

EFEK METFORMIN TERHADAP KARAKTERISTIK INSULA PANKREATIKA MODEL TIKUS OBESITAS

Sitti Annisa¹, David Pakaya²

¹ Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako

² Departemen Histologi, Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako

Korespondensi Penulis:

Nama : David Pakaya

Alamat : Kampus FK Untad Jl. Sukarno Hatta KM 9,5 Tondo Palu

Nomor Telepon : 081356377422

Email : davidpakaya09@gmail.com

Abstrak

Latar belakang : Peradangan kronis seperti pada obesitas dapat memicu kematian sel-sel pada dan merusak struktur insula pankreatika. Metformin memiliki efek anti peradangan yang berfungsi mengendalikan kerusakan insula pankreatika pada obesitas.

Tujuan penelitian : mengetahui efek metformin terhadap karakteristik insula pankreatika pada model tikus obesitas.

Metode : Menggunakan eksperimental study dengan rancangan *post test only controlled design* dengan pendekatan kualitatif dan kuantitatif. Penelitian ini menggunakan 15 ekor tikus putih galur wistar jantan berusia 10-12 minggu, berat badan (BB) 200-250 gram. Tikus dibagi dalam 3 kelompok perlakuan; K1: kontrol normal; K2: model obesitas; K3: model obesitas + terapi metformin 250mg/kgBB. Tikus dimodifikasi menjadi model obesitas dengan pemberian *high fat diet* (HFD). Dilakukan pengukuran BB secara berkala. Gambaran histopatologi insula pankreatika didapatkan dari pewarnaan *Hematoxylin eosin* (HE) pada 5 lapang pandang yang dipilih secara acak dan tidak tumpang tindih dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus CX23 perbesaran 400x. Hasil gambar dikuantifikasi menggunakan perangkat lunak ImageJ. Data dianalisis dengan *GrapPhard Prism 8.0.0* menggunakan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*.

Hasil : Berat badan kelompok K3 yang diterapi metformin lebih rendah dari K1 dan K2. Morfologi insula pankreatika menunjukkan perbedaan bermakna ($p=0,002$). Morfometri insula pankreatika menunjukkan perbaikan pada diameter dan perimeter tetapi tidak bermakna secara statisitk ($p=0,1226$). Jumlah insula pankreatika tidak dipengaruhi ($p=0,19$).

Kesimpulan : Metformin mampu menurunkan BB dan mampu memperbaiki morfologi insula pankreatika, namun tidak pada morfometri dan jumlah insula pankreatika pada tikus model obesitas.

Kata kunci: metformin, insula pankreatika, obesitas.

Pendahuluan

Kejadian obesitas telah meningkat hampir tiga kali lipat sejak tahun 1975 diseluruh dunia. Penyebab utama dari obesitas yaitu ketidakseimbangan antara kalori yang dikonsumsi dan dikeluarkan. Konsumsi makanan dengan kadar lemak dan gula yang tinggi serta penurunan

aktivitas fisik juga menyebabkan obesitas.¹ Kondisi obesitas dapat memicu terjadinya hiperglikemia, yang akan berdampak pada kerusakan berbagai organ lain.²

Peradangan kronis tingkat rendah pada obesitas memiliki karakteristik akumulasi sel imun serta peningkatan produksi sitokin dan kemokin pro-inflamasi. Sistem imun menunjukkan replikasi makrofag lokal atau perekrutan monosit yang bersirkulasi. Kondisi radang ini menunjukkan penurunan sekresi insulin oleh sel β pada insula pankreatika tikus model obesitas. Insula pankreatika merupakan target terapeutik potensial untuk memodulasi fungsi sel β pada individu dengan obesitas dan atau DMT2.³

Metformin merupakan obat anti diabetes yang paling banyak digunakan dan dilaporkan memiliki efek anti peradangan melalui pengaktifan *adenosine monophosphate protein kinase* (AMPK). Pemberian metformin pada kondisi obesitas menunjukkan perbaikan sekresi insulin dan kondisi hiperglikemia. Efek metformin tersebut berlangsung pada sel β yaitu untuk sekresi insulin, regulasi transkripsi gen insulin, dan viabilitas sel.^{4,5}

Metode

Sampel Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan tikus putih galur Wistar jantan, berusia 10-12 minggu, berat badan (BB) 200 - 250 gram, dan berjumlah 15 ekor. Tikus dibagi dalam 3 kelompok Perlakuan; K1: kontrol normal; K2: kontrol negatif (model obesitas); K3: model obesitas + terapi metformin 250 mg/kgBB. Tikus dimodifikasi menjadi hewan model obesitas dengan pemberian *high fat diet* (HFD) sebanyak 20 gram perhari selama 63 hari. Dilakukan pengukuran BB secara berkala pada setiap minggu sampai hari ke-63. Penelitian ini telah memperoleh izin dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako dengan nomor: 6035/UN 28.1.30/KL/2021.

Pewarnaan Histologi

Tikus diterminasi dan dinekropsi pada hari ke-63. Jaringan dibuat dalam blok paraffin dan dipotong dengan ketebalan 4 μ m. Pewarnaan jaringan menggunakan *Hematoksilin eosin*. Pengamatan pada 5 lapang pandang dipilih secara acak dan tidak tumpang tindih dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus CX23* perbesaran 40 \times dan 400 \times dan *numerical aperture* (NA):1,25 dengan perangkat lunak *optilab*. Hasil gambar akan dianalisis secara kuantitatif menggunakan perangkat lunak ImageJ dan menggunakan sistem skoring.

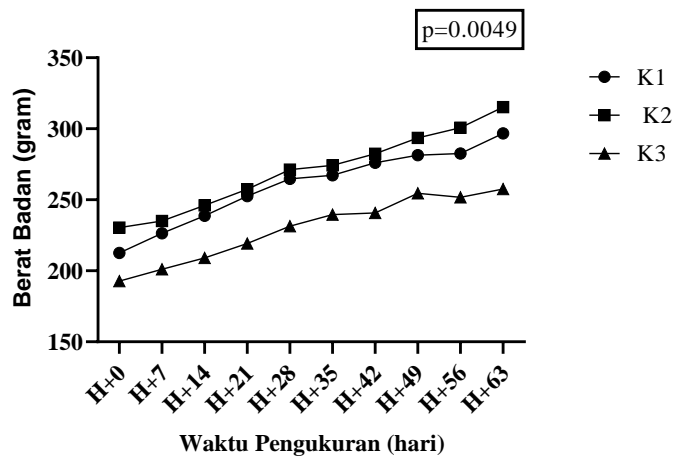
Analisis Statistik

Data histologis pankreas dianalisis secara kuantitatif dan kualitatif. Analisis kuantitatif dilakukan dengan menilai tingkat kerusakan, menghitung jumlah, diameter, dan perimeter insula pankreatika dengan menggunakan *Grapphad Prsima 8.0.0* menggunakan uji nonparametrik *Kruskal Wallis*. Analisis kualitatif dilakukan secara deskriptif berdasarkan morfologi insula pankreatika.

Hasil

Berat badan Tikus Model Obesitas

Berikut data berat badantikus yang di bagi dalam tiga kelompok perlakuan yang dirawat hingga hari ke 63 pasca pemberian *high fat diet* (HFD). Data berat badan dapat dilihat pada gambar 1.



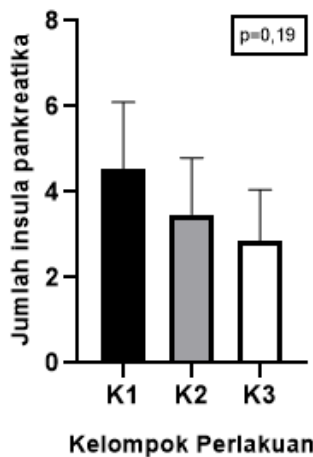
Gambar 1. Grafik rerata berat badan tikus perkelompok perlakuan

Keterangan: K1: Kelompok kontrol tikus normal; K2: Kelompok tikus model obesitas; K3: Kelompok tikus model obesitas dengan terapi metformin. H0: Sebelum pemberian HFD; H+7: 7 hari pasca pemberian HFD; H+14: 14 hari pasca pemberian HFD; H+21: 21 hari pasca pemberian HFD; H+28: 28 hari pasca pemberian HFD; H+35: 35 hari pasca pemberian HFD; H+42: 42 hari pasca pemberian HFD; H+49: 49 hari pasca pemberian HFD; H+56: 56 hari pasca pemberian HFD; H+63: 63 hari pasca pemberian HFD.

Berdasarkan gambar 1 dapat dilihat bahwa terdapat nilai berat badan awal yang berbeda pada tiap kelompok perlakuan. Kelompok K1 dan K2 menunjukkan peningkatan berat badan dari H+0 sampai H+63. Kelompok K3 menunjukkan peningkatan berat badan dengan grafik tampak landai pada H+35 sampai H+63. Dilakukan uji normalitas *Shapiro Wilk* antar kelompok perlakuan dengan hasil data terdistribusi normal. Hasil uji *Oneway Anova*, didapatkan perbedaan berat badan yang bermakna dari setiap kelompok ($p < 0,05$).

Jumlah Insula Pankreatika

Grafik jumlah insula pankreatika dapat dilihat pada gambar 2



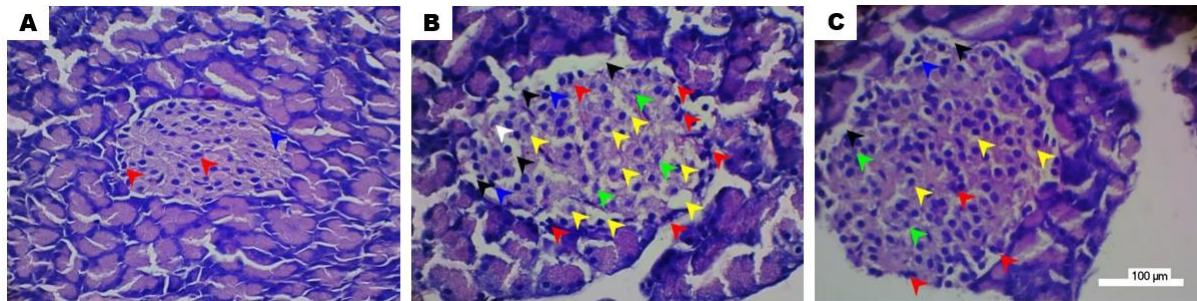
Gambar 2. Grafik jumlah insula pankreatika model tikus obesitas

Keterangan: K1: Kelompok kontrol normal; K2: Kelompok kontrol negatif (model Obesitas); K3: Kelompok tikus model obesitas dengan terapi metformin. *Uji Oneway Anova* $p=0,19$.

Kelompok K1 memiliki rerata jumlah insula pankreatika sebesar $4,52 \pm 1,43$. Rerata jumlah insula pankreatika pada kelompok K2 sebesar $3,48 \pm 1,31$ dan K3 sebesar $2,84 \pm 1,21$. Analisis statistik dengan *Oneway Anova* didapatkan nilai $p=0,19$ yang menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan pada jumlah insula pankreatika pada ketiga kelompok perlakuan.

Morfologi Insula Pankreatika

Morfologi insula pankreatika dapat ditunjukkan pada gambar 3



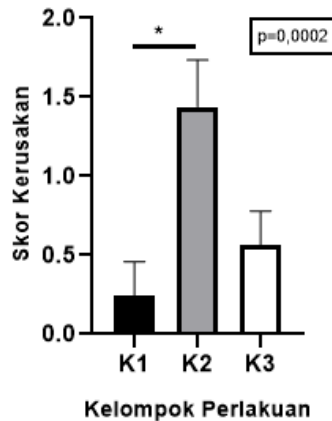
Gambar 3. Gambaran histologis insula pankreatika pankreas model tikus obesitas

(A). Kelompok K1/kontrol normal; (B). Kelompok K2/kontrol negatif (model Obesitas); (C). Kelompok K3/tikus model obesitas dengan terapi metformin. Keterangan: Panah merah menunjukkan sel radang, panah hijau menunjukkan sel nekrosis, panah biru menunjukkan piknosis, panah kuning menunjukkan sel degenerasi, panah putih menunjukkan sel karioreksis, panah hitam menunjukkan edema. (Pewarnaan: HE, Perbesaran 100 kali, skala 100 µm).

Gambaran histologi insula pankreatika kelompok K1, cenderung berbentuk membulat atau oval. Sitoplasma sel-sel dalam pankreas terpusat merah muda dengan nukleus terpusat ungu. Bentuk sel-sel bulat dan tersusun padat serta batas insula pankreatika tampak jelas. Pada beberapa lapangan pandang ditemukan adanya sel radang, dan beberapa sel piknosis namun jumlahnya sedikit sehingga dianggap tidak bermakna. Adanya sel radang dan sel piknosis secara umum masih dapat ditemukan pada kondisi normal.

Struktur insula pankreatika kelompok K2 secara umum menampilkan ukuran yang lebih kecil bila dibandingkan kelompok kontrol normal. Sebagian struktur insula pankreatika juga menampilkan bentuk poligonal atau tidak beraturan, dengan batas yang tidak jelas. Bentuk sel-selnya sebagian besar mengalami nekrosis, sebagian mengalami piknosis (inti sel memadat dan terpusat sangat gelap) maupun karioreksis (sel menghilang atau mengalami fragmentasi). Sel-sel dalam insula pankreatika sebagian juga tampak mengalami degenerasi. Sel-sel radang cukup banyak dijumpai baik di dalam struktur insula pankreatika maupun pada sel-sel asinar. Beberapa area juga menunjukkan adanya edema utamanya pada area perbatasan dengan sel-sel asinar yang ditandai dengan adanya rongga-rongga kosong pada struktur insula pankreatika.

Kelompok K3 menunjukkan perbaikan bila dibandingkan kelompok K2. Pada gambaran Kelompok ini cukup banyak sel yang mengalami degenerasi, dan sebagian nekrosis, piknosis, karioreksis dan adanya sel-sel radang yang cukup banyak ditemukan. Bentuk sel tampak tidak beraturan dengan batas antar sel yang tidak jelas.



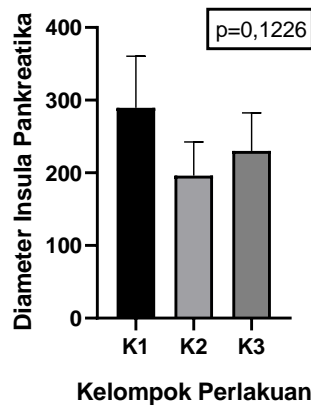
Gambar 4. Grafik skor kerusakan insula pankreatika model tikus obesitas

Keterangan: K1: Kelompok kontrol normal; K2: Kelompok kontrol negatif (model Obesitas); K3: Kelompok tikus model obesitas dengan terapi metformin. Uji *Kruskal Wallis* $p=0,002$. Uji post hoc *Dunn's*: K1 vs K2 ($p=0,0026$), K1 vs K3 ($p=0,7238$), K2 vs K3 ($p=0,0922$). $*=p<0,05$.

Uji *Kruskal Wallis* pada skor kerusakan insula pankreatika model tikus obesitas dengan hasil $p=0,002$. Dilanjutkan dengan uji post hoc *Dunn's* yang menunjukkan perbedaan signifikan antara kelompok K1 dan K2 ($p=0,0026$).

Morfometri Insula Pankreatika

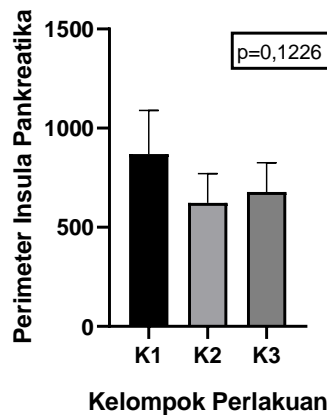
Morfometri insula pankreatika terdiri dari penghitungan diameter dan perimeter. Berikut grafik diameter dan perimeter insula pankreatika



Gambar 5. Grafik diameter insula pankreatika model tikus obesitas

Keterangan: K1: Kelompok kontrol normal; K2: Kelompok kontrol negatif (model obesitas); K3: Kelompok tikus model obesitas dengan terapi metformin. Uji *Kruskal Wallis* $p=0,1226$.

Data diameter insula pankreatika yang diuji analisis dengan *Kruskal Wallis* menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar kelompok perlakuan dengan nilai $p=0,1226$.



Gambar 6. Grafik perimeter insula pankreatika model tikus obesitas

Keterangan: K1: Kelompok kontrol normal; K2: Kelompok kontrol negatif (model obesitas); K3: Kelompok tikus model obesitas dengan terapi metformin. Uji *Kruskal Wallis* $p=0,1226$.

Data perimeter insula pankreatika diuji analisis dengan *Kruskal Wallis* dan didapatkan hasil yaitu perbedaan tidak signifikan antar kelompok perlakuan dengan nilai $p=0,1226$.

Diskusi

Hasil uji lanjut Tukey menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada K1 dengan K3 ($p=0,0125$) dan K2 dengan K3 ($p=0,0024$). Hal ini menunjukkan bahwa metformin memiliki efek pada berat badan. Pemberian metformin menstabilkan berat badan.⁶ Pada kondisi obesitas metformin memiliki efek menurunkan nafsu makan dengan produksi laktat. Laktat menginduksi rasa tidak nyaman pada saluran pencernaan sehingga menurunkan nafsu makan.⁷

Inflamasi akibat lipotoksisitas yang terjadi pada kondisi obesitas mampu menginduksi stres RE, apoptosis, dan penurunan kepadatan sel tersebut berdampak pada rusaknya insula pankreatika.^{8,9} Penurunan kepadatan menyebabkan penurunan jumlah insula pankreatika.¹⁰ Kelompok K3 menunjukkan jumlah insula pankreatika yang paling sedikit diantara kelompok K1 dan K2. Hal ini disebabkan oleh waktu paruh metformin yang singkat dan ekskresi yang cepat sehingga efeknya melemah.¹¹

Pada kondisi obesitas terjadi akumulasi lemak pada pankreas sehingga sel β memproduksi kemokin pada insula pankreatika untuk merekrut makrofag. Penumpukan makrofag akan menghasilkan sitokin pro-inflamasi yaitu IL-1 β , IL-6, dan TNF- α .³ Sekresi leptin, TNF- α , dan adiposonkin oleh adiposit dalam pankreas menginduksi kerusakan sel β secara parakrin.¹² Kondisi inflamasi juga menghambat aktivitas sinyal insulin menyebabkan hiperglikemia akibat resistensi pada jaringan perifer.^{13,14} Hiperglikemia menyebabkan peningkatan apoptosis sel β akibat glukotoksisitas yang menginduksi stres oksidatif dan stres RE.¹⁵ Pemberian metformin mencegah terjadinya glukotoksisitas dan lipotoksisitas yang memicu inflamasi dan menimbulkan kerusakan pada insula pankreatika.^{4,11}

Inflamasi yang terjadi pada insula pankreatika turut memengaruhi ukuran jaringannya. Hal ini dapat dilihat dari diameter dan perimeter insula pankreatika.¹⁶ Kondisi obesitas menginduksi inflamasi yang menyebabkan stres RE pada sel β . Terjadi perubahan struktur pada organel di nukleus dan sitoplasma seperti apparatus golgi dan mitokondria pada sel β .³ Inflamasi pada pankreas yang berlangsung secara terus menerus menyebabkan disfungsi hingga apoptosis sel β . Apoptosis sel β menyebabkan kerusakan pankreas sehingga terjadi penurunan diameter dan perimeter insula pankreatika.¹⁷

Kesimpulan

Metformin mampu menurunkan BB dan mampu memperbaiki morfologi insula pankreatika, namun tidak pada morfometri dan jumlah insula pankreatika pada tikus model obesitas.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kami ucapkan kepada Anisa Utami sebagai teknisi animal house dalam pelaksanaan penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Penulis bertanggung jawab untuk memeriksa semua referensi dengan sangat cermat untuk World Health Organization. Obesity and Overweight. WHO. 2020 [diakses 28 November 2020]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. Marinho, T.D.S., Borges, C. C., Aguila, M. B., Mandarim-de-Lacerda, C. A. Intermittent fasting benefits on alpha-and beta-cell arrangement in diet-induced obese mice pancreatic islet. *J Diabetes Complications*. 2020;34(3):107497.
3. Ying, W., Fu, W., Lee, Y. S., Olefsky, J. M. The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and β -cell abnormalities. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(2):81-90.
4. Yang, X., Xu, Z., Zhang, C., Cai, Z., Zhang, J. Metformin, beyond an insulin sensitizer, targeting heart and pancreatic β cells. *Biochim Biophys Acta-Mol Bas Dis*. 2017;1863(8):1984-1990.
5. Yi, X., Cai, X., Wang, S., Xiao, Y. Mechanisms of impaired pancreatic β -cell function in high-fat diet-induced obese mice: The role of endoplasmic reticulum stress. *Mol Med Rep*. 2020;21(5):2041-2050.
6. Chang, H. H., Moro, A., Chou, C. E. N., Dawson, D. W., French, S., Schmidt, A. I., *et al*. 2018. Metformin decreases the incidence of pancreatic ductal adenocarcinoma promoted by diet-induced obesity in the conditional KrasG12D mouse model. *Sci Rep*. 8(1):1-10.
7. Yerevanian, A. dan Soukas, A. A. 2019. Metformin: mechanisms in human obesity and weight loss. *Curr Obes Rep*. 8(2):156-164.
8. Cen, J., Sargsyan, E., Forslund, A., Bergsten, P. 2018. Mechanisms of beneficial effects of metformin on fatty acid-treated human islets. *J Mol Endocrinol*. 61(3):91-99.
9. Inaishi, J., Saisho, Y., Sato, S., Kou, K., Murakami, R., Watanabe, Y., *et al*. Effects of obesity and diabetes on α -and β -cell mass in surgically resected human pancreas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(7):2874-2882.
10. Brereton, M. F., Rohm, M., Shimomura, K., Holland, C., Tornovsky-Babeay, S., Dadon, D., *et al*. Hyperglycaemia induces metabolic dysfunction and glycogen accumulation in pancreatic β -cells. *Nat Comms*. 2016;7(1):1-15.

11. Markowicz-Piasecka, M., M Huttunen, K., Mateusiak, L., Mikiciuk-Olasik, E., Sikora, J. Is metformin a perfect drug? Updates in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Curr Pharm Des.* 2017;23(17):2532-2550.
12. Inaishi, J. dan Saisho, Y. Beta-cell mass in obesity and type 2 diabetes, and its relation to pancreas fat: A mini-review. *Nutrients.* 2020;12(12):3846.
13. Murai, Y., Ohta, T., Tadaki, H., Miyajima, K., Shinohara, M., Fatchiyah, F., *et al.* Assessment of Pharmacological Responses to an Anti-diabetic Drug in a New Obese Type 2 Diabetic Rat Model. *Med Arch.* 2017;71(6):380.
14. Ye, J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Fron Med.* 2013;7(1):14-24.
15. Zhou, J., Massey, S., Story, D., Li, L. Metformin: an old drug with new applications. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):2863.
16. Solehah, P. O., Tarusu, F. A., Tandi, J., Dewi, N. P., Lintin, G. B. R., Fitriana, Y., *et al.* Ekstrak Etanol Daun Kacang Panjang (*Vigna unguiculata* (L.) Walp): Kajian Morfometri Insula Pankreatika Model Tikus Diabetes. *Jurnal Farmasi Galenika.* 2019;5(2):183-188.
17. Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C. Buku Ajar Patologi Robbins Edisi Kesembilan. Singapura: Elsevier; 2015.