

Pengaruh Durasi DM Tipe 2 Terhadap Angka Leukosit dan Hitung Jenis Leukosit Pada Tikus Wistar Pasca *Bilateral Common Carotid Artery Occlusion* (BCCAO)

Farah Jasmine Dianita¹, Rahma Yuantari², Ety Sari Handayani^{3*}

1. Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia
2. Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia
3. Departemen Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

*Korespondensi : 097110415@uii.ac.id

ABSTRAK

Pendahuluan: Stroke iskemik merupakan masalah kesehatan yang sering ditemui di dunia terutama Indonesia. Salah satu faktor risiko stroke iskemik adalah diabetes mellitus tipe 2 (DM tipe 2). Angka leukosit dan hitung jenis leukosit mengalami perubahan pada kejadian stroke iskemik maupun DM tipe 2. Pada hewan coba model iskemia otak terdapat perubahan angka leukosit dan hitung jumlah jenis leukosit. Pada hewan coba DM tipe 2 dijumpai peningkatan angka leukosit dan semakin lama durasi DM maka leukosit semakin tinggi. Belum ada data yang menunjang bagaimana jumlah angka leukosit dan hitung jenis leukosit pada hewan coba iskemia otak yang diinduksi DM tipe 2. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh durasi diabetes melitus tipe 2 terhadap angka leukosit dan hitung jenis leukosit pada tikus yang diinduksi iskemia otak.

Metode: Jenis penelitian berupa kuasi eksperimental. Subjek penelitian ini yaitu tikus jantan dewasa (*Rattus norvegicus*) galur Wistar. Tikus dikelompokkan menjadi 4 kelompok perlakuan, masing-masing terdiri dari 6 ekor tikus. K1 merupakan kelompok *sham operated*, K2 merupakan kelompok iskemia (BCCAO durasi iskemia 20 menit dan reperfusi 7 hari), K3 merupakan kelompok perlakuan DM 2 minggu dengan BCCAO, dan K4 merupakan kelompok DM 3 minggu dengan BCCAO. Angka leukosit dan jenis leukosit diukur dengan menggunakan *automatic hematology analyzer*. Hitung jenis leukosit menggunakan *Fluorescence Flow Cytometry*. Analisis data menggunakan uji ANOVA dan Kruskal Wallis.

Hasil: Penurunan nilai netrofil ($23,53 \times 5,57$; $p = 0,014$, $p < 0,05$) dan peningkatan limfosit ($66,68 \times 6,16$; $p = 0,028$, $p < 0,05$) pada kelompok DM 3 minggu yang diinduksi iskemia.

Kesimpulan: Terdapat pengaruh durasi diabetes melitus tipe 2 terhadap hitung jenis leukosit yaitu neutrofil dan limfosit pada tikus pasca BCCAO.

Kata Kunci: Durasi DM; BCCAO; angka leukosit; hitung jenis leukosit

ABSTRACT

Background: Ischemic stroke is a health problem that is often encountered in the world, especially in Indonesia. DM type 2 is a risk factor for ischemic stroke. Lekocytes dan differential white blood cell (WBC) count changes in the incidence of ischemic stroke and type 2 DM. In the rat stroke model dan rat diabetic model there is a change in total and WBC. Total WBC increases in rat diabetic model. Duration of diabetes affects differential WBC in rat diabetic model. This research aims this study to determine the effect of duration of type 2 diabetes mellitus on total and differential WBC count on rat stroke model.

Method: This type of research was quasi-experimental. The subjects of this study were adult male rats (*Rattus norvegicus*) Wistar strain. Rats are divided into 4 groups, each consisting of 6 mice. Group 1 is a sham-operated group, group 2 is a ischemic group (BCCAO is ligated for 20 minutes and 7 days reperfusion), group 3 is a DM-ischemic group (DM for 2 weeks with BCCAO), and group 4 is a DM-ischemic group (DM for 3 weeks with BCCAO). Data

analysis used ANOVA and Kruskal Wallis tests. Total and differential WBC count are measured using an automatic hematology analyzer. A differential WBC count are measured using Fluorescence Flow Cytometry.

Results: Decrease in neutrophil values (23.53×5.57 ; $p = 0.014$, $p < 0.05$) and increase in lymphocytes (66.68×6.16 ; $p = 0.028$, $p < 0.05$) in K4 group.

Conclusion: There is a difference in the duration of type 2 diabetes mellitus against leukocyte counts, namely neutrophils and lymphocytes in rats after BCCAO.

Keywords: DM duration; BCCAO; white blood cells; differential count

PENDAHULUAN

Stroke merupakan penyakit serebrovaskular yang menyebabkan aliran darah ke otak terganggu. Penyakit ini memiliki prevalensi kematian tertinggi di dunia yaitu 9,4 juta kematian dan akan meningkat menjadi 23,3 juta kematian pada tahun 2030. Di Indonesia, jumlah penderita stroke pada tahun 2013 diperkirakan sebanyak 1.236.825 orang dan tertinggi di Provinsi Jawa Barat sebanyak 238.001 orang¹.

Stroke dapat disebabkan karena oklusi pembuluh darah intrakranial sehingga aliran darah ke otak berkurang (stroke iskemik) atau karena perdarahan (stroke hemoragik). Penyebab stroke iskemik yang sering terjadi yaitu aterosklerosis intrakranial. Aterosklerosis merupakan kondisi dimana terjadinya inflamasi vaskuler. Indikator yang berkontribusi terhadap aterosklerosis dan terjadinya inflamasi yaitu leukosit. Leukosit merupakan komponen darah untuk mendeteksi adanya infeksi yang disebabkan oleh virus atau bakteri dan berperan dalam sistem pertahanan tubuh². Profil sub tipe leukosit pada fase akut stroke iskemik menjadi tanda prediktor prognosis pasien³. Jumlah sel darah putih dan neutrofil total yang lebih tinggi dikaitkan dengan peningkatan risiko terjadinya stroke fatal⁴.

Penelitian menggunakan hewan coba dengan model stroke iskemik untuk mengidentifikasi mekanisme yang menyebabkan kerusakan jaringan dan pengembangan pengobatan penyakit stroke

sudah berkembang sejak dahulu⁵. Metode tersering yang dapat menggambarkan kondisi stroke iskemik pada manusia dan angka mortalitas hewan coba yang rendah yaitu model transient *bilateral common carotid artery occlusion* (BCCAO)⁶. Teknik BCCAO menyebabkan cedera iskemik reperfusi. Ketika terjadi reperfusi jaringan setelah iskemik maka kerusakan jaringan akan bertambah berat dan dapat menyebabkan nekrosis jaringan⁷. Pada patogenesis cedera iskemik reperfusi otak terdapat faktor penentu yang akan menginisiasi proses selanjutnya. Faktor tersebut adalah infiltrasi leukosit. Selama reperfusi, leukosit aktif menempel pada sel endotel melalui sinyal kemotaksis, diikuti oleh produksi matriks metalloproteinase dan neutrofil, menyebabkan gangguan sawar darah otak. Leukosit pada gilirannya akan mengalami ekstrasvasasi dari kapiler dan menyusup ke jaringan otak, melepaskan sitokin yang memediasi peradangan, yang akhirnya mengakibatkan kerusakan penumbra⁸.

Identifikasi faktor risiko pada pasien stroke sangat penting dilakukan untuk melakukan pencegahan lebih dini. Diabetes melitus merupakan faktor risiko independen yang diakui untuk stroke dengan morbiditas dan mortalitas yang lebih tinggi⁹.

Diabetes Melitus (DM) merupakan penyakit metabolik dengan adanya peningkatan kadar glukosa darah yang melebihi dari normal¹⁰. Sekitar 43% kematian terjadi pada usia dibawah 70 tahun karena tingginya kadar glukosa darah sehingga DM menjadi salah satu penyebab kematian di

dunia. WHO memprediksi akan terjadi kenaikan pasien DM di Indonesia dari 8,4 juta jiwa pada tahun 2000 menjadi sekitar 21,3 juta jiwa pada tahun 2030. Dari semua klasifikasi DM, DM tipe 2 memiliki prevalensi terbanyak di dunia¹⁰.

Hiperglikemia pada DM tipe 2 dapat menyebabkan gangguan fungsi endotel dan meningkatkan agregasi leukosit dan platelet sehingga proses tersebut akan menyebabkan proses aterosklerosis. Diabetes melitus dapat menginduksi defisiensi imun karena kadar glukosa yang tinggi dan tidak terkontrol dalam waktu lama dapat menurunkan fungsi sel leukosit dalam fagositosis sehingga penderita rentan terkena infeksi dan dapat menyebabkan inflamasi. Menurut Yakhchalian *et al.* (2018), total sel darah putih meningkat (leukositosis) dapat diamati pada tikus kelompok diabetes¹¹. Berdasarkan penelitian sebelumnya, terdapat hubungan antara usia dan durasi diabetes dengan jumlah leukosit, sehingga dapat dikatakan bahwa jumlah leukosit yang lebih tinggi pada usia yang lebih tua dan memiliki diabetes lebih lama¹².

Seiring dengan meningkatnya kejadian diabetes melitus, perkembangan penelitian mengenai DM pun semakin banyak dilakukan seperti menggunakan hewan coba model diabetes. Terdapat beberapa jenis perlakuan yang dapat dilakukan kepada hewan model untuk DM tipe II. Salah satunya dengan pemberian agen diabetogenik seperti streptozotosin (STZ). Pada streptozotosin dapat menginduksi DM tipe 2. Model STZ-NA diabetes tipe II telah dilaporkan sebagai model yang baik untuk studi komplikasi diabetes dan telah digunakan dalam studi yang berfokus pada komplikasi DM¹³.

Berdasarkan pernyataan diatas, stroke iskemik dapat menyebabkan peningkatan leukosit dan terbentuknya agregasi leukosit. Hal ini didukung oleh hasil beberapa penelitian yang menunjukkan adanya perubahan angka leukosit dan hitung jumlah jenis leukosit pada hewan coba model stroke iskemik. Diketahui

pula bahwa adanya faktor risiko DM Tipe 2 pada hewan coba model iskemik dapat menyebabkan cedera jaringan semakin parah. Pada hewan coba DM tipe 2 dijumpai peningkatan angka leukosit dan semakin lama durasi DM maka leukosit semakin tinggi. Sayangnya selama ini belum ada data yang menunjang bagaimana jumlah angka leukosit dan hitung jenis leukosit pada hewan coba iskemik yang diinduksi DM. Atas dasar itu maka penulis melakukan penelitian ini untuk dapat mengetahui pengaruh durasi DM tipe 2 terhadap angka leukosit dan hitung jenis leukosit pada tikus wistar pasca stroke iskemik.

METODE

Penelitian ini telah mendapatkan *Ethical clearance* dari komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan nomor 6/Ka/Kom.Et/70/KE/IV/2019.

Penelitian ini merupakan penelitian Kuasi eksperimental dengan desain *post test control group design*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Subyek penelitian ini yaitu tikus jantan dewasa (*Rattus norvegicus*) galur Wistar. Berdasarkan rumus Charan (2013), jumlah tikus yang digunakan pada penelitian ini tiap kelompok terdiri dari 6 ekor tikus, sehingga total jumlah tikus yang digunakan yaitu 24 ekor tikus¹⁴.

Terdapat empat kelompok percobaan. Kelompok 1 (K1) merupakan kelompok *sham operated*. Kelompok 2 (K2) merupakan stroke iskemik (tanpa perlakuan durasi DM tetapi dilakukan ligasi arteri karotis komunis bilateral selama 20 menit dan reperfusi 7 hari. Kelompok 3 (K3) merupakan kelompok perlakuan durasi DM tipe 2 selama 2 minggu yang diinduksi BCCAO. Kelompok 4 (K4) merupakan kelompok perlakuan durasi DM tipe 2 selama 3 minggu yang diinduksi BCCAO.

Induksi Diabetes Melitus Tipe 2

Induksi DM tipe 2 menggunakan STZ dan NAD. Tikus ditimbang untuk menentukan dosis pemberian, kemudian menyuntikkan NAD dosis 110 mg/kgBB. Volume injeksi intra peritoneal maksimal 1 ml/100grBB (untuk 2 macam obat sehingga volume NIC maksimal 0,5 ml). Setelah itu, menyuntikkan STZ dosis 65 mg/kgBB. Volume injeksi *intraperitoneal* maksimal 1 ml/100grBB (untuk dua macam obat sehingga volume maksimal STZ 0,5ml). Kemudian diberikan larutan glukosa 5% dan pakan secara *ad libitum* selama 24 jam dan diukur kadar gula darah puasa dan berat badan tikus dalam waktu 72 jam post-induksi. Tikus dengan kadar glukosa darah puasa ≥ 126 mg/dL tergolong tikus yang mengalami diabetes mellitus.

Teknik *Bilateral Common Carotid Artery Occlusion* (BCCAO)

Teknik BCCAO mengikuti prosedur yang pernah dilakukan sebelumnya¹⁵. Teknik ini dilakukan melalui beberapa tahap. Pertama, tahap anestesi. Sebelum dilakukan ligasi, tikus dianestesi menggunakan ketamin dosis 80 – 100 mg/kgBB diberikan secara *intra muscular* pada paha *lateral* tikus. Tikus kemudian diletakkan pada *platform* steril dan suhu *rectal* tikus dijaga pada suhu $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Kedua, tahap disinfeksi untuk mencegah infeksi pada tikus. Disinfeksi menggunakan alkohol dan larutan *povidone iodine* yang dioleskan pada permukaan leher *anterior* tikus. Ketiga, tahap insisi. Insisi dilakukan secara vertikal pada bagian *anterior medial* leher tikus. Keempat, tahap eksplorasi *arteri carotis communis*. Eksplorasi dilakukan tanpa memotong *glandula submandibularis* dan *nervus phrenicus*. Kemudian tahap ligasi. Ligasi dilakukan pada *arteri carotis communis dextra* dan *sinistra* menggunakan *clamp vascular* selama 20 menit (durasi iskemia). Tahap terakhir adalah penjahitan. Setelah ligasi selesai, *clamp vascular* dilepaskan. Selanjutnya dilakukan penjahitan bekas insisi

menggunakan benang *silk*. Daerah sekitar insisi didisinfeksi menggunakan *povidone iodine*. Kemudian tikus dibiarkan hidup selama 7 hari (durasi reperfusi).

Perlakuan Kelompok *Sham Operated*

Kelompok *sham* mendapatkan perlakuan anestesi, disinfeksi, insisi, eksplorasi, dan penjahitan tanpa dilakukan BCCAO.

Euthanasia dan Pengambilan Darah

Euthanasia dilakukan setelah 7 hari reperfusi. Tikus dianestesi menggunakan ketamin dosis 80 – 100 mg/kgBB secara *intra muscular* pada paha *lateral* tikus. Selanjutnya dilakukan insisi *linea mediana* pada dinding *abdomen*, dilanjutkan dengan insisi sepanjang *linea mediana axillaris* sampai dinding dada terbuka dan jantung terlihat. Dilakukan pengambilan darah menggunakan spuit 3 cc pada apeks jantung. Setelah dilakukan pengambilan darah selanjutnya darah dimasukkan ke dalam tabung EDTA dan dilakukan homogenisasi dengan cara menggoyang-goyangkan tabung EDTA secara perlahan.

Pemeriksaan Darah Leukosit dan Hitung Jenis Leukosit

Darah yang telah tersimpan pada tabung EDTA selanjutnya dilakukan pemeriksaan darah di salah satu pelayanan laboratorium kesehatan di Yogyakarta untuk dilakukan pemeriksaan angka leukosit dan hitung jenis leukosit. Angka leukosit dan jenis hitung leukosit diukur dengan menggunakan *automatic hematology analyzer*. Jenis jenis leukosit menggunakan *Fluorescence Flow Cytometry*.

Analisis Data

Analisis dilakukan dengan perangkat lunak statistik. Dilakukan uji *Saphiro Wilk Test* untuk mengetahui normalitas data. Jika data terdistribusi normal maka selanjutnya akan

dilakukan uji *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) *Test* dengan interpretasi H_0 diterima apabila $p \text{ value} > 0,05$ dilanjutkan dengan *Post Hoc Tamhane's*. Analisis juga dilakukan secara deskriptif untuk mengetahui nilai rerata, dan nilai standar deviasi masing-masing variabel penelitian.

HASIL

Uji normalitas data pada penelitian ini dilakukan dengan *Shapiro-Wilk Test* dan didapatkan data data terdistribusi normal pada angka leukosit, neutrofil, limfosit dan monosit dengan $p > 0,05$ sehingga dilakukan analisis menggunakan uji ANOVA. Dan data terdistribusi tidak normal pada nilai basofil dan eosinofil dengan nilai $p < 0,05$ sehingga analisis menggunakan uji Kruskal Wallis.

Hasil uji ANOVA test didapatkan angka leukosit ($p = 0,263$), neutrofil ($p = 0,014$), limfosit ($p = 0,028$) dan monosit ($p = 0,159$) dan hasil uji Kruskal Wallis didapatkan basofil ($p = 0,119$) dan eosinofil ($p = 0,495$). Data hasil analisis ANOVA dan Kruskal Wallis, nilai rerata dan standar deviasi disajikan pada tabel 1. Dari hasil di atas menunjukkan bahwa neutrofil dan limfosit memiliki nilai $p < 0,05$ yang berarti hasil tersebut signifikan atau terdapat pengaruh durasi DM tipe 2 pada tikus pasca ligasi BCCAO.

Terdapat perbedaan variabel neutrofil antara kelompok *sham operated* (K1) dengan kelompok stroke iskemik (K2) dengan nilai $p = 0,026$ ($p < 0,05$) dan kelompok *sham operated* (K1) dengan kelompok DM 3 minggu yang diinduksi iskemia (K4) dengan nilai $p = 0,028$ ($p < 0,05$). Nilai rerata neutrofil pada K1 lebih tinggi daripada K2. Perbedaan selanjutnya terdapat pada variabel limfosit antara kelompok tikus *sham operated* (K1) dengan kelompok DM 3 minggu (K4) dengan nilai $p = 0,046$ ($p < 0,05$). Nilai rerata limfosit pada K4 lebih tinggi daripada K1.

Tabel 1. Nilai Rerata, Std Deviasi, dan Nilai P

Variabel	Grup	Rerata \pm Std deviasi	Nilai P
Leukosit (ribu/mm ³)	K1	8852.00 \pm 1133.01	0,263
	K2	8386.66 \pm 5171.50	
	K3	9006.66 \pm 4353.41	
	K4	13470.00 \pm 6461.18	
Neutrofil (%)	K1	46.78 \pm 8.35	0,014*
	K2	23.33 \pm 15.59	
	K3	26.85 \pm 14.61	
	K4	23.53 \pm 5.57	
Limfosit (%)	K1	43.16 \pm 7.29	0,028*
	K2	64.65 \pm 17.83	
	K3	64.75 \pm 16.09	
	K4	66.88 \pm 6.16	
Monosit (%)	K1	6.08 \pm 1.05	0,159
	K2	10.85 \pm 4.48	
	K3	8.16 \pm 2.11	
	K4	8.96 \pm 4.07	
Basofil (%)	K1	0.00 \pm 0.00	0,119
	K2	0.30 \pm 0.73	
	K3	0.00 \pm 0.00	
	K4	0.21 \pm 0.39	
Eosinofil (%)	K1	0.56 \pm 0.53	0,495
	K2	0.86 \pm 0.82	
	K3	0.23 \pm 0.22	
	K4	0.40 \pm 0.40	

* : Nilai $p < 0,05$ menunjukkan hasil yang bermakna

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan durasi DM tipe 2 terhadap nilai neutrofil dan limfosit pada tikus pasca ligasi BCCAO (*Bilateral Common Carotid Artery Occlusion*). Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pengaruh durasi DM tipe 2 terhadap angka leukosit, nilai limfosit, basofil, eosinofil, dan monosit pada tikus pasca BCCAO (*Bilateral Common Carotid Artery Occlusion*).

Angka leukosit

Hasil penelitian ini menunjukkan tidak terdapat pengaruh yang signifikan antara durasi DM tipe 2 terhadap angka leukosit pada tikus setelah stroke iskemik. Pada kelompok *sham operated*, K2 dan K3 terjadi peningkatan

jumlah leukosit tetapi masih didalam kisaran nilai normal angka leukosit (8000 sd 9000/ mm kubik), sedangkan angka leukosit pada kelompok K4 diatas nilai normal (>11.000/ mm kubik). Peningkatan angka leukosit yang masih dalam kisaran nilai normal sesuai dengan penelitian lainnya. Pada penelitian Sieneel *et al* (2022) melaporkan bahwa tikus yang diinduksi oklusi arteri medial cerebral (MCAO) 2 jam dengan durasi reperfusi 1 jam menunjukkan bahwa leukosit dalam kapiler dan adhesi arteriol cenderung meningkat tetapi peningkatannya tidak signifikan¹⁶. Nilai angka leukosit yang tinggi pada tikus kelompok K4 menunjukkan bahwa durasi DM yang lebih lama akan meningkatkan angka leukosit pada tikus iskemia. Hasil penelitian ini juga sesuai dengan kejadian yang terjadi di pasien diabetes tipe 2. Naredi *et al.* (2017) menyebutkan bahwa 56% pasien dengan DM tipe 2 memiliki angka leukosit yang tinggi tetapi masih dalam kisaran nilai normal 7000-11000/ mm kubik¹⁷. Penelitian Moradi *et al.* (2012) menunjukkan bahwa peningkatan angka leukosit dalam kisaran nilai normal pada pasien diabetes berhubungan dengan kejadian komplikasi¹². Induksi DM menggunakan STZ dosis 60 mg/kgBB meningkatkan angka leukosit pada tikus¹⁸.

Kemungkinan yang menyebabkan ketidakbermaknaan angka leukosit dalam darah dapat disebabkan karena adanya migrasi leukosit ke venula serebral dan jaringan serebral. Pada penelitian Sieneel *et al* (2022) melaporkan bahwa tikus yang diinduksi oklusi arteri medial cerebral (MCAO) 2 jam dengan durasi reperfusi 1 jam menunjukkan ada peningkatan leukosit dan agregasi platelet-leukosit di venula serebral yang signifikan sedangkan leukosit dalam kapiler dan adhesi arteriol cenderung meningkat tetapi peningkatannya tidak signifikan¹⁶. Faktor lainnya adalah tikus mengalami stress selama perlakuan. Stres dapat menurunkan mekanisme pertahanan tubuh¹⁹. Perlu juga dipertimbangkan menggunakan hewan coba

berjenis kelamin betina. Salah satu penelitian melaporkan bahwa angka leukosit pada penderita DM tipe 2 dipengaruhi oleh jenis kelamin. Angka leukosit pada pasien perempuan meningkat signifikan. Pada pasien laki laki tidak dijumpai peningkatan angka leukosit²⁰.

Nilai Neutrofil

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya pengaruh signifikan durasi DM tipe 2 terhadap nilai neutrofil pada tikus pasca induksi iskemia. Terjadi penurunan neutrofil pada kelompok iskemia (K2) dan kelompok DM 3 minggu dengan iskemia (K4) dibandingkan dengan *sham-operated* (K1).

Pada kejadian stroke akibat penyumbatan pembuluh darah arteria cerebri media (MCA), terjadi penyumbatan 60-67% kapiler yang terletak distal dari MCA. Penyumbatan tersebut disebabkan karena akumulasi neutrofil di lumen kapiler, sehingga menambah hambatan aliran darah daerah *cortex cerebri*²¹. Saat terjadi stroke, dalam beberapa menit kemudian neutrofil akan bermigrasi ke otak. Migrasi tersebut melalui pembuluh darah menuju area otak yang mengalami iskemia. Neutrofil akan melepaskan berbagai jenis molekul adhesi endotel dalam 15 menit pertama kejadian stroke. Pada penelitian menggunakan hewan coba disebutkan bahwa infiltrasi neutrofil terjadi di hari pertama stroke, mencapai puncak pada hari ketiga, lalu menurun di hari ke 4, 5 dan 6. Neutrofil tetap terdeteksi pada hari ketujuh dan ke-15 pasca stroke²². Jumlah leukosit dan neutrofil perifer yang tinggi berkaitan erat dengan tingkat volume jaringan iskemik yang lebih besar²³. Aktivitas neutrofil akan melemah pada hari ke 2 hingga ke 4 setelah iskemik terjadi dan semakin menurun⁸.

Jumlah neutrofil yang terdeteksi dalam plasma darah bervariasi menurut waktu reperfusinya. Pada tikus diabetes yang diinduksi iskemia dengan teknik MCAO terjadi peningkatan neutrofil di awal masa

reperfusion yaitu 1 sampai 24 jam²⁴. Pada tikus diabetes 1 minggu didapatkan peningkatan jumlah neutrofil¹¹. Neutrofil akan menurun pada minggu kedua hiperglikemia pada hewan coba model diabetes yang diinduksi dengan *aloxan*²⁵. Penelitian ini menunjukkan bahwa jumlah neutrofil dalam darah pada kelompok K4 mengalami penurunan signifikan pada hari ketujuh reperfusion.

Penurunan signifikan neutrofil dalam darah pada hewan coba diabetes yang diinduksi iskemia mungkin berhubungan dengan derajat keparahan iskemia otak. Pada awal kejadian iskemia terjadi peningkatan kadar neutrofil darah (1 jam sampai 24 jam). Neutrofil akan bermigrasi ke jaringan parenkim otak. Dalam 24 jam pertama iskemia dijumpai sedikit neutrofil pada parenkim *cortex* dan *striatum* otak tikus. Jumlah neutrofil tertinggi pada 96 jam (4 hari) pasca iskemia²⁶. Saat jumlah neutrofil dalam darah menurun maka dijumpai peningkatan jumlah neutrofil di jaringan otak. Kelemahan penelitian ini adalah tidak dilakukan pengukuran neutrofil pada jaringan otak sehingga tidak dapat dilihat hubungan antara jumlah neutrofil darah dengan jaringan otak.

Nilai limfosit

Pada penelitian ini menunjukkan terdapat pengaruh yang signifikan durasi DM tipe 2 terhadap nilai limfosit pada tikus pasca diinduksi iskemik serebral. Rerata limfosit diperifer kelompok DM 3 minggu (K4) lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok stroke iskemik (K2). Hiperglikemia pada pasien DM tipe 2 dapat menyebabkan gangguan fungsi endotel dan meningkatkan agregasi leukosit sehingga proses tersebut akan menyebabkan proses aterosklerosis sehingga terjadi komplikasi stroke. Limfosit T lebih banyak berperan dalam meningkatkan kerusakan pada jaringan yang iskemik daripada limfosit B, dan diketahui bahwa tikus dengan defisiensi limfosit T memiliki ukuran infark yang lebih kecil dibandingkan kelompok kontrol²⁷.

Limfosit berperan aktif pada mekanisme iskemia otak. Limfosit mampu menghasilkan pro inflamasi sitokin dan senyawa sitotoksik lainnya. Beberapa penelitian pada hewan coba menunjukkan peningkatan limfosit sesaat setelah neutrofil meningkat. Peningkatan limfosit terjadi pada hari ke-3 sampai ke-6 pasca induksi iskemia²⁸. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini dimana masih terjadi peningkatan limfosit disaat kadar neutrofil sudah menurun pada kelompok K4.

Nilai monosit, basofil dan eosinofil

Hasil penelitian ini menunjukkan tidak terdapat pengaruh yang signifikan antara durasi DM tipe 2 terhadap nilai monosit, basofil dan eosinofil pada tikus pasca BCCAO. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Kraft *et al* (2015) mengatakan bahwa pasien yang telah terdiagnosis stroke iskemik akut tidak mengalami perubahan nilai monosit yang signifikan²⁹. Monosit dapat diamati paling cepat pada 2 jam setelah iskemik, sedangkan aktivitas di otak dapat dilihat setelah 10 jam dan sampai 48 jam pasca kerusakan, aktivitas makrofag dan mikroglia akan terlihat pada seluruh lesi serta dapat bertahan dalam 1 minggu atau lebih lama²⁸. Penelitian lain menunjukkan bahwa monosit berespon pada hari ke 3 hingga 7 setelah onset²³.

Eosinofil dapat menjadi prediktor keparahan iskemia otak. Jumlah eosinophil yang rendah (eosinopenia) berkorelasi dengan besarnya area iskemia otak dan berkorelasi dengan keparahan gejala³⁰. Pada penelitian ini terjadi penurunan jumlah eosinophil walaupun tidak signifikan pada kelompok DM 2 dan 3 minggu yang diinduksi BCCAO. Penelitian Zhao *et al*. (2020) menyebutkan bahwa puncak penurunan jumlah eosinophil terjadi pada hari kedua reperfusion³⁰. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini dimana pada hari ketujuh reperfusion penurunan menjadi tidak signifikan.

Pada penelitian ini tidak terjadi perubahan pada angka basofil dalam darah. Hal

ini sesuai dengan penelitian lainnya dimana angka basophil pada kelompok DM tipe 2 tidak berbeda dengan kelompok kontrol²⁰. Pada hewan coba model diabetes lainnya tidak dijumpai peningkatan jumlah basophil dalam darah³¹.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis data dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh durasi diabetes melitus tipe 2 terhadap hitung jenis leukosit yaitu neutrofil dan limfosit pada tikus pasca ligasi BCCAO.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih ditujukan kepada Unit Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (UPPM) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kemenkes. Riset Kesehatan Dasar RISKESDAS 2013. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2013.
2. Wu TH, Chien KL, Lin HJ, Hsu HC, Su TC, Chen MF, et al. Total white blood cell count or neutrophil count predict ischemic stroke events among adult Taiwanese: Report from a community-based cohort study. *BMC Neurol* [Internet]. 2013;13(1):1. Available from: *BMC Neurology*
3. Semerano A, Strambo D, Martino G, Comi G, Filippi M, Roveri L, et al. Leukocyte Counts and Ratios Are Predictive of Stroke Outcome and Hemorrhagic Complications Independently of Infections. *Front Neurol*. 2020;11(April):1–7.
4. Hu Z bing, Lu Z xiong, Zhu F, Jiang C qiang, Zhang W sen, Pan J, et al. Higher total white blood cell and neutrophil counts are associated with an increased risk of fatal stroke occurrence: the Guangzhou biobank cohort study. *BMC Neurol* [Internet]. 2021;21(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s12883-021-02495-z>
5. Handayani ES, Susilowati R, Setyopranoto I, Partadiredja G. Transient Bilateral Common Carotid Artery Occlusion (tBCCAO) of Rats as a Model of Global Cerebral Ischemia. *Bangladesh J Med Sci*. 2019;18(03):491–500.
6. Sanderson TH, Wider JM. 2-Vessel Occlusion / Hypotension : A Rat Model of Global Brain Ischemia. *J Vis Exp* [Internet]. 2013;76(50173):1–8. Available from: <http://www.jove.com/video/50173>
7. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. Vol. 298, *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2012. 229–317 p.
8. Lin, Wang, Yu. Ischemia-reperfusion Injury in the Brain: Mechanisms and Potential Therapeutic Strategies. *Biochem Pharmacol* (Los Angel). 2016;5(4).
9. Chen R, Ovbiagele B, Feng W. Diabetes and Stroke: Epidemiology, Pathophysiology, Pharmaceuticals and Outcomes. *Am J Med Sci*. 2016;351(4):380–6.
10. WHO. Global Report on Diabetes [Internet]. Vol. 978, WHO. 2016. Available from: https://sci-hub.si/https://apps.who.int/iris/handle/10665/204874%0Ahttps://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204874/WHO_NMH_NVI_16.3_eng.pdf?sequence=1%0Ahttp://www.who.int/about/licensing/copyright_form/index.html%0Ahttp://www.who.int/about/licens
11. Yakhchalian N, Hatami K, Nosrati H, Yousofvand N. Hematological and Serum Biochemical Analysis of Streptozotocin-Induced Insulin Dependent Diabetes Mellitus in Male Adult Wistar Rats Nima [Internet]. Iran; 2018. Available from: <https://doi.org/10.1101/359844>
12. Moradi S, Kerman SRJ, Rohani F, Salari F. Association between diabetes complications and leukocyte counts in Iranian patients. *J Inflamm Res* [Internet]. 2012;5(1):7–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/JIR.S26917>
13. Ghasemi A, Khalifi S, Jedi S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes. *Acta Physiol Hung*. 2014;101(April 2015):408–20.
14. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother*. 2013 Oct;4(4):303–6.
15. Handayani ES, Nurmasitoh T, Akhmad SA, Fauziah AN, Rizani R, Rahmawati RY, et al. Effect of BCCAO Duration and Animal Models Sex on Brain Ischemic Volume After 24 Hours Reperfusion. *Bangladesh J Med Sci* [Internet]. 2018;17(01):129–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.3329/bjms.v17i1.35293>
16. Siemel RI, Kataoka H, Kim SW, Seker FB, Plesnila N. Adhesion of Leukocytes to Cerebral Venules Precedes Neuronal Cell Death and Is Sufficient to Trigger Tissue Damage After Cerebral Ischemia. *Front*

- Neurol. 2022;12(January):1–16.
17. Naredi M, Jhavae D, Krishan D. Study of relationship between WBC count and Diabetic complications. *Int J Adv Med*. 2017;4(4):1128.
 18. Yakhchalian N, Mohammadian N, Hatami K, Nosrati H, Yousofvand N. Hematological and Serum Biochemical Analysis of Streptozotocin-Induced Insulin Dependent Diabetes Mellitus in Male Adult Wistar Rats. *bioRxiv [Internet]*. 2018;(Iddm):359844. Available from: <https://doi.org/10.1101/359844>
 19. Konsue A, Picheansoonthon C, Talubmook C. Fasting blood glucose levels and hematological values in normal and streptozotocin-induced diabetic rats of *mimosa pudica* L. extracts. *Pharmacogn J*. 2017;9(3):315–22.
 20. Zaidan HK, Ibrahim IH, Al Saadi AH, Ewadh MJ, Ali QM, Ameri A. Total and differential leukocytes count in type 2 diabetes mellitus patients in Iraq. *Res Biotechnol [Internet]*. 2012;3(2):32–40. Available from: www.researchinbiotechnology.com
 21. El Amki M, Glück C, Binder N, Middleham W, Wyss MT, Weiss T, et al. Neutrophils Obstructing Brain Capillaries Are a Major Cause of No-Reflow in Ischemic Stroke. *Cell Rep*. 2020;33(2).
 22. Dolgushin II, Zaripova ZZ, Karpova MI. The role of neutrophils in the pathogenesis of ischemic stroke. *Bull Sib Med*. 2021;20(3):152–60.
 23. Li P, Gan Y, Mao L, Leak R. The Critical Roles of Immune Cells in Acute Brain Injuries. In: *Immunological Mechanisms and Therapies in Brain Injuries and Stroke*. 2014. p. 9–25.
 24. Desilles JP, Syvannarath V, Ollivier V, Journé C, Delbosc S, Ducroux C, et al. Exacerbation of Thromboinflammation by Hyperglycemia Precipitates Cerebral Infarct Growth and Hemorrhagic Transformation. *Stroke*. 2017;48(7):1932–40.
 25. Slijepčević V, Manojlović M, Dekić R, Lolić S, Đeri A, Radović I. Differential leucocyte count of alloxan-treated Wistar rats Animals. *SKUP*. 2019;10(1):37–44.
 26. Otxoa-De-Amezaga A, Gallizioli M, Pedragosa J, Justicia C, Miró-Mur F, Salas-Perdomo A, et al. Location of Neutrophils in Different Compartments of the Damaged Mouse Brain after Severe Ischemia/Reperfusion. *Stroke*. 2019;50(6):1548–57.
 27. Kim JY, Park J, Chang JY, Kim S-H, Lee JE. Inflammation after Ischemic Stroke: The Role of Leukocytes and Glial Cells. *Exp Neurobiol [Internet]*. 2016;25(5):241. Available from: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5607/en.2016.25.5.241>
 28. Kawabori M, Yenari MA. Inflammatory Responses in Brain Ischemia. *Curr Med Chem*. 2015;22(10):1258–77.
 29. Kraft P, Drechsler C, Schuhmann MK, Gunreben I, Kleinschnitz C. Characterization of peripheral immune cell subsets in patients with acute and chronic cerebrovascular disease: A case-control study. *Int J Mol Sci [Internet]*. 2015;16(10):25433–49. Available from: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
 30. Zhao H, Xu Q, Feng H, Hou X, Wen Z, Cheng Q. Dynamic Change of Eosinophil and Acute Ischemic Stroke [Internet]. 2020. Available from: <https://orcid.org/0000-0003-2211-4749>
 31. Gopinath H, Shivashankar M. A study on toxicity and anti-hyperglycemic effects of Abhrak Bhasma in rats. *J Ayurveda Integr Med [Internet]*. 2021;12(3):443–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2021.03.004>