas P, Eric H, Helen S. Transplantasi autologus bone marrow mesenchymal stem cell dan allogenic pancreatic stem cell untuk perbaikan sel beta pankreas pada eksperimental diabetes melitus. *Prosiding InSiNas.* 2012 [diunduh 5 Oktober 2014]. Tersedia dari: <http://biofarmaka.ipb.ac.id/biofarmaka>.
11. Kangralkar VA, Patil SD, Bandivadekar RM. Oxidative stress and diabetes: a review. *International J Pharmaceutic Appl.* 2010;1(1):38-45.
12. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the study of diabetes. *Diabetes Care.* 2005;28(9):2289-2304.
13. Baiu D, Merriam F, Odorico J. Potential pathways to restore  $\beta$ -cell mass: pluripotent stem cells, reprogramming, and endogenous regeneration. *Curr Diab Rep.* 2011;11(5):392-401.
14. Li WC, Rukstalis JM, Nishimura W, Tchipashvili V, Habener JF, Sharma A, dkk. Activation of pancreatic-duct-derived progenitor cells during pancreas regeneration in adult rats. *J Cell Sci.* 2010;123(16):2792-3802.