

PERUBAHAN KADAR GLUKOSA DARAH PUASA PADA TIKUS *Sprague Dawley* YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN DOSIS RENDAH

Zulkarnain

Abstrak. Streptozotocin (STZ) dapat menginduksi terjadinya diabetes melalui kerusakan sel beta pankreas. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa pemberian STZ dosis rendah secara bertahap dapat menimbulkan perbaikan spontan kadar gula darah pada tikus diabetes. Penelitian ini bertujuan untuk mengamati perubahan kadar glukosa darah puasa (GDP) setelah pemberian tunggal STZ dosis rendah (35 mg/Kg i.p) selama 12 minggu. Enam belas ekor tikus putih jantan *Sprague-Dawley* dengan rerata berat badan $214,40 \pm 8,25$ g, dibagi dua kelompok yaitu kelompok kontrol dan tikus yang diinduksi STZ dosis rendah. Tikus kontrol hanya diberikan larutan NaCl fisiologis secara intraperitoneal. Kadar GDP diukur setiap 2 minggu selama 12 minggu pasca induksi STZ dan dibandingkan kedua kelompok. Pada akhir minggu ke-12 kadar GDP masih menunjukkan hiperglikemia ($172,77 \pm 14,57$) dan berbeda bermakna dibandingkan kadar GDP hari ke-3 pasca induksi ($p = 0,011$). Data kedua kelompok pada akhir minggu ke-12 pasca induksi juga memperlihatkan perbedaan bermakna ($p = 0,004$) yang menunjukkan belum terjadi perbaikan spontan kadar GDP. Pemberian tunggal STZ dosis rendah (35 mg/Kg i.p) dapat meningkatkan kadar GDP dan belum terjadi perbaikan spontan kadar GDP yang diamati setelah 12 minggu pasca induksi ($p = 0,004$). (JKS 2013; 2: 71-76)

Kata kunci : Streptozotocin, hiperglikemia, gula darah puasa, tikus

Abstract. Streptozotocin can induces diabetes through the damage of the pancreatic islet B cells. In a previous study was conducted that multiple low doses of streptozotocin (STZ) can induce spontaneous restoration of normoglycemia in diabetic rats. This study was designed to investigate the fasting blood glucose (FBG) disturbances after the low dose streptozotocin administration (35 mg/kg i.p) for 12 weeks. Sixteen male Sprague-Dawley rats weighing $214,40 \pm 8,25$ g were divided into two groups, control and single low dose streptozotocin induced diabetic rats (35 mg/Kg i.p). Control rats were given only physiological saline i.p. Fasting blood glucose level was measured every 2 weeks for 12 weeks after induction and compared to other groups. At the end of twelfth week, FBG levels still showed the hyperglycemia (172.77 ± 14.57) and was different significantly than third day post-induction ($p = 0.011$). FBG levels of both groups was also different significantly ($p = 0.004$) which indicated no spontaneous restoration. Study found that single low dose streptozotocin (35 mg/Kg i.p) may increase of fasting blood glucose and no spontaneous restoration of normoglycemia were observed after 12 weeks ($p = 0,004$). (JKS 2013; 2: 71-76)

Key words : Streptozotocin, hyperglycemia, fasting blood glucose, rats

Pendahuluan

Diabetes Mellitus (DM) masih menjadi isu global sampai saat ini karena mengalami peningkatan kasus yang signifikan tiap tahunnya.¹ Diabetes mellitus merupakan salah satu kelainan metabolik kronik yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah menetap akibat adanya gangguan sekresi atau kerja insulin.² Proses

terjadinya hiperglikemia kronik masih terus dikaji sampai saat ini. Beberapa peneliti memilih hewan model yang tepat untuk menilai perubahan kadar glukosa darah yang terjadi setelah kerusakan parsial atau menyeluruh sel beta pankreas. Srinivasan dan Ramarao menyatakan bahwa hewan model diabetes dapat dimanipulasi secara spontan melalui genetik, maupun non spontan melalui pankreatomi parsial, diet tinggi lemak dan atau induksi dengan zat diabetogenik seperti streptozotocin (STZ) dan alloxan.³

Zulkarnain adalah Dosen Bagian Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala Banda Aceh

Manipulasi hewan model secara kimiawi dengan menginduksikan zat diabetogenik lebih mudah dilakukan, namun dalam pemilihan zat tersebut harus diperhatikan rentang dosis dan efek samping yang timbul setelah terjadi kerusakan sel beta pankreas. Lenzen dalam penelitiannya telah menunjukkan bahwa induksi dengan STZ lebih baik daripada induksi alloxan.⁴ Streptozotocin memiliki batas keamanan yang lebih baik daripada alloxan karena rentang dosisnya yang lebar dan lebih jarang terjadi keadaan ketosis dibandingkan alloxan. Szkudelski juga menyatakan induksi STZ lebih baik digunakan dalam membuat hewan model diabetes, karena mampu mempertahankan hiperglikemia dalam waktu yang lama sehingga memudahkan pengamatan terhadap patofisiologi dan komplikasi diabetes.⁵

Induksi streptozotocin dapat memicu terjadi DM tipe 1 maupun DM tipe 2 tergantung dosis dan perlakuan terhadap hewan model.^{5,6} Penyuntikan STZ pada tikus dewasa sebanyak 35-65 mg/Kg secara intraperitoneal mampu menginduksi tikus model DM tipe 2.⁷ Pemberian dosis tinggi dilaporkan banyak menimbulkan kematian pada minggu pertama pasca induksi karena kerusakan yang menyeluruh pada sel beta pankreas menimbulkan peningkatan kadar glukosa darah yang tidak terkendali.⁸ Sedangkan pada dosis kecil, kerusakan parsial sel beta pankreas yang terjadi memungkinkan hewan model bertahan lebih lama, sehingga memudahkan pengamatan terhadap kelainan kronis yang terjadi.^{9,10}

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati perubahan kadar GDP pada tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi STZ dosis rendah 35 mg/Kg dan menilai reversibilitas

spontan kadar GDP setelah 12 minggu perlakuan.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni, dengan rancangan *pre-posttest with control group design*. Penelitian dilakukan pada 16 ekor tikus putih jantan jenis *Sprague Dawley* umur 11-12 minggu yang diinduksi streptozotocin (STZ) sebagai model tikus diabetes. Tikus diperoleh dari Lembaga Pengembangan dan Penelitian Terpadu Universitas Gadjah Mada (LPPT UGM) Yogyakarta. Penentuan jumlah sampel dalam penelitian berdasarkan kriteria WHO, yaitu minimal 5 ekor tikus tiap kelompok yang dipilih secara acak untuk masing-masing kelompok.

Hewan coba dibagi 2 kelompok secara acak, diaklimatisasi selama 1 minggu sebelum perlakuan pada suhu ruangan berkisar 20°-25°C, dipertahankan dalam siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap, diberi pakan standar dan minum *ad libitum*. Setelah adaptasi selesai, semua tikus ditimbang dan diperiksa kadar glukosa darah puasa (GDP) dengan metode GOD-POD (*glucose oxidase-peroxidase*) menggunakan spektrofotometri.

Pengambilan darah melalui sinus orbitalis tikus, lalu dihisap dengan menggunakan mikrohematokrit sebanyak 1 ml, disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Serum yang diperoleh diambil sebanyak 10 µl, kemudian ditambahkan 1 ml reagen GOD-POD. Larutan sampel tersebut di vortex selama 5 detik dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Absorbansi sampel diukur dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 500 nm.

Kadar glukosa dalam darah diukur dengan rumus :

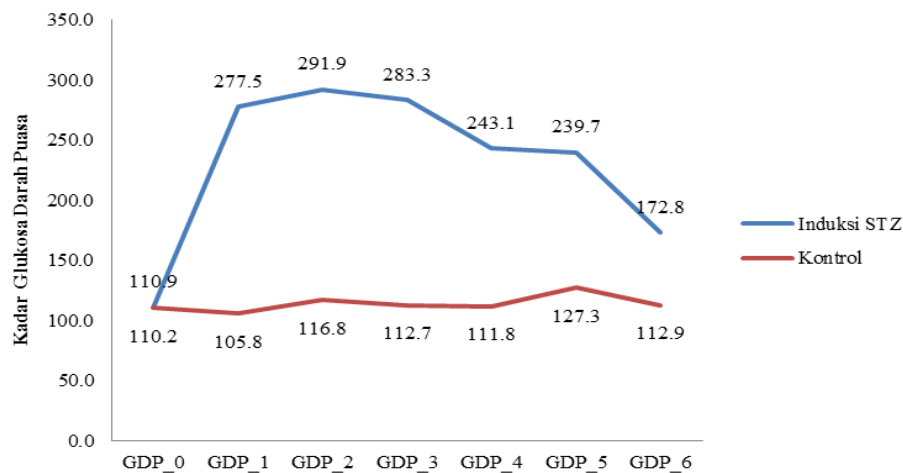
$$\text{Kadar glukosa plasma} = \frac{\text{absorban sampel}}{\text{absorban standar}} \times \text{konsentrasi standar} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)$$

Selanjutnya diambil secara acak tikus yang akan dijadikan sebagai tikus model diabetes dengan cara induksi STZ dosis tunggal 35 mg/Kg dalam 0,1 M buffer sitrat pH 4,5 secara intraperitoneal.¹⁰ Tiga hari setelah induksi STZ (hari ke-10), dilakukan pemeriksaan kadar GDP. Hewan model dinyatakan sebagai tikus diabetes jika memiliki kadar gula darah puasa $\geq 7,8$ mmol/L (≥ 140 mg/dl).¹¹ Hewan model yang telah dianggap DM dibiarkan dalam kondisi hiperglikemia kronik selama 12 minggu tanpa pemberian terapi. Pengamatan terhadap GDP dilakukan secara serial setiap 2 minggu setelah terdiagnosis diabetes. Sedangkan pada kelompok kontrol hanya diberikan larutan NaCl 0,9% secara intraperitoneal. Pengolahan data hasil penelitian ini menggunakan program SPSS versi 19. Data-data hasil pengukuran kadar GDP untuk setiap kelompok dinyatakan dalam rerata $\pm$ SEM (*standard error of mean*). Selanjutnya rerata $\pm$ SEM kadar GDP kedua kelompok dibandingkan dengan

menggunakan *independent sample t test*, sedangkan perbandingan data rerata GDP pada setiap kelompok dianalisis dengan *Paired sample t test*. Perbedaan bermakna secara statistik diperoleh jika nilai $P < 0,05$ dan tingkat kepercayaan 95%.

Hasil Penelitian

Berdasarkan pengukuran awal, rerata berat badan tikus yang digunakan dalam penelitian adalah $214,40 \pm 8,25$ gram dan kadar GDP sebelum perlakuan cenderung sama secara statistik ($p = 0,936$) (tabel 1). Dari 8 ekor tikus yang diinduksi STZ dosis 35 mg/Kg, dua ekor mengalami kematian (25%) pada minggu kedua dan ketiga, diduga akibat peningkatan kadar glukosa yang terlalu tinggi sebelumnya pasca induksi (445,3 mg/dl dan 473,1 mg/dl). Hasil pengukuran rerata kadar glukosa darah puasa pada kelompok yang tikus yang diinduksi STZ memperlihatkan keadaan hiperglikemia tetap bertahan sampai minggu ke-12 pasca induksi STZ (Gambar 1).



Gambar 1 Perubahan rerata kadar GDP kedua kelompok sampai minggu ke-12 Sebelum perlakuan, kadar GDP kedua kelompok cenderung tidak berbeda bermakna (uji t tidak berpasangan).

Tabel 1 Perbedaan rerata GDP kedua kelompok pada hari ke-0

	Kelompok	n	Mean $\pm$ SEM	p
GDP hari ke-0	Kontrol	6	110,15 $\pm$ 6,04	0,936
	Induksi STZ	6	110,85 $\pm$ 5,91	

Independent sample t test : Kontrol vs Induksi STZ $p = 0,936$

Berdasarkan perbandingan rerata kadar GDP kelompok yang diinduksi STZ terdapat perbedaan yang bermakna antara

kadar GDP pada hari ke-0 dan minggu ke-12 (uji t berpasangan).

Tabel 2 Perbedaan rerata GDP kelompok tikus yang diinduksi STZ pada hari ke-0 dan minggu ke-12

Induksi STZ	GDP minggu ke-12 & GDP Hari ke-0	n	CI 95%		Mean $\pm$ SEM	p
			Terendah	Tertinggi		
		6	18,82	105,02	61,92 $\pm$ 16,77	0,014

Paired sample t test : Kelompok Induksi STZ, GDP₁₂ vs GDP₀ $p = 0,014$

Begitu juga halnya perbandingan rerata kadar GDP pada hari ke-3 pasca induksi STZ dan minggu ke-12, walaupun keduanya menunjukkan keadaan

hiperglikemia yang menetap, akan tetapi perbandingan kadar GDP ini berbeda secara statistik (uji t berpasangan).

Tabel 3 Perbedaan rerata GDP kelompok tikus yang diinduksi STZ pada hari ke-3 pasca induksi dan minggu ke-12

Induksi STZ	GDP 3 hari pasca induksi & GDP minggu ke-12	n	CI 95%		Mean $\pm$ SEM	p
			Terendah	Tertinggi		
		6	60,68	287,68	174,18 $\pm$ 44,15	0,011

Paired sample t test : Kelompok Induksi STZ, GDP 3hr pasca induksi vs GDP₁₂ $p = 0,011$

Pada akhir minggu ke-12 terlihat kadar GDP kedua kelompok menunjukkan

perbedaan yang bermakna (uji t tidak berpasangan).

Tabel 4 Perbedaan rerata GDP kedua kelompok pada minggu ke-12

	Kelompok	n	Mean $\pm$ SEM	p
GDP minggu ke-12	Kontrol	6	112,88 $\pm$ 6,61	0,004
	Induksi STZ	6	172,77 $\pm$ 14,57	

Independent sample t test : Kontrol vs Induksi STZ $p = 0,004$

Pembahasan

Pengamatan keadaan hiperglikemia lebih banyak dilakukan pada hewan model terutama tikus dan mencit.³ Penggunaan zat diabetogenik seperti STZ untuk menginduksi keadaan yang mirip seperti diabetes mellitus telah banyak dilakukan sebelumnya.^{5,9} Kerusakan yang ditimbulkan akibat induksi STZ tergantung dosis dan jenis perlakuan terhadap hewan model.³ Diabetes yang diinduksi STZ terjadi akibat adanya kerusakan dan kematian sel beta pankreas. Sitotoksitas STZ menyebabkan pelepasan radikal bebas

yang memicu stres oksidatif intraseluler. Streptozotocin secara selektif cenderung masuk dan terakumulasi dalam sel beta pankreas, yang diperantarai oleh ikatan transporter glukosa 2 (GLUT2) di membran plasma.^{4,5} Organ-organ lain yang mengekspresikan GLUT2 seperti hati dan ginjal, juga akan mengalami kerusakan akibat induksi STZ.¹² Kerusakan sel beta pankreas terjadi dalam waktu 2-4 hari setelah pemberian STZ, yang ditandai dengan pembengkakan pankreas dan degenerasi sel beta pulau Langerhans.^{7,13}

Pada beberapa penelitian dilaporkan pemberian dosis tinggi 65 mg/Kg tikus banyak menimbulkan kematian pada minggu pertama pasca induksi sehingga hanya dapat dilakukan pengamatan terhadap kerusakan yang terjadi pada fase akut. Penelitian yang dilakukan Wiyadi memperlihatkan sekitar 60% terjadi kematian minggu pertama pada tikus yang induksi STZ 65 mg/Kg.⁸ Sedangkan pada penelitian ini tidak dilaporkan kematian pada minggu pertama dan hanya 25% terjadi kematian pada minggu kedua dan ketiga pasca induksi.

Pada penelitian ini didapatkan induksi STZ dengan dosis 35 mg/Kg intraperitoneal mampu mempertahankan keadaan hiperglikemia secara menetap sampai akhir pengamatan minggu ke-12 pasca induksi (gambar 1), sehingga perlakuan ini dapat dijadikan sebagai model untuk mengamati berbagai kejadian selama hiperglikemia kronik. Hasil ini sejalan dengan penelitian Suryanarayana *et al.* yang melakukan pengamatan selama 8 minggu terhadap tikus yang diinduksi STZ dosis rendah (35 mg/Kg).¹⁰

Pada penelitian Li *et al.* memperlihatkan reversibilitas secara spontan pada minggu ke-36 pasca pemberian streptozotocin dosis rendah secara bertahap. Hasil penelitiannya menunjukkan kadar glukosa darah dan insulin kembali normal dan tidak ada proses infiltrasi limfosit pada pulau Langerhans pankreas pada akhir pengamatan.⁹ Hal ini juga terlihat dalam pengamatan hasil, yang menunjukkan terjadi penurunan rerata kadar GDP secara bertahap pada tiap minggu, walaupun belum mencapai perbaikan GDP normal dan secara histopatologis diperlukan pemeriksaan jaringan pankreas untuk menilai kerusakan yang terjadi pada pulau Langerhans pankreas. Pada akhir minggu ke-12 rerata kadar GDP masih menunjukkan keadaan hiperglikemia ($172,77 \pm 14,57$) dan secara statistik berbeda bermakna dibandingkan rerata kadar GDP hari ke-3 pasca induksi ($p=0,011$) (tabel 3). Data kedua kelompok

pada akhir minggu ke-12 pasca induksi juga memperlihatkan perbedaan bermakna ($p=0,004$) yang menunjukkan belum terjadi perbaikan spontan rerata kadar GDP (tabel 4).

Peneliti berasumsi jika dipertahankan beberapa minggu lagi kemungkinan akan mengalami perbaikan kadar glukosa darah akibat reversibilitas spontan sel beta pankreas. Pada penelitian Hartmann *et al.* menunjukkan 70% mencit yang diinduksi STZ dosis rendah akan mengalami perbaikan kadar glukosa dan sekresi insulin setelah 15 minggu.¹⁴ Oleh karena diperlukan pengamatan lebih lanjut mengenai mekanisme dan faktor yang terlibat dalam proses pemulihan sel beta pankreas tersebut.

Kesimpulan

1. Kadar glukosa darah puasa pada tikus yang diinduksi STZ dosis rendah 35 mg/Kg tetap menunjukkan keadaan hiperglikemia dan belum menunjukkan reversibilitas spontan pada minggu ke-12 pasca induksi.
2. Terdapat perbedaan kadar glukosa darah puasa kedua kelompok pada minggu ke-12 pasca induksi ($p=0,004$).
3. Tikus model induksi STZ dosis rendah 35 mg/Kg dapat dipertimbangkan sebagai model pengamatan hiperglikemia fase kronis selama 12 minggu.

Saran

1. Diperlukan pengamatan terhadap gambaran histopatologi sel beta pankreas secara serial untuk melihat proses reversibilitasnya.
2. Perlu penelitian lanjutan untuk mengamati perubahan kadar glukosa darah puasa pada rentang dosis STZ yang berbeda.

Daftar Pustaka

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of Diabetes : estimates for the year 2000 and projections

- for 2030. *Diabetes Care*. 2004. 27 (5) : 1047-53.
2. Leahy JL. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus, Dalam : Feinglos MN, Bethel MA (eds) *Type 2 Diabetes Mellitus : An evidence based approach to practical management*. USA: Humana press. 2008 : 17-32.
3. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research : an overview. *Indian J Med Res*. 2007. 125 : 451-72.
4. Lenzen S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin induced diabetes. *Diabetologia*. 2008. 51 : 216-26.
5. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001. 50 : 537-46.
6. Mordes JP, Bortell R, Blankenhorn EP, Rossini AA, Greiner DL. Rat model type 1 diabetes : genetics, environment and autoimmunity. *ILAR J*. 2004. 45(3): 278-91.
7. Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR, Jamshidi Sh, Farhangi A, Allah Verdi A. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem*. 2007. 22 (2) : 60-64.
8. Wiyadi. Kadar testosteron serum dan caspase-3 aktif sel Leydig pada tikus jantan *Sprague Dawley* diabetes mellitus akibat pemberian suspensi bubuk kacang kedelai kuning (*Glycin max*). *Berkala Ilmu Kedokteran FK UGM*. 2011. 142 (2) : 65-72.
9. Li RJ, Qiu SD, Tian H, Zhou SW. Diabetes induced by multiple low doses of STZ can be spontaneously recovered in adult mice. *Dongwuxue Yanjiu*. 2013. 34 (3) : 238-43.
10. Suryanarayana P, Saraswat M, Mrudula T, Krishna TP, Krishnaswamy K, Reddy GB. Curcumin and Turmeric delay streptozotocin-induced diabetic cataract in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005. 46 : 2092-99.
11. Zhang M, Lv XY, Li J, Xu ZG, Chen L. The Characterization of High-Fat Diet and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes Rat Model. *Exp. Diabetes Res*. 2008. 23 : 1-9.
12. Ragbetli C, Ceylan E. Effect of streptozotocin on biochemical parameter in rats. *Asian J Chem*. 2010. 22(3): 2375-78.
13. Py G, Eydoux N, Perez-Martin A, Raynaud E, Brun JF, Prefaut C, Mercier J. Streptozotocin-induced diabetes decreases rat sarcolemmal lactate transport. *Metabolism*. 2001. 50(4): 418-24.
14. Hartmann K, Besch W, Zuhlke H. Spontaneous recovery of streptozotocin diabetes in mice. *Exp Clin Endocrinol*. 1989. 93(2-3): 225-30.