

Estimasi Volume Insula Pancreatica Tikus dengan Metode Stereologi Secara Manual pada Layar Komputer

Anggi Laksmi Dew¹, Iffah Mardhiyah², Hilizza Awalina³, Y. Suhardi⁴, Sumaryati⁵, Rina Susilowati⁶

^{1,2,3,5}Departemen Histologi, FKKMK, UGM, Yogyakarta

⁴Departemen Histologi, FKKMK, UGM, Yogyakarta, ysuhardi@ugm.ac.id

Submisi: 16 Agustus 2019; Penerimaan: 3 Oktober 2019

ABSTRAK

Latar belakang: Estimasi volume insula pancreatica diperlukan untuk mendapatkan gambaran distribusi sel endokrin yang ada di dalamnya. Estimasi yang tidak bias dapat dilakukan dengan metode Cavalieri, namun belum semua laboratorium memiliki perangkat lunak untuk melakukan perhitungan ini.

Tujuan penelitian: Untuk melakukan uji estimasi volume insula pancreatica tikus dengan metode Cavalieri menggunakan cetakan pengukur titik di plastik dan foto di layar datar komputer.

Metode: Satu ekor tikus Wistar jantan berumur 3 bulan, dikorbankan dengan cara dekapitasi. Pancreas diambil, difiksasi dan disiapkan untuk ditanam dalam blok paraffin. Sampel irisan dibuat dengan prinsip acak sistematis dan diwarnai dengan hematoksilin-eosin. Dengan menggunakan peralatan sederhana yang telah tersedia di laboratorium, estimasi volume dilakukan dengan metode hitung titik sesuai prinsip Cavalieri.

Hasil: Sebanyak 7 irisan dengan jarak antar irisan 400 μm diamati, titik terhitung untuk estimasi volume pancreas 107 dengan luas area yang diwakili oleh satu titik (a/p) 49.382,62 μm^2 . Volume total pancreas didapatkan sebesar 2,11x10⁹ μm^3 (Coefficient of Error (CE) 10%). Pada estimasi volume insula pancreatica didapatkan titik terhitung 7102 dengan a/p 229,57 μm^2 yang menghasilkan penghitungan fraksi volume insula sebesar 30,8%. Volume insula pancreatica terhitung sebesar 0,65x10⁹ μm^3 (CE 7,6 %).

Kesimpulan: Metode yang dilakukan merupakan cara yang mudah dan murah untuk melakukan estimasi volume, namun memiliki keterbatasan karena jarak antar titik tidak dapat disesuaikan dengan mudah.

Kata kunci: stereologi, estimasi volume, fraksi volume, insula pancreatica, metode Cavalieri

PENDAHULUAN

Pancreas merupakan organ penting yang memiliki dua populasi sel berbeda, yaitu exocrinocytus yang menyekresi enzim ke tractus digestivus, dan endocrinocytus yang menyekresi hormon ke aliran darah (Altunkaynak et

al., 2013). Endocrinocytus terkumpul pada insula pancreatica, yaitu pulau pulau kelenjar endokrin yang ada di pancreas. Endocrinocytus di insula pancreatica antara lain terdiri dari sel alfa (α), beta (β), dan delta (δ). Sel α menghasilkan glukagon, sel β sebagai

tempat sintesis dan sekresi insulin, sedangkan sel δ menghasilkan somatostatin (Sherwood, 2006). Sel beta pada insula pancreatica mengalami kerusakan pada kondisi diabetes tipe 1 dan pada tahap lanjut diabetes tipe 2. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah insula pancreatica dan volume massa sel-sel beta pada penderita diabetes (Noorafshan *et al.*, 2012). Oleh karena itu evaluasi volume insula pancreatica sering digunakan sebagai parameter dalam menilai kemanfaatan obat anti diabetik yang diharapkan berfungsi memicu regenerasi sel beta.

Stereologi merupakan metode estimasi kuantitatif yang tidak bias pada struktur tiga dimensi (3D) dari sampel berupa gambaran dua dimensi (2D). Berbagai parameter yang data diukur dengan metode stereologi meliputi panjang, luas, volume, hingga jumlah. Metode yang paling sering digunakan untuk mengestimasi volume adalah metode Cavalieri (Marcos *et al.*, 2012). Cavalieri berteori bahwa dua benda padat akan memiliki volume yang sama ketika keduanya memiliki ketinggian yang sama dan memiliki kesamaan luas area potongan melintang yang diambil secara paralel (Golub *et al.*, 2015). Sampel irisan yang diambil dengan metode acak sistematis (*systematic uniform random sampling/SURS*), merupakan metode untuk mendapatkan sampel yang representatif (Boyce *et al.*, 2010). Gundersen dan Jensen (1987) dalam (West, 2013) mengemukakan bahwa estimasi stereologi yang optimum didapatkan dari 7-14 irisan, 100-200 hitungan dengan *coefficient of error* kurang dari 10%.

Perangkat lunak stereologi masih merupakan perangkat yang mahal. Peneliti yang tidak memiliki akses pada perangkat lunak tersebut menggunakan cara manual dengan mencetak foto

preparat terlebih dahulu dan menggunakan pengukur (*probe*) yang tercetak pada plastik yang ditempatkan di atas foto. Cara ini membutuhkan waktu dan biaya yang lebih banyak. Cara lain adalah menggunakan perangkat lunak untuk foto seperti Photoshop. Peneliti tidak perlu mencetak foto dan plastik sehingga lebih murah dan hemat waktu namun tidak semua peneliti memiliki kemampuan menggunakan program ini. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan optimasi perhitungan volume pancreas dan insula pancreatica pada tikus Wistar jantan dengan metode hitung titik (Cavalieri), menggunakan titik berjarak tertentu yang telah tercetak pada plastik dan tersedia di laboratorium. Secara manual plastik tersebut dapat diletakkan di atas layar datar monitor komputer untuk hitung titik. Cara ini merupakan cara yang mudah bagi peneliti dengan kemampuan komputer terbatas dan tidak memiliki akses pada perangkat lunak stereologi.

METODOLOGI

Nekropsi hewan coba dan fiksasi jaringan

Tikus *Wistar* jantan berumur 3 bulan dengan berat 180 gram dianestesi secara intraperitoneal. Larutan Xylazine dan Ketamine (1:10) digunakan sebagai anestesikum dengan dosis 100 μ L/100g berat badan. Perfusi transkardial dilakukan dengan menyiapkan set selang infus beserta jarumnya yang dihubungkan dengan pompa peristaltik (*Perista Pump* SJ1211). Tikus ditidurkan dalam posisi terlentang dan bagian tubuh frontal diusap dengan alkohol. Rongga abdomen dan thorax dibuka hingga jantung terlihat. Canula dimasukkan pada area ventriculus kiri diikuti penggantungan atrium kanan. Perfusi transkardial dilakukan dengan memasukkan larutan *Phosphate-*

buffered Saline (PBS) dengan canula yang masuk melalui jantung hingga aorta sehingga beredar ke seluruh tubuh. Setelah darah dikeluarkan, fiksatif paraformaldehid 4% dalam PBS dialirkan selama 15 menit. Seluruh pancreas yang melekat pada lien hingga duodenum diambil dan dimasukkan ke dalam larutan paraformaldehid 4% dalam PBS semalam.

Pembuatan preparat histologi

Jaringan didehidrasi dengan alkohol bertingkat untuk persiapan penanaman ke dalam blok parafin. Selanjutnya dilakukan *clearing* dengan pelarut organik yaitu toluol dan menggantinya dengan media penanaman yaitu parafin. Blok parafin diiris dengan ketebalan 4 µm. Irisan diambil secara acak sistematis. Jarak antar irisan yaitu 100 irisan. Angka acak yang terambil adalah 69 sehingga irisan yang didapat 7 irisan yaitu irisan nomor 69, 169, 269, 369, 469, 569, dan 669. Irisan yang telah didapat diletakkan di atas gelas obyek dan dilakukan deparafinisasi sebelum diwarnai dengan hematoksilin eosin. Setelah ditutup dengan gelas penutup, foto keseluruhan pancreas diambil dengan mikroskop Olympus perbesaran lensa obyektif 4 kali yang terhubung dengan kamera dan program *microstepper* (PT. Miconos Indonesia). Masing masing insula pancreatica diamati dengan lensa obyektif perbesaran 40x dan difoto dengan kamera digital terhubung dengan Optilab (PT. Miconos Indonesia). Skala ditambahkan pada foto dengan program *Image Raster* (PT. Miconos Indonesia).

Estimasi volume pancreas

Estimasi volume pancreas dan insula pancreatica dilakukan dengan metode Cavalieri, menggunakan susunan titik yang tercetak pada plastik mika. Hitung titik dilakukan dengan foto

yang terpampang pada layar datar komputer, yang ditumpang tindihkan dengan plastik mika. Area yang diwakili oleh satu titik dihitung dengan menyesuaikan skala gambar pada layar. Setiap titik yang jatuh di dalam gambar pancreas dihitung. Berikut cara perhitungan titik untuk estimasi volume pancreas.

Penghitungan volume menggunakan rumus sebagai berikut:

$$V = T \times \frac{a}{p} \times \sum_{i=1}^m P_i$$

Keterangan:

V : volume pancreas

T : jarak antar irisan

a/p : luas area yang diwakili oleh titik (x.y)

ΣPi : jumlah titik yang jatuh pada area korteks

Penghitungan presisi estimasi dilakukan untuk mengetahui hasil optimasi data yang didapat, dihitung dengan rumus:

$$CE(\Sigma P_i) = \frac{\sqrt{VAR_{TOTAL}}}{\Sigma P}$$

$$VAR_{TOTAL} = VAR_{SURS} + S^2$$

$$VAR_{SURS} = (3 \times [A - S^2] - 4 \times B + C)/\alpha$$

$$S^2 = 0,0724 \times \text{shapefactor} \times \sqrt{n \times \Sigma P}$$

Keterangan:

CE : *coefficient of error*

VARtotal : variasi total

VAR_SURS : variasi hitungan antar irisan

S² : variasi hitungan dalam satu irisan

ΣP : jumlah titik keseluruhan

α : *smoothness factor* (240 bila distribusi data normal; 12 bila tidak normal)

shapefactor : tergantung bentuk jaringan

n : jumlah irisan yang digunakan

Estimasi Volume Insula Pancreatica

Insula pancreatica pada setiap irisan difoto satu persatu. Hitung titik dilakukan sama seperti pada estimasi volume pancreas. Estimasi volume insula pancreatica dilakukan dengan menggunakan penghitungan fraksi volume terlebih dahulu, sesuai dengan rumus berikut:

$$V I = Xv I \times VP$$

$$Xv I = \frac{\text{luas permukaan insula pancreatica}}{\text{luas permukaan pancreas}}$$

$$= \frac{\sum Pi I \times \frac{a}{p} I}{\sum Pi P \times \frac{a}{p} P}$$

Keterangan:

Xv I : Fraksi volume insula pancreatica

V I : Volume insula pancreatica

V P : Volume pancreas

$\sum Pi I$: jumlah titik yang jatuh pada area insula pancreatica

a/p I : luas area insula pancreatica yang diwakili oleh titik (x.y)

$\sum Pi P$: jumlah titik yang jatuh pada area pancreas

a/p P : luas area insula pancreatica yang diwakili oleh titik (x.y)

Presisi estimasi untuk estimasi volume insula pancreatica menggunakan rumus yang sama dengan presisi estimasi volume pancreatica. Nilai *shapefactor* yang digunakan adalah 4.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Estimasi Volume Pancreas

Hasil pewarnaan pancreas dengan hematoksilin-eosin dapat dilihat pada gambar 1, yang merupakan gambaran histologis pancreas hasil gabungan seluruh lapang pandang menggunakan *microstepper* (gambar 1.A) dan gambar insula pancreatica dengan perbesaran lebih kuat (gambar 1.B). Insula pancreatica merupakan area

yang terlihat lebih pucat, tersebar di seluruh pancreas dan tampak seperti pulau-pulau terpisah. Jarak antar titik pada plastik yang digunakan untuk estimasi volume pancreas adalah 222,22 μm , sehingga area yang diwakili oleh satu titik (a/p) sebesar 49.382,62 (222,22 $\mu\text{m} \times 222,22 \mu\text{m}$). Pada sampel ini didapatkan titik terhitung sebanyak 107 titik. Diketahui bahwa jarak antar irisan (T) adalah 400 μm (50 x 2 x 4 μm), maka perhitungan estimasi volume pancreas adalah sebagai berikut.

$$V = 400 \mu\text{m} \times 49.382,62 \mu\text{m}^2 \times 107$$

$$= 2.113,58 \times 10^6 \mu\text{m}^3$$

$$= 2,11 \times 10^9 \mu\text{m}^3$$

Perhitungan presisi estimasi volume berdasarkan hasil data jumlah titik terhitung dan nilai A, B, dan C yang diperoleh (Tabel 1).

$$S^2 = 0,0724 \times 4 \times \sqrt{7 \times 107} = 11,89$$

Perhitungan VAR_{SURS} , VAR_{TOTAL} , dan CE dari data yang diperoleh adalah sebagai berikut.

$$VAR_{SURS} = \frac{3 \times [1917 - 11,89] - (4 \times 1382) + 1132}{12}$$

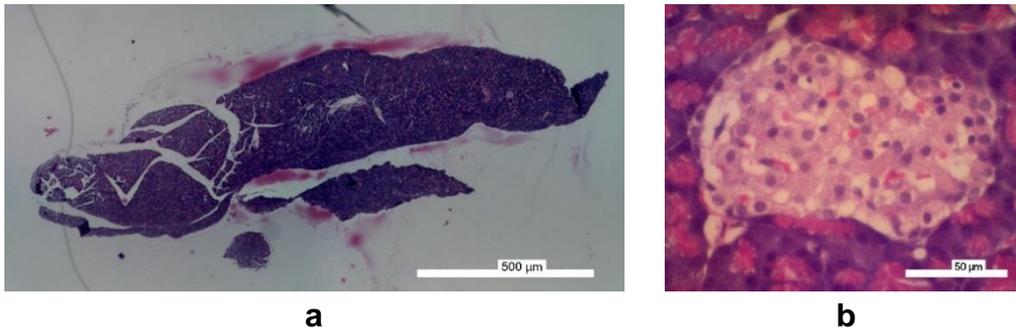
$$= 109,94$$

$$VAR_{TOTAL} = 109,94 + 11,89 = 121,83$$

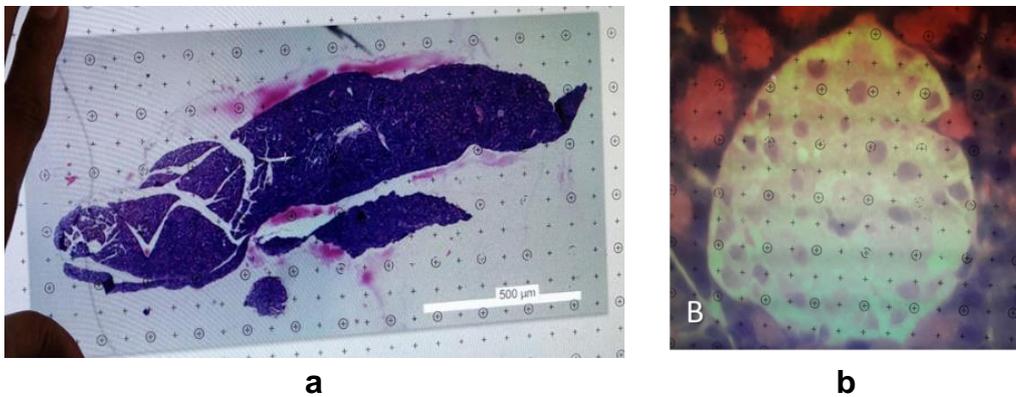
$$OCE(\sum Pi) = \frac{\sqrt{121,83}}{107} = 0,10 = 10\%$$

Tabel 1. Tabulasi penghitungan jumlah titik terhitung pada pancreas dengan a/p = 49.382,62 μm^2 dan nilai A, B, dan C untuk presisi estimasi volume pancreas

Irisan	Jumlah Titik Pi	A Pi.Pi	B Pi.Pi+1	C Pi.Pi+2
1	9	81	54	216
2	6	36	144	84
3	24	576	336	288
4	14	196	168	280
5	12	144	240	264
6	20	440	440	0
7	22	484	0	0
Σ	107	1917	1382	1132



Gambar 1. Hasil foto preparat sediaan histologi. (a) Foto pancreas dengan perbesaran 4X, pewarnaan HE. (b) Foto salah satu insula pancreatica dengan perbesaran 40X, pewarnaan HE.



Gambar 2. (a) Contoh penghitungan titik menggunakan titik dengan jarak tertentu yang tecetak pada plastik yang ditempatkan di permukaan layar komputer (b) Contoh foto satu insula pancreatica beserta gambaran perhitungan titik untuk estimasi volume yang terlihat pada layar monitor. Hanya titik yang dilingkari (jarak antar titik 15,152 µm; a/p 229,57 µm²) yang dihitung

Estimasi Volume Insula Pancreatica

Jarak antar titik pada perbesaran yang digunakan untuk estimasi volume insula pancreatica (gambar 2) adalah 15,152 µm sehingga nilai a/p sebesar 229,57 µm² (15,152 µm x 15,152 µm). Pada penghitungan didapatkan jumlah titik terhitung pada area insula pancreatica sebanyak 7.102 titik. Perhitungan estimasi volume insula pancreatica adalah sebagai berikut.

$$Xv I = \frac{\sum Pi I \times \frac{a}{p} I}{\sum Pi P \times \frac{a}{p} P} = \frac{7.102 \times 229,57}{107 \times 49.382,62} = 0,308 = 30,8\%$$

$$Vi = Xv I \times V P$$

$$Vi = 0,308 \times 2.113,58 \times 10^6 \mu m^3$$

$$Vi = 652,158 \times 10^6 \mu m^3$$

$$Vi = 0,65 \times 10^9 \mu m^3$$

Tahap berikutnya adalah perhitungan presisi estimasi volume berdasarkan hasil data jumlah titik terhitung dan nilai A, B, dan C yang diperoleh (Tabel 2). Hasil perhitungan S² dengan nilai *shapefactor* 6 adalah sebagai berikut.

$$S^2 = 0,0724 \times 6 \times \sqrt{7 \times 7.102}$$

$$S^2 = 96,86$$

Tabel 2. Jumlah titik terhitung dan nilai A, B, dan C untuk presisi estimasi volume insula pancreatica (a/p 229,57 μm²)

Irisan	Jumlah Titik Pi	A Pi.Pi	B Pi.Pi+1	C Pi.Pi+2
1	5	25	900	4350
2	180	32400	156600	211860
3	870	756900	1023990	1378080
4	1177	1385329	1864368	1846713
5	1584	2509056	2485296	2719728
6	1569	2461761	2693973	0
7	1717	2948089	0	0
Σ	7102	10093560	8225127	6160731

Perhitungan VAR_{SURS}, VAR_{TOTAL}, dan CE dari data yang diperoleh adalah sebagai berikut.

$$\begin{aligned}
 VAR_{SURS} &= \frac{3 \times [10.093.560 - 96,86] - (4 \times 8.225.127) + 6.160.731}{12} \\
 &= \mathbf{295.051,04} \\
 VAR_{TOTAL} &= 295.051,04 + 96,8 = \mathbf{295.147,89} \\
 CE(\Sigma P_i) &= \frac{\sqrt{295.147,89}}{7.102} = \mathbf{0,076 = 7,6\%}
 \end{aligned}$$

Pembahasan

Hasil estimasi volume pancreas didapatkan sebesar 2,11x10⁹ μm³ dengan *coefficient of error* (CE) 10%. Hasil estimasi volume insula pancreatica adalah 0,62x10⁹ μm³ dengan CE 7,6%. Volume merupakan suatu parameter yang sangat dipengaruhi oleh perubahan bentuk jaringan akibat pemrosesan (Khorsandi dan Dehbashi, 2013). Pada hasil estimasi kali ini tingkat penyusutan jaringan tidak diukur sehingga tidak diketahui informasi terkait deformasi jaringan selama fiksasi dan pemrosesan.

Titik terhitung pada estimasi volume pancreas sebenarnya sudah lebih dari 100 dan CE 10%. CE ini sudah terhitung cukup, namun dengan memperkecil *area per point* (a/p) diharapkan total jumlah titik akan lebih

banyak mendekati 200 dan CE akan berkurang (Boyce *et al.*, 2010). Selain itu, CE juga dapat dikurangi dengan cara meningkatkan VAR_{SURS} yaitu dengan menambah jumlah irisan yang dihitung. Pada penelitian ini didapatkan 7 irisan, yang merupakan jumlah minimal sampel irisan, sedangkan beberapa penulis menganjurkan penggunaan 8-10 irisan (Marcos *et al.*, 2012). CE pada penghitungan volume insula pancreatica (7,6%) lebih rendah dibandingkan CE pada estimasi volume pancreas. Pada penelitian ini susunan titik dengan jarak tertentu yang tercetak pada plastik dan telah tersedia di laboratorium dapat digunakan untuk estimasi volume secara manual dengan menempatkan plastik tersebut di atas layar datar monitor komputer. Cara ini relatif mudah dilakukan oleh peneliti yang tidak memiliki kemampuan menggunakan perangkat lunak Photoshop dan murah karena tidak perlu mencetak foto preparat.

Jumlah titik terhitung ternyata masih sangat banyak yaitu 7102 titik, jauh melebihi target 200 titik terhitung, sehingga belum memenuhi prinsip *do more less well* dari Gundersen & Osterby (1981). Untuk mengurangi jumlah titik maka a/p perlu disesuaikan menjadi lebih luas, namun hal ini sulit dilakukan menggunakan titik yang telah tercetak pada plastik. Untuk melakukan hal tersebut perlu dibuat lagi cetakan titik pada plastik dengan jarak yang disesuaikan. Salah satu solusinya adalah memiliki beberapa macam cetakan titik dengan jarak yang berbeda sehingga peneliti dapat memilih cetakan yang paling sesuai untuk melakukan estimasi volume. Kekurangan metode ini adalah pilihan area yang diwakili oleh satu titik terbatas karena jarak antar titik tidak dapat disesuaikan dengan mudah. Penggunaan perangkat lunak untuk membuat titik yang dapat disesuaikan

dengan kebutuhan hitung titik yang optimum dapat membantu mendapatkan metode yang lebih optimum. Salah satu program yang dapat digunakan secara bebas dengan mengunduh dari internet adalah *Image-J* atau *NIH image*. Program tersebut merupakan perangkat lunak yang dapat menganalisis dan memproses gambar sesuai kebutuhan dalam penelitian (Rueden *et al.*, 2017). Saat ini telah dikembangkan beberapa *grid* untuk aplikasi stereologi pada perangkat lunak *Image-J*. Diharapkan penggunaan metode tersebut akan lebih mudah dilakukan dari pada membuat sendiri *grid* dengan aplikasi gambar seperti Photoshop, sehingga dapat lebih mudah dipelajari dan dilakukan oleh semua teknisi dan peneliti.

KESIMPULAN

Estimasi penghitungan volume pancreas dan insula pancreatica secara manual dengan plastik ditempatkan di atas monitor komputer merupakan cara yang mudah dan murah dan sudah mendapatkan *coefficient of error* yang cukup baik. Kelemahan penggunaan peralatan manual ini untuk estimasi volume adalah jarak antar titik yang tidak dapat disesuaikan dengan kebutuhan. Penggunaan perangkat lunak diharapkan dapat meningkatkan efisiensi kerja estimasi volume insula pancreatica.

DAFTAR PUSTAKA

- Altunkaynak, M. E., Zuhail A., Deniz U., Omur D., Ozgen V., Bunyami U. 2013. A stereological and ultrastructural approach to fetal and newborn rat pancreas, *J. Exp. Clin. Med.*, 30:147–151. doi: 10.5835/jecm.omu.30.02.012.
- Boyce, R. W., Karl A. D. P., Lise L., Hans J. G. 2010. Design-based Stereology: Introduction to Basic Concepts and Practical Approaches for Estimation of Cell Number, *Toxicologic Pathology*, 38:1011–1025. doi: 10.1177/0192623310385140.
- Golub, V. M., Jonathan B., Xin W., Ramkumar K., Jenessa S., Maunica M. 2015. Neurostereology protocol for unbiased quantification of neuronal injury and neurodegeneration, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7:1–14. doi: 10.3389/fnagi.2015.00196.
- Gundersen, H. J. & Osterby, R. 1981. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'do more less well!'. *J Microsc.* 121(Pt 1): 65-73.
- Khorsandi, L. dan Nejad-dehbashi, F., 2013. Exendin-4 effects on islet volume and number in mouse pancreas, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(4):745–752.
- Marcos, R., Monteiro, R., Rocha, E., 2012. The use of design-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines, *Journal of Anatomy*, 220: 303–317. doi: 10.1111/j.1469-7580.2012.01475.x.
- Noorafshan, A., Leila H., Saied K., Elham N. 2012. A Simple Stereological Method for Estimating the Number and the Volume of the Pancreatic Beta Cells, *JOP. J Pancreas*, 13(4):427–432.
- Rueden, C. T., Johannes S., Mark C. H., Barry E. D., Allison E. W. 2017. ImageJ2: imageJ for the next generation of scientific image data, *BMC Bioinformatics*, 18:529-555.
- Sheerwood, L., 2006. *Fundamentals of physiology: a human perspective*, 3rd ed. Thomson Higher Education, United States of America.
- West, M. J., 2013. Getting Started in Stereology, *Cold Spring Harb Protoc.*, 4:287–298. doi: 10.1101/pdb.top071845.