

MODEL TIKUS DIABETES YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN-SUKROSA UNTUK PENDEKATAN PENELITIAN DIABETES MELITUS GESTASIONAL

Streptozotocin, Sucrose- Induce Diabetic Male Rats Model for Research Approach of Gestational Diabetes Mellitus

Firdaus¹, Rimbawan², Sri Anna Marliyati², Katrin Roosita².
Program Studi Ilmu Gizi Masyarakat Sekolah Pascasarjana IPB
(suadrifaviv@gmail.com,)

ABSTRAK

Diabetes melitus gestasional (DMG) merupakan intoleransi glukosa pada berbagai tingkatan yang terjadi selama kehamilan. DMG pada wanita meningkatkan risiko kematian sebelum kelahiran pada ibu dan bayinya, tingkat kesakitan pada ibu dan meningkatkan risiko berkembangnya DM tipe-2 setelah melahirkan. Penggunaan hewan coba alternatif dengan metode yang tepat dalam penelitian DMG dengan pendekatan DM tipe-2 telah banyak dilakukan dan cukup mendesak. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui apakah induksi Streptozotocin-sukrosa dapat menghasilkan DM tipe-2 pada tikus yang dapat digunakan sebagai pendekatan dalam penelitian DMG. Penelitian ini bersifat eksperimental, tikus *Sprague Dawley* jantan berjumlah 45 ekor berusia 6 minggu dialokasikan pada 2 kelompok: kontrol (n=5) dan diabetes (n=40). Kelompok kontrol diinjeksi secara intraperitoneal dengan *phosphat buffer saline* (PBS) tanpa sukrosa dan kelompok diabetes diinjeksi secara intraperitoneal dengan *streptozotocin* (STZ) dosis 40 mg/kg berat badan dan diberikan 30% sukrosa secara *ad libitum*, pengukuran glukosa darah puasa dan berat badan dilakukan tiap 3 hari. Setelah minggu ke-4 perlakuan, terdapat 24 tikus pada kelompok diabetes dengan glukosa darah puasa diatas 126 mg/dL dan menunjukkan perbedaan signifikan glukosa darah ($p<0.05$) dan peningkatan berat badan ($p<0.05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Induksi STZ-sukrosa dapat menghasilkan DM tipe-2 pada tikus *Sprague dawley* jantan dan dapat digunakan sebagai pendekatan penelitian DMG. **Kata kunci : Streptozotocin, sukrosa, Gestasional Diabetes Melitus (GDM)**

ABSTRACT

Gestational Diabetes mellitus (GDM) is defined as glucose intolerance of various degrees that is first detected during pregnancy. Individuals with GDM have increased risk for perinatal mortality and morbidity and clearly are at increased risk for the later development of diabetes especially type-2 diabetes. This make the use of alternative experimental models for the disease is promoted. The aim of this study was to investigate whether streptozotocin-sucrose-induced in rats results type-2 diabetes as the same as GDM. Type of study is experimental, on 6 month of age 45 male Sprague Dawley rats were assigned to two experimental groups: control (n=5), and diabetic (n=40). Control group was injected intraperitoneally with phosphat buffer saline (PBS) without sucrose and diabetic group injected intraperitoneally with streptozotocin (STZ) dosage of 40 mg/kg body weight with 30% sucrose ad libitum and each 3 days fasting blood glucose and body weight was measured. After 4 weeks of treatment, 24 rats on diabetic groups with fasting blood glucose level above 126 mg/dL and showed significantly different in blood glucose ($p<0.05$) and weight gain ($p<0.05$) compare with control. STZ-sucrose-induced can results type-2 diabetic in Sprague dawley male rats that can be used to GDM research. Key words : Streptozotocin, Sucrose, Diabetes Mellitus Gestasional (DMG)

PENDAHULUAN

Diabetes melitus gestasional (DMG) didefinisikan sebagai suatu gangguan toleransi glukosa yang timbul atau pertama kali dideteksi pada saat kehamilan. Kondisi ini terjadi pada 3-7% perempuan hamil.¹ DMG merupakan salah satu faktor risiko terjadinya komplikasi pada janin dan berkaitan dengan timbulnya diabetes melitus tipe 2 di masa yang akan datang bagi perempuan yang pernah didiagnosis DMG,² disamping faktor hipertensi, umur, gaya hidup, etnik, ras dan budaya.^{3,4} Diabetes melitus pada kehamilan memiliki dampak yang serius pada ibu dan anak yang dilahirkannya jika tidak ditangani dengan baik.⁵

Prevalensi DMG dunia telah meningkat dalam kurun waktu 20 tahun terakhir, bervariasi antar ras dan grup etnik,⁶ dan berbeda antar kelompok ras dan budaya yang berbeda di negara yang sama.⁷ Prevalensi DMG di Negara-negara Asia, juga terdapat peningkatan, di Tianjin, China DMG meningkat dari 2.4% (2002) menjadi 6.8% (2008), di Hong Kong dari 7.4% (1986) menjadi 10.4% (1998-2001), di Bangkok Thailand dari 2.0% (1987-1989) menjadi 3.0% (2001-2002), dan prevalensi di India bervariasi tergantung lokasi dan kriteria diagnosa DM dengan prevalensi tertinggi pada wilayah urban Chennai dari 17.7% (2001) dan 17.8% (2005-2007).⁸

Berdasarkan semakin meningkatnya prevalensi dan dampaknya terhadap fisik dan keadaan psikologis penderita, saat ini diabetes mendapatkan perhatian yang besar dalam dunia medis. Diabetes kemudian berkembang menjadi tidak dapat diobati dan hanya dapat dikontrol dengan bantuan obat. Selama bertahun-tahun, beberapa hewan coba telah dikembangkan untuk mempelajari diabetes melitus atau untuk melakukan pengujian agen anti-diabetes baik obat baru ataupun komponen aktif pada bahan tertentu yang memiliki potensi anti-diabetik. Model ini antara lain dengan melibatkan komponen kimia, pembedahan (*pancreatectomy*), dan manipulasi genetik pada beberapa spesies hewan untuk menghasilkan diabetes melitus sesuai tujuan.⁹ Pemilihan model hewan yang paling sesuai untuk mempelajari pengaruh suatu komponen tertentu sebagai anti-diabetes dalam kaitannya untuk mengatasi penyakit tersebut kemungkinan menjadi sangat sulit terutama bagi peneliti muda. Penelitian ini bertujuan un-

tuk mempelajari kombinasi induksi streptozotocin-sukrosa dalam menghasilkan DM tipe-2 pada tikus sebagai pendekatan untuk penelitian DMG.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari komisi etik penelitian kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Nomor 505/UN2.F1/ETIK/2015. Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental dengan 2 kelompok perlakuan kontrol dan diabetes. Penelitian dilaksanakan dari bulan Desember 2014 – Januari 2015. Jumlah sampel 45 ekor tikus strain Sprague Dawley Jantan (*veteriner stem cell* LPPM IPB), umur 6 bulan dengan berat 120 – 140 gram ditempatkan secara kelompok dengan lingkungan dan perlakuan yang sama, suhu ruang diatur dengan kisaran 20-28 °C, kelembaban 50±10% dan siklus gelap-terang masing-masing 12 jam.¹⁰ Tikus yang digunakan dalam penelitian ini berjenis kelamin jantan, hal ini didasarkan karena kondisi kehamilan dan jenis kelamin pada tikus bukanlah hal yang paling mendasar akan tetapi lebih pada kesamaan patogenesis dari DMG antara lain penurunan sensitifitas insulin dan berkurangnya respon insulin terhadap muatan glukosa baik oral maupun intravena yang berujung pada resistensi insulin.¹¹ Kebersihan kandang dijaga setiap hari dan serbuk kayu sebagai media alas tikus (*bedding*) diganti 2 kali per minggu. Tikus diberi pakan berupa diet standar untuk tikus dewasa dengan kandungan zat gizi makro disesuaikan dengan pakan Teklad Global 14% *Protein Rodent Maintenance Diet 2014S* dari Harlan™ Laboratories (2014) dan diberi minum secara *ad libitum* selama 10 hari sebelum masa percobaan.

Setelah 10 hari adaptasi dilakukan alokasi secara *purposive* dengan kelompok kontrol berjumlah 5 ekor dan kelompok diabetes berjumlah 40 ekor. Tikus pada kelompok diabetes diinjeksi STZ dengan dosis 40 mg/kg berat badan serta diberi minum larutan sukrosa 30% secara *ad libitum*, sedangkan kelompok kontrol diinjeksi *phosphat buffer saline* (PBS) dan diberi minum secara *ad libitum* tanpa sukrosa, selama masa percobaan, seluruh kelompok perlakuan mendapat pakan standar. Pengukuran glukosa darah puasa tikus dilakukan dari pembuluh darah ekor (*vena lateralis*)¹² dan penimbangan berat badan tikus masing-ma-

sing menggunakan glukometer *glucoDR Biosensor* dan timbangan digital, pengambilan data dilakukan tiap 3 hari setelah sebelumnya dipuasakan selama ± 10 jam. Banyaknya pakan dan minum yang dikonsumsi serta urin yang dihasilkan tikus dilakukan dengan pengamatan setiap hari. Tikus dinyatakan diabetes apabila glukosa darah puasa ≥ 126 mg/dL.^{13,14} Hasil disajikan dalam rata-rata dan standar deviasi, analisis data dengan menggunakan uji T berpasangan dan uji beda dengan menggunakan ANOVA. Perbedaan signifikan pada $p < 0.05$. Penyajian data dalam bentuk tabel dan gambar.

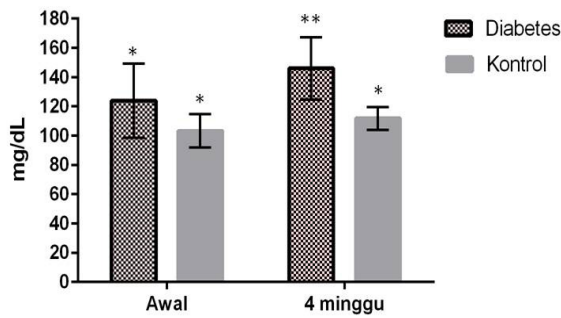
HASIL

Pada hari pertama pasca injeksi STZ, kemudian dilakukan pengukuran glukosa darah dan penimbangan berat badan tikus. Kelompok tikus diabetes yang diinduksi STZ dengan dosis 40

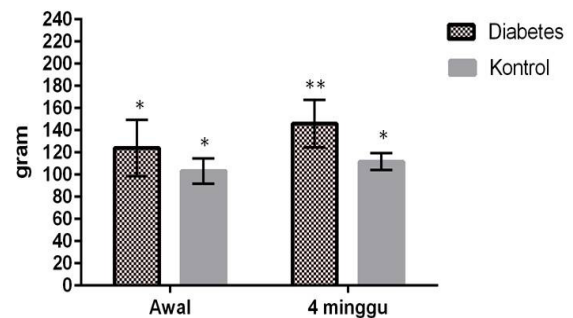
mg/kg berat badan memperlihatkan kadar glukosa darah puasa $124,36 \pm 8.78$ mg/dL yang masih pada rentang hiperglikemia sedangkan kelompok kontrol 103.25 ± 11.35 mg/dL (Gambar 1). Hasil penimbangan berat badan menunjukkan berat badan tikus kelompok diabetes pada hari pertama induksi 124.85 ± 8.78 g, sedangkan pada kelompok kontrol 131.08 ± 10.36 g (Gambar 2).

Setelah 4 minggu perlakuan, diperoleh glukosa darah puasa sesuai dengan *cut point* yang digunakan pada penelitian. Terdapat 24 ekor pada kelompok diabetes dengan glukosa darah puasa diabetes stabil yakni 146.00 ± 21.40 mg/dL, sedangkan pada kelompok kontrol 111.75 ± 7.72 mg/dL. Peningkatan glukosa darah puasa pada kelompok diabetes berbeda signifikan jika dibandingkan dengan glukosa darah puasa kelompok diabetes pada awal percobaan ($p < 0.05$) (Gambar 1).

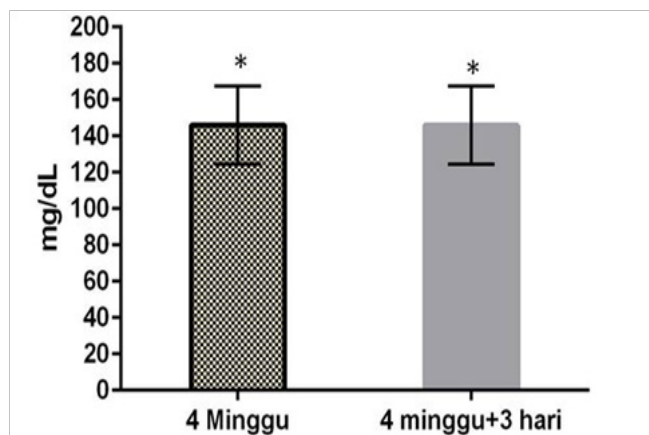
Pada minggu ke-4 percobaan terjadi pe-



Gambar 1. Glukosa Darah Awal dan 4 Minggu Percobaan pada Kelompok diabetes dan kontrol, () signifikan pada $p < 0.05$**



Gambar 2. Berat Badan Awal dan 4 Minggu Percobaan pada Kelompok Diabetes dan Kontrol, () signifikan pada $p < 0.05$**



Gambar 3. Glukosa Darah Puasa Tikus Setelah 4 Minggu dan 3 Hari Kemudian, (*) tidak signifikan pada $p < 0.05$

ningkatan berat badan pada kedua kelompok perlakuan, pada kelompok diabetes berat badan tikus sebesar 192.85 ± 26.78 g dan pada kelompok kontrol sebesar 190.50 ± 43.84 g. Peningkatan berat badan pada minggu ke-4 percobaan berbeda signifikan dibandingkan dengan berat badan pada awal percobaan (Gambar 2).

Setelah *cut point* tercapai pada minggu ke-4, untuk mengukur kestabilan glukosa darah, pemberian sukrosa 30% secara *ad libitum* pada kelompok diabetes kemudian dihentikan. Setelah itu dilakukan pengukuran kembali 3 hari setelah penghentian pemberian sukrosa. Hasil menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan glukosa darah puasa pada akhir masa pemberian sukrosa dengan 3 hari setelahnya (Gambar 3), sehingga dapat dikatakan bahwa tikus telah mengalami diabetes dengan kondisi glukosa darah diabetes stabil.

Pengamatan terhadap konsumsi pakan, minum dan banyaknya urin yang dihasilkan sebagai indikator perkembangan diabetes melitus antara lain polipagia (peningkatan konsumsi pakan), polidipsia (peningkatan konsumsi air) dan poliuria (peningkatan produksi urin) menunjukkan terdapat peningkatan konsumsi pakan dan minum yang ditandai dengan tidak tersisanya pakan standar yang diberi dan minum yang selalu habis dimulai pada hari ke-4 perlakuan pada kelompok tikus diabetes, penggantian *bedding* sebagai alas pada kandang menjadi lebih sering karena serutan kayu pada media pemeliharaan menjadi lebih basah dan aroma urin tercium lebih pekat. Berbeda dengan kelompok tikus kontrol yang tidak jauh berbeda konsumsi pakan, minum dan banyaknya urin pada saat awal dan akhir percobaan.

PEMBAHASAN

Induksi diabetes dengan STZ dosis 40 mg/kg berat badan disertai pemberian sukrosa 30% mampu meningkatkan glukosa darah puasa dan berat badan tikus secara signifikan. Penggunaa dosis 40 mg/kg berat badan tikus didasarkan karena aplikasi dosis dibawah 40mg/kg berat badan pada tikus meski pada awalnya terjadi hiperglikemi akan tetapi secara spontan akan terjadi mekanisme perbaikan dalam waktu singkat dari kondisi diabetes dengan kondisi volume urin normal dan sangat sedikitnya atau bahkan tidak terjadi

glikosuria.¹⁵ Reaksi STZ terhadap sel- β pankreas disertai dengan perubahan karakteristik pada insulin darah dan konsentrasi glukosa yang menyebabkan hiperglikemia dan menurunnya level insulin dalam darah.¹⁶ STZ mempengaruhi oksidasi glukosa dan menurunkan biosintesis dan sekresi insulin. STZ masuk ke sel- β pankreas melalui transporter glukosa GLUT2 menyebabkan menurunnya ekspresi dari GLUT2.¹⁶ Hal ini mengakibatkan penurunnya sensitifitas reseptor insulin perifer sehingga berdampak pada meningkatnya resistensi insulin dan meningkatkan kadar glukosa darah.

STZ mampu mempengaruhi glukosa darah melalui 3 mekanisme yakni antara lain : 1) Penumpulan atau hilangnya respon insulin tahap pertama, sehingga sekresi insulin terlambat dan gagal mengembalikan lonjakan gula darah prandial dalam waktu yang normal, 2) Penurunan sensitifitas insulin sebagai respon terhadap glukosa sedemikian hingga menyebabkan hiperglikemia, 3) Gagal memberikan stimulasi terhadap respon insulin yang wajar.^{17,18} Pemberian sukrosa memperbesar gejala diabetes yang diinduksi STZ dengan meningkatkan glukosa darah dan deposit lemak dan juga berat badan pada tikus.¹⁹

Pemberian larutan sukrosa dan lamanya durasi merujuk pada^{19,20,21}. Diet tinggi sukrosa selama 3-5 minggu telah dapat meningkatkan level glukosa darah dan hyperinsulinemia dan juga menurunkan sensitifitas insulin pada tikus²⁰ dan pada mencit.¹⁹ Diet tinggi sukrosa secara nyata merubah metabolisme glukosa yang dimediasi insulin yang dapat menghasilkan resistensi insulin pada tikus.²²

Peningkatan berat badan pada kelompok diabetes dapat terjadi dikarenakan terdampaknya regenerasi populasi sel- β dan terpengaruhnya reseptor insulin pada sel- β akibat STZ.²³ Mekanisme DMG mirip dengan DM Tipe-2 yang terjadi karena gangguan aksi dan sekresi insulin pada reseptor insulin yang menyebabkan resistensi, bukan karena rusaknya sel- β pankreas seperti pada DM Tipe-1.¹⁴ Sehingga tingginya asupan kalori pada kelompok tikus diabetes menyebabkan peningkatan perlemakan subkutan.^{24,25}

KESIMPULAN DAN SARAN

Induksi STZ dengan sukrosa 30% dapat

dapat menghasilkan DM tipe-2 pada tikus *Sprague dawley* jantan. Hal ini dapat sebagai alternatif hewan coba yang digunakan sebagai pendekatan dalam penelitian DMG. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan kombinasi sukrosa beberapa taraf atau dengan membandingkan dengan glukosa murni atau dengan kombinasi pemberian pakan tinggi lemak sehingga dapat dijadikan alternatif pembuatan diabetes tipe-2 pada tikus yang diinduksi dengan agen diabetogenik.

DAFTAR PUSTAKA

- Zhang H, Zhang J, Pope CF, Crawford LA, Vasavada RC, Jagasia SM, Gannon M.. Gestational diabetes mellitus resulting from impaired β -Cell compensation in the absence of FoxM1, a novel downstream effector of placental lactogen. *Diabetes* 2010;59:143–152.
- Adam JMF. Klasifikasi dan kriteria diagnosis diabetes melitus yang baru. *Cermin Dunia Kedokteran*. 2000;127:37-40.
- Lowdermilk DL, Perry SE, Bobak IM.. Maternity nursing. Edisi ke-5. St. Louis : Mosby; 1999
- Sutanegara D, Darmono, Budhiarta AAG. The epidemiology and management of diabetes mellitus in Indonesia. *Diabet Res Clin Prac*. 2000;50(2):S9-S16.
- Purnamasari D, Waspadji S, Adam JMF, Rudijanto A, Tahapary D. Indonesian Clinical Practice Guidelines for Diabetes in Pregnancy. *JAFES*. 2013;28(1):9-13.
- Ferrara A.. Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus : A public health perspective. *Diabetes Care*. 2007;30(2).
- Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams D.. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*. 2009;373(9677):1773 – 1779.
- Hirst JE, Greenow CHR, Jeffery HE. A systematic review of trends of gestational diabetes mellitus in Asia. *Journal of Diabetology*. 2012;3(4).
- Etuk EU. Animals models for studying diabetes mellitus. *Agric. Biol. J. N. Am*. 2010; 1(2): 130-134.
- Koolhaas JM.. The Laboratory Rat Chapter 22. Di dalam: Hubercht R, Kirkwood J, editor. *The UFAW Handbook on The Care and Management of Laboratory and Others Research Animals*. Wheathampstead (UK). Wiley-Blackwell; 2010
- Hellerstrom C, Swenne I, Eriksson UJ. Is there an animal model for gestational diabetes?. *Diabetes*. 1985;34(2).
- Rantam FA.. *Metode Imunologi*. Cet.1. Surabaya (ID): Airlangga University Press; 2003.
- Jung JY, Lim Y, Moon MS, Kim JY, Kwon O. Onion peel extracts ameliorate hyperglycemia and insulin resistance in high fat diet/ streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition and Metabolism*. 2011;8(18).
- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes . *Diabetes Care*. 2015;38(1):S1-S94.
- Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic Action of Streptozotocin: Relationship of Dose to Metabolic Response. *The Journal of Clinical Investigation*. 1969;48:2129-2139.
- Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res*. 2001;50: 536-546.
- Garvey WT. Glucose transport and NIDDM [ulasan]. *Diabetes Care*. 1992;15(3).
- Mayfield JA, White RD. Insulin therapy for type 2 diabetes: rescue, augmentation, and replacement of beta-cell function. *American Family Physycian*. 2004;70(3).
- Cao D, Lu H, Lewis TL, Li L. Intake of sucrose-sweetened water induces insulin resistance and exacerbates memory deficits and amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2007;282(50):36275–36282.
- Chicco A, D'Alessandro ME, Karabatas L, Pastorale C, Basabe JC, Lombardo YB.. Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. *J Nutr*. 2003;133: 127-133.
- Daly M. Sugars, insulin sensitivity, and the postprandial state. *Am J Clin Nutr*: 2003;78:865S–72S.
- Pagliassoti MJ, Gayles EC, Podolin DA, Wei Y, Morin CL. Developmental stage modifies diet-induced peripheral insulin resistance in rats. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol*. 2000;278: R66–R73.

23. Calcutt NA.. Modeling Diabetic Sensory Neuropathy in Rats. Di dalam: Luo ZD, editor. Pain Research: Methods and Protocols. New Jersey (US). Humana Press; 2004.
24. Archer ZA, Rayner DV, Rozman J, Klingspor M, Mercer JG.. Normal distribution of body weight gain in male sprague-dawley rats fed a high-energy diet. *Obes Res.* 2003;11:1376-1383.
25. Russel-Jones D, Khan R.. Insulin-associated weight gain in diabetes--causes, effects and coping strategies. *Diabetes Obes Metab.* 2007;9(6):799-812.