

**PERBEDAAN JUMLAH LIMFOSIT DAERAH PALS
(PERIARTERIAL LYMPHOID SHEATH) ANTARA MENCIT SEHAT DAN MENCIT DIABETES**

Arni Kusuma Dewi, Iskantijah Budi Rahardjo, Ari Gunawan
Departemen Anatomi dan Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga

ABSTRACT

Diabetes mellitus complication that much happen and need attention is infection. Bacterial infection getting worse with the decrease of cellular immunity diabetic patient. Antibiotic treatment has not been optimally yet without immunity intervention to the patient. This study is done to evaluate immunity state in diabetes with count lymphocyte in PALS spleen then compare with healthy ones. Thirty six mice BALB/c strain, sex male were separated into 2 groups, the control group and the treatment group. The control groups were healthy and had standart diet, while the treatment groups were diabetic group and had high fat diet to induct diabetes for ten weeks. After 10 weeks, both groups were induced with histamine intraperitoneally to show immune respons. Mice were sacrificed for taken the spleen to make histology preparation with routine staining. Account of lymphocyte both groups compared with statistical tools by t test independent samples. Account of lymphocyte cell in the PALS area shown that the control had significant more than the treatment ($p < 0,0001$). Smaller number of lymphocyte in diabetic is one of the proofs that there are decrease of immunity.

Keyword: Diabetes mellitus, BALB/c mice, lymphocyte of PALS spleen

ABSTRAK

Komplikasi diabetes mellitus yang banyak terjadi dan membutuhkan perhatian adalah infeksi. Tingkat keparahan infeksi bakteri semakin meningkat pada penurunan imunitas seluler individu diabetes. Pengobatan antibiotik tidak dapat bekerja optimal tanpa intervensi imunitas. Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari status imun diabetes dengan menghitung jumlah limfosit pada daerah PALS (*Periarterial Lymphoid Sheath*) limpa kemudian dibandingkan dengan jumlah limfosit individu sehat. Tiga puluh enam ekor mencit jantan strain balb/c dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol adalah kelompok sehat yang mendapat makanan standar, sedangkan kelompok perlakuan adalah kelompok diabetes yang mendapat makanan tinggi lemak untuk menginduksi diabetes selama 10 minggu. Setelah 10 minggu, kedua kelompok diberi histamin intraperitoneal untuk menimbulkan respon imun. Mencit dikorbankan untuk diambil limpa untuk dibuat preparat histologi dengan pengecatan rutin. Jumlah limfosit kedua kelompok dibandingkan secara statistik dengan uji t sampel bebas. Jumlah limfosit pada daerah PALS menunjukkan kelompok kontrol lebih banyak daripada kelompok perlakuan ($p < 0,0001$). Jumlah limfosit pada diabetes yang lebih sedikit merupakan salah satu bukti bahwa ada penurunan status imun.

Kata kunci: Diabetes mellitus, mencit balb/c, limfosit pada PALS limpa

Korespondensi: Arni Kusuma Dewi, Departemen Anatomi dan Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo no 47, Surabaya 60131, Jawa Timur, telp. 031-5053804, fax. 031-5022075, email: arnidewi82@gmail.com.

Latar belakang

Diabetes Mellitus (DM) adalah salah satu penyakit metabolik yang memiliki jumlah penderita yang semakin meningkat di dunia. Survey *International Diabetes Federation* (IDF) menyebutkan bahwa penderita DM di dunia pada tahun 2011 telah mencapai 366 juta orang (Rebolledo, et al., 2011). Masalah kesehatan yang ditimbulkan oleh karena

penyakit dasarnya ataupun komplikasinya, menyebabkan pengembangan diagnosis dan terapi yang lebih baik terus dikembangkan. Salah satu komplikasi diabetes mellitus yang sering ditemui dan perlu mendapat perhatian adalah ulkus diabetes. Infeksi kuman yang menyerang ulkus diabetes serta adanya penurunan imunitas seluler penderitanya, membuat penyakit ini sulit

disembuhkan (Collier, 2004; Powers, 2006). Pembuktian adanya penurunan imunitas seluler pada diabetes belum banyak dilakukan. Pembuktian ini berguna untuk pengembangan pengobatan infeksi diabetes yang melibatkan imun tubuh. Saat ini, pengembangan terapi imunitas sangat diperlukan karena antibiotik saja dirasa belum optimal untuk penyembuhan infeksi pada diabetes.

Tujuan

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui penurunan imunitas diabetes dengan menghitung jumlah limfosit pada daerah PALS limpa pada mencit diabetes dan mencit sehat serta membandingkan keduanya. Penelitian ini diharapkan dapat menambah ilmu pengetahuan baru di bidang penyakit dalam khususnya infeksi pada diabetes mellitus dan dapat memacu penelitian serupa secara klinis pada manusia sehingga dapat digunakan untuk tindakan pencegahan dan pengobatan infeksi pada diabetes mellitus.

Metode dan materi

Sebanyak 36 ekor mencit dipilih dari populasi mencit di unit hewan coba departemen biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, yaitu yang memiliki kriteria mencit strain BALB/c, berjenis kelamin jantan, umur 12 minggu, berat badan 25 – 30 g dan sehat (Hume, 1972). Penelitian ini telah mendapat persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian FKH UA. Mencit dikelompokkan secara *simple random sampling* menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol mendapat makanan standar, sedangkan kelompok perlakuan mendapat makanan tinggi lemak dengan komposisi lemak 22,8 % untuk menginduksi diabetes mellitus selama 10 minggu. Pada akhir minggu ke sepuluh gula darah puasa selama 18 jam kedua kelompok diukur dengan alat glukotest.

Selanjutnya kedua kelompok diinduksi dengan histamin intraperitoneal dengan dosis 10 mg/20 g BB untuk menimbulkan respon imun (Abbas, et al., 2008; Espersen, et al., 1984; Jutel, et al., 2001). Mencit dikorbankan setelah 8 jam untuk diambil limpanya. Limpa digunakan untuk menghitung jumlah limfosit pada daerah PALS dengan membuat preparat histologi pewarnaan H.E.

Jumlah limfosit dihitung pada daerah PALS limpa dengan pembesaran 1000x mikroskop cahaya dan memakai gratikule. Luas daerah PALS yang dihitung seluas kotak gratikule. Daerah PALS diambil dari 3 lapang pandang. Jumlah limfosit yang didapat kemudian dirata – rata. Data jumlah limfosit diuji signifikansi perbedaannya dengan uji t dua sampel bebas.

Hasil

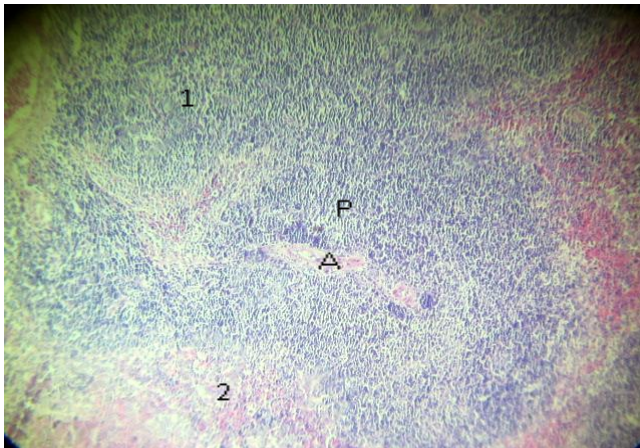
Pemeriksaan kadar gula darah puasa pada akhir minggu ke sepuluh kelompok perlakuan, yang menunjukkan diabetes (≥ 125 mg/dl) berjumlah 16 ekor dari 18 ekor dengan rerata $156,56 \pm 8,91$ mg/dl. Sedangkan kelompok kontrol, rerata gula darah puasanya sebesar $72,22 \pm 7,80$ mg/dl. Selanjutnya data rerata jumlah limfosit daerah PALS limpa kedua kelompok mencit terangkum pada tabel 1.

Tabel 1. Distribusi Frekuensi Jumlah Limfosit Kontrol dan Perlakuan

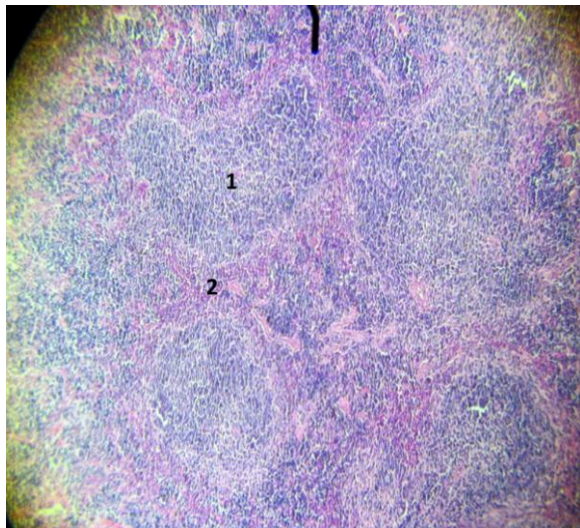
Variabel	Kontrol (n=18)	Perlakuan (n=16)
Jumlah limfosit	309,08±17,0	277,75±8,8

Data jumlah limfosit daerah PALS limpa yang didominasi sel T menunjukkan kelompok kontrol rerata $309,08 \pm 16,99$, sedangkan kelompok perlakuan $277,75 \pm 8,8$. Hal ini menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan jumlah limfosit kontrol dengan perlakuan, yang didukung dengan analisa statistiknya ($p < 0,0001$).

Data ini didukung oleh gambaran histologi limpa mencit yang diambil dari sediaan histologi secara *longitudinal section*. Kelompok kontrol memiliki daerah pulpa putih dan daerah PALS yang lebih luas dibandingkan kelompok perlakuan dilihat pada lapang pandang yang sama yaitu 400x. Hal ini menunjukkan jumlah limfosit daerah PALS kontrol lebih banyak dari perlakuan (gambar 1 dan 2).



Gambar 1. Histologi limpa mencit kontrol pembesaran 100x, pewarnaan H.E, (1) Pulpa putih, (2) Pulpa merah, (A) Arteria sentralis, (P) PALS



Gambar 2. Histologi limpa mencit perlakuan pembesaran 100x, pewarnaan H.E, (1) Pulpa Putih, (2) Pulpa Merah

Diskusi

Perbedaan jumlah limfosit antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol didapatkan setelah kelompok perlakuan mendapatkan makanan tinggi lemak. Penelitian ini identik dengan yang dilakukan Tanaka (1998) dengan metode berbeda yaitu sel imun pada tikus yang secara genetik obese. Hasil menunjukkan adanya penurunan jumlah sel T limpa. Penyebab perbedaan jumlah limfosit kelompok perlakuan dengan kontrol dapat dijelaskan sebagai berikut. Kondisi hiperglikemia pada diabetes diduga

memacu stres mitokondria. Penelitian yang dilakukan Khan, et al. (2011) menyebutkan bahwa baik pada penderita diabetes mellitus akut maupun yang telah mengalami komplikasi kronis terdapat hubungan negatif antara *mitochondrial DNA content* pada limfosit dengan level *Hemoglobin A1c* (HbA1c). Hal ini menandakan semakin tinggi kondisi hiperglikemia yang ditunjukkan dengan level HbA1c, maka semakin banyak kerusakan pada mitokondria limfosit (Khan, et al., 2011). Mitokondria sendiri sangat diperlukan untuk penyedia energi bagi berbagai proses metabolisme tubuh termasuk metabolisme untuk fungsi sel limfosit. Penelitian Khan ini didukung dengan teori yang diungkapkan Murray (1997) dan Powers (2006). Keduanya mengatakan bahwa pengaktifan sel imun terganggu pada kondisi diabetes baik itu oleh karena obesitas atau genetik. Mekanisme yang mengenai mitokondria sel lainnya mengatakan kondisi diabetes menyebabkan timbulnya stress oksidatif, yang mengganggu pengaktifan sel imun, termasuk limfosit. Gangguan tersebut dapat terjadi pada ekspresi reseptor IL-2 dan atau gangguan pada *signaling pathway* (Murray, 1997; Powers, 2006). Sehingga berdasarkan penelitian Khan, teori dari Murray serta Powers, dapat membantu menjelaskan bahwa jumlah limfosit kelompok perlakuan lebih sedikit dibandingkan kelompok kontrol dapat disebabkan oleh adanya stres oksidatif pada semua bagian sel, termasuk mitokondria.

Teori lain menyebutkan bahwa jumlah limfosit kelompok perlakuan yang lebih sedikit, dapat juga disebabkan oleh induksi makanan tinggi lemak (Tanaka (1998) *cit.* Samartin (2001)). Makanan ini diberikan untuk mengkondisikan mencit menjadi obesitas. Tubuh yang obesitas mengalami perubahan metabolisme dan perubahan hormon yang dihasilkan oleh jaringan adiposa serta perubahan komposisi *micronutrient* dalam tubuh. Ketiga faktor tersebut menyebabkan penurunan fungsi imun tubuh. Jaringan adiposa sehat mengeluarkan hormon leptin untuk mengatur nafsu makan serta sebagai kostimulator pengaktifan sel imun. Obesitas menurunkan sekresi hormon leptin. Selain itu, zinc dan *iron* yang dibutuhkan untuk membangkitkan respon imun, penyerapannya terganggu pada tubuh yang obese (Samartin & Ranjit, 2001).

Simpulan

Ada perbedaan signifikan jumlah limfosit kontrol dengan perlakuan ($p < 0,0001$). Jumlah limfosit pada kelompok perlakuan (diabetes) lebih sedikit. Hal ini membuktikan adanya penurunan imunitas seluler pada diabetes. Mekanisme penurunan jumlah sel imun dapat terjadi melalui beberapa sebab berdasarkan teori yang telah ada.

Daftar pustaka

- Abbas, A.K. Andrew H.L. & Shiv P., 2008. *Cellular and Molecular Immunology*. Sixth edition. Canada: Saunders Elsevier.
- Collier, M., 2004. *Recognition and Management of Wound Infection*, World Wide Wounds. Diunduh: 08 Februari 2012 dari <http://www.worldwidewounds.com/2004/january/Collier/Management-of-Wound-infection.html>.
- Espersen, F. et al., 1984. Staphylococcus aureus peptidoglycan induces histamine release from basophil human leukocytes in vitro. *Infection and Immunity*, 46(3), hal.710-14.
- Hume, C.W., 1972, *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animal*. Fourth edition. London: Churchill Livingstone.
- Jutel, M. et al., 2001. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptor. *Nature*, 413, hal.420-25.
- Khan, S. et al., 2011. Role and clinical significance of lymphocyte mitochondrial dysfunction in type 2 Diabetes Mellitus. *Science*, 158(6), hal.344-359.
- Murray, et al., 2009. Carbohydrates of Physiologic Significance di dalam: *Harper's Illustrated Biochemistry*. Edisi ke 28.USA: The McGrawHill Companies.
- Powers, A.C., 2006. *Harrison's Endocrinology: Diabetes Mellitus*. New York: McGraw-Hill.
- Rebolledo, F.A. Teran, S. & Jorge, E.P., 2011. *The Pathogenesis of the Diabetic Foot Ulcer: Prevention and Management*. Mexico: Centro Integral de Medicina Avanzada (CIMA).
- Samartin, S. & Ranjit, K.C., 2001. Obesity, overnutrition and the immune system. *Nutrition Research*. 21, hal.243-262.