

MENCIT (*Mus musculus*) GALUR BALB-C YANG DIINDUKSIKAN STREPTOZOTOSIN BERULANG SEBAGAI HEWAN MODEL DIABETES MELITUS

*Multiple Dose Streptozotocin-Induced Diabetes in Balb-C Mice (*Mus musculus*): An Effort to Provide Animal Model for Diabetes Mellitus*

Erwin¹, Etriwati², dan Rusli¹

¹ Laboratorium Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

² Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

E-mail: etriwati2102@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui persentase peningkatan sel beta Langerhans pankreas yang mengalami nekrosis setelah diinduksi streptozotosin berulang. Tiga puluh ekor mencit jantan galur *Balb-c*, umur 12-14 minggu dengan bobot badan 30-40 g dikelompokkan menjadi 2 kelompok perlakuan. Kelompok I (KI) diberikan pelarut streptozotosin dan Kelompok II (KII) diberikan streptozotosin dengan dosis 40 mg/kg bb dalam 50 mM natrium sitrat buffer pH 4,5. Semua perlakuan diberikan secara intraperitoneum selama 5 hari berturut-turut. Pemeriksaan kadar glukosa darah dan berat badan dilakukan pada hari ke-0, 7, 14, 21, dan 28 sesudah pemberian perlakuan. Hewan percobaan dari masing-masing kelompok dieutanasi sebanyak 2 ekor pada hari ke-7, 14, 21, dan 28 setelah pemberian perlakuan untuk pewarnaan Gomori. Data pengamatan berat badan adalah 42,86±2,3 vs 32,78±7,4 g dan kadar glukosa darah puasa 95,89±2,5 vs 255,77±87,60 mg/dl menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P<0,05$) antara kedua kelompok perlakuan, sedangkan persentase sel beta yang mengalami nekrosis antara kedua kelompok perlakuan 4,57±0,47 vs 64,11±4,10% juga menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P<0,05$). Induksi dosis rendah streptozotosin secara berulang dapat menyebabkan peningkatan persentase nekrosis sel beta Langerhans pankreas.

Kata kunci: mencit galur *Balb-C*, streptozotosin, diabetes melitus, Gomori, hewan model

ABSTRACT

This research was aimed to study the increase in percentage of pancreatic beta cells necrosis of *Balb/c* mice after induced with multiple doses of streptozotocin (STZ). Thirty male *Balb-c* mice, age 12-14 weeks with 30-40 g body weight were divided into 2 treatment groups. Group I (KI) received STZ solvent and group II (KII) received STZ 40 mg/kg in 50mM sodium citrate buffer (pH 4.5). Streptozotocin solvent and STZ were given intraperitoneally for 5 consecutive days. Examination of blood glucose levels and body weight were performed on days 0, 7, 14, 21, and 28 after treatment. Two experimental animals from each group were euthanized on days 7, 14, 21, and 28 after treatments then examined using Gomori staining. The result showed that fasting blood glucose levels of mice in K1 (95.89±2.5mg/dl) and K2 (255.77±87.60mg/dl) were significantly different ($P<0.05$). The significant difference was also observed in body weight data (42.86±2.3g and 32.78±7.4g for K1 and K2, respectively). The necrosis percentage of beta cells in K1 was 4.57±0.47% and differs significantly ($P<0.05$) with those found in K2 (64.11±4.10%). It can be concluded that low dose of streptozotocin induction repeatedly increase the percentage of pancreatic beta cell necrosis.

Key words: *Balb-c* strain mice, streptozotocin, diabetes mellitus, Gomori, animal model

PENDAHULUAN

Masa transisi demografi akibat keberhasilan upaya menurunkan angka kematian dapat menimbulkan transisi epidemiologis berupa pergeseran pola penyakit dari infeksi akut ke penyakit degeneratif. Salah satu diantaranya yang berkaitan erat dengan penyakit metabolisme dan cenderung akan mengalami peningkatan sebagai dampak adanya pergeseran perilaku pola konsumsi gizi dan makanan adalah diabetes melitus (DM). Diabetes melitus merupakan sekumpulan gangguan pada tubuh yang timbul akibat gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein dengan banyak sebab lainnya. Diabetes melitus ditandai dengan peningkatan kadar glukosa yang melebihi nilai normal (hiperglikemia) akibat peningkatan glukoneogenesis dan glikogenolisis. Menurut data *World Health Organization* (WHO), prevalensi diabetes di seluruh dunia diproyeksikan meningkat dari 2,8% pada tahun 2000 menjadi 4,4% pada tahun 2030 dan jumlah tersebut diperkirakan terus meningkat (Wild *et al.*, 2004). Di Indonesia, prevalensi DM

semakin meningkat, diperkirakan pada tahun 2010 minimal 239 juta penduduk dunia akan menderita DM (McAnuff *et al.*, 2003).

Percobaan penelitian mengenai DM dengan menggunakan hewan model didasarkan pada patogenesis penyakit tersebut pada manusia yang bersifat kronis atau berlangsung menahun. Pada saat ini telah banyak penelitian menggunakan hewan model yang secara patologis dibuat menderita DM. Kondisi patologis pada hewan model bertujuan untuk melakukan pencegahan, menetapkan diagnosa, mengetahui pathogenesis, dan terapi yang digunakan dalam penanganan penyakit DM. Meskipun demikian, kondisi patologis hewan model tersebut tidak sepenuhnya menggambarkan kondisi patologis secara nyata pada manusia. Penyembuhan yang terjadi pada hewan model umumnya bukan akibat berbagai terapi yang diberikan, tetapi akibat usaha tubuh hewan untuk meregenerasi sel beta pankreas.

Pada hewan percobaan, DM sering disebabkan akibat pemberian streptozotosin, aloksan, asam urat, asam dehidroaskorbat, asam dialurat, dan asam

ksanturenat yang dapat mengakibatkan kerusakan pada sel beta Langerhans pankreas. Oleh karena itu, senyawa-senyawa tersebut dapat digunakan untuk membuat perlakuan DM pada hewan percobaan (Rowland dan Bellush, 1989; Wilson dan LeDoux, 1989). Streptozotosin bekerja dengan cara membentuk radikal bebas sangat reaktif yang dapat menimbulkan kerusakan pada membran sel, protein, dan *deoxyribonucleic acid* (DNA). Sampai saat ini belum ada senyawa kimia yang mampu menghasilkan DM permanen sehingga akan berpengaruh terhadap terapi yang diberikan. Oleh sebab itu sangat perlu dilakukan penelitian untuk menghasilkan kondisi patologis pada hewan model untuk percobaan DM, yang diinduksikan streptozotosin berulang. Penelitian ini bertujuan mengetahui persentase peningkatan sel beta Langerhans pankreas yang mengalami nekrosis dengan pewarnaan Gomoris setelah diinduksi streptozotosin secara berulang, sehingga dapat digunakan sebagai hewan model untuk percobaan DM.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan 30 ekor mencit jantan strain *Balb-C* dengan bobot badan 30-40 g dan umur 12-14 minggu. Mencit dikelompokkan menjadi 2 kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri atas 15 ekor. Kelompok I (KI=kontrol) diberikan pelarut streptozotosin sedangkan kelompok II (KII=DM) diberikan streptozotosin dengan dosis 40 mg/kg bb dalam 50 mM natrium sitrat buffer pH 4,5 secara intra peritoneum selama 5 hari berturut-turut. Pemeriksaan kadar glukosa darah dan berat badan dilakukan pada hari ke-0, 7, 14, 21, dan 28 sesudah pemberian perlakuan. Hewan percobaan dari masing-masing kelompok dieutanasia sebanyak 2 ekor pada hari ke-7, 14, 21, dan 28 setelah perlakuan, selanjutnya mencit diperfusi dan nekropsi untuk pengambilan jaringan pankreas untuk pewarnaan Gomori.

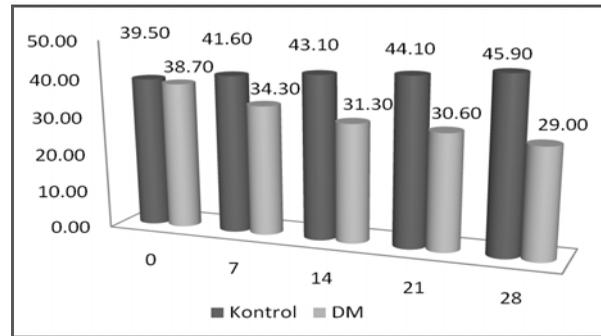
Pembuatan sediaan histopatologi meliputi *dehidrasi* dengan alkohol bertingkat, *clearing* dengan xylol, *infiltrasi* dan *embedding* dengan parafin cair dan *sectioning* dengan mikrotom. *Object glass* yang sudah ditempel jaringan dimasukkan dalam *oven* pada suhu 60° C selama 2 jam dan dilakukan pewarnaan Gomori. Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung persentase nekrosis sel beta Langerhans pankreas. Data persentase nekrosis sel beta Langerhans pankreas, berat badan, dan kadar glukosa darah puasa yang diperoleh dianalisis dengan *analysis of varians* (ANOVA) pola searah dengan menggunakan program SPSS 18.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perubahan Berat Badan

Berat badan normal pada mencit jantan dengan umur 12-14 minggu berkisar 30-50 g. Kelompok I (normal) secara fisik terlihat sehat ditandai dengan bulu putih seperti beludru dan ekor bewarna merah muda. Setelah 28 hari rata-rata berat badan meningkat

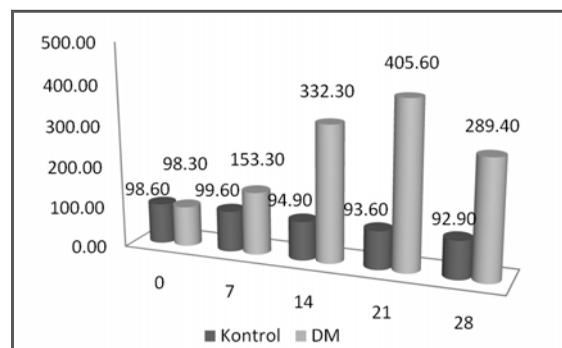
sebanyak 6,40 g. Mencit kelompok II (DM) terlihat secara fisik bulu berwarna kusam, kusut, dan kurang aktif bergerak. Pada kelompok ini terjadi penurunan berat badan rata-rata 9,70 g setelah 28 hari seperti yang disajikan pada Gambar 1. Disamping itu, pada kelompok ini juga ditemukan gejala spesifik DM yaitu poliuria, polidipsia, dan polifagia. Berdasarkan uji statistik menggunakan ANAVA terjadi perbedaan berat badan yang signifikan ($P<0,05$) antara kelompok I dan II yakni masing-masing $42,86\pm 2,3$ dan $32,78\pm 7,4g$.



Gambar 1. Rata-rata perubahan berat badan (g) mencit sebelum dan setelah diinduksi streptozotosin berulang antara kedua kelompok perlakuan (DM=diabetes melitus)

Perubahan Kadar Glukosa Darah Puasa

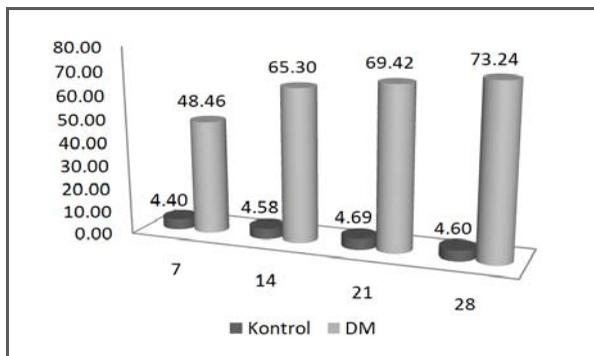
Kadar glukosa darah puasa (KGDP) pada mencit pada kelompok I menunjukkan angka dalam batas yang normal mulai hari ke-0 sampai akhir periode pengamatan yaitu hari ke-28 seperti yang disajikan pada Gambar 2. Rata-rata KGDP antara kedua kelompok perlakuan adalah $(95,89\pm 2,5)$ mg/dl dan $(255,77\pm 87,60)$ mg/dl menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P<0,05$). Pada kelompok II $(153,30\pm 24,50)$ mg/dl peningkatan KGDP mulai terjadi pada hari ke-7 yang berbeda signifikan dengan kelompok I $(99,60\pm 1,7)$ mg/dl ($P<0,05$). Kadar glukosa darah puasa terus mengalami peningkatan sampai akhir perlakuan. Pada hari ke-14, 21, dan 28 kadar gula darah puasa mengalami peningkatan pada kelompok II $(332,30\pm 32,40; 405,60\pm 58,30; 289,40\pm 13,1)$ mg/dl yang berbeda signifikan ($P<0,05$) dengan kelompok I $(94,90\pm 2,3; 93,60\pm 1,3; 92,90\pm 1,7)$ mg/dl.



Gambar 2. Rata-rata perubahan kadar glukosa darah puasa (mg/dl) pada mencit sebelum dan setelah diinduksi streptozotosin berulang antara kedua kelompok perlakuan (DM=diabetes melitus)

Persentase Nekrosis Sel Beta Langerhans Pankreas

Berdasarkan pewarnaan Gomori, sel beta terlihat berwarna biru dan sel alfa terlihat berwarna merah. Peningkatan persentase jumlah sel beta yang mengalami nekrosis menunjukkan kerusakan pada sel beta yang berakibat menurunnya sekresi insulin sehingga menimbulkan DM. Penurunan jumlah sel beta Langerhans yang normal pada kelompok II mulai terjadi pada hari ke-7 dan terus menurun sampai hari ke-14, 21, dan 28. Pada kelompok I jumlah sel beta yang normal hari ke-7, 14, 21, dan 28 tidak terjadi penurunan. Jumlah sel beta antara kedua kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$). Hasil pengamatan persentase sel beta yang mengalami nekrosis untuk masing-masing kelompok disajikan pada Gambar 3.



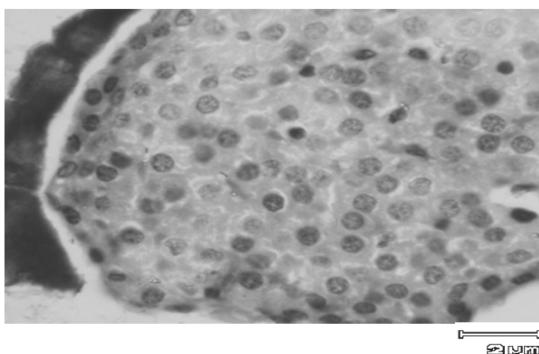
Gambar 3. Rata-rata persentase sel beta (%) yang mengalami nekrosis pada masing-masing kelompok dengan pewarnaan Gomori (DM=diabetes melitus)

Izumi *et al.* (2003) menyatakan dalam upaya pengembangan hewan model untuk perlakuan DM yang diinduksi dengan STZ dapat mempelajari berbagai komplikasi dari DM. Induksi STZ dengan dosis rendah (40 mg/kg berat badan) selama 5 hari berturut-turut dapat meningkatkan KGDP. Penurunan berat badan (Gambar 1) pada kelompok II yang berbeda signifikan dengan kelompok I ($P < 0,05$) disebabkan oleh penurunan pemasukan glukosa ke dalam jaringan adiposa (Gambar 4). Pada saat glukosa

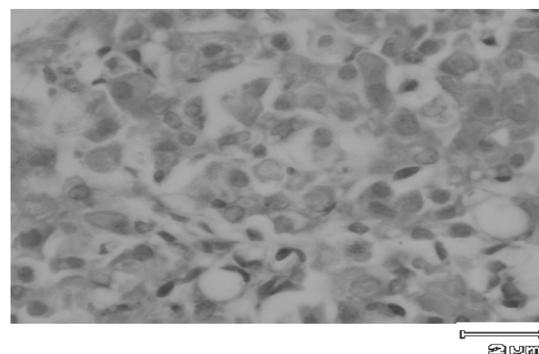
di jaringan menurun, tubuh akan berusaha untuk menutupinya dengan proses pembentukan glukosa dari senyawa-senyawa organik lainnya (glukoneogenesis). Disamping itu, penurunan berat badan juga disebabkan oleh ketidakmampuan tubuh untuk memanfaatkan energi secara optimal untuk membentuk energi, meskipun pada kondisi ini kadar glukosa dalam darah sangat tinggi, sehingga energi diperoleh melalui peningkatan katabolisme protein.

Peningkatan KGDP (Gambar 2) pada kelompok II mulai terjadi pada hari ke-7 yaitu (153,30±24,50) mg/dl dan kelompok I yaitu (99,60±1,70) mg/dl. Pada hari ke-14 KGDP terus meningkat pada kelompok II menjadi (332,30±32,40) mg/dl dan kelompok I yaitu (94,90±2,3) mg/dl. Pada hari ke-28 KGDP pada kelompok II terlihat mulai turun yaitu (289,40±13,10) mg/dl yang berbeda signifikan ($P < 0,05$) dengan kelompok I (92,90±1,7) mg/dl. Kadar glukosa darah puasa antara kedua kelompok menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$). Peningkatan KGDP pada kelompok II, disebabkan karena kerusakan sel beta Langerhans oleh induksi STZ dengan dosis rendah secara berulang untuk perlakuan DM. Induksi STZ dengan dosis rendah secara berulang dapat menghasilkan hewan model DM yang kronis. Bolzan dan Bianchi, (2002) menyatakan bahwa STZ merupakan zat yang dapat mengakibatkan alkilasi yang secara langsung memetilasi DNA, menyebabkan DNA *strand breaks*, sintesis DNA yang tidak terjadwal, penambahan DNA, aberasi kromosomal, *micronuclei*, *sister chromatid exchanges*, dan kematian sel beta. Pada dosis rendah STZ dapat menginduksi apoptosis dan pada dosis tinggi menyebabkan nekrosis sel beta. Streptozotisin adalah suatu senyawa *glukosamine-nitrosouren* seperti agen *alkilating* lainnya yang menimbulkan toksik dengan menyebabkan kerusakan pada DNA sel.

Penurunan persentase sel beta Langerhans pankreas yang normal pada kelompok II mulai terjadi pada hari ke-7 dan terus menurun sampai hari ke-28. Pada kelompok I persentase sel beta Langerhans pankreas yang normal tidak mengalami perubahan. Penurunan



I



II

Gambar 4. Foto mikrografi sel beta Langerhans pankreas mencit dengan pewarnaan Gomori. (I) Kontrol dan (II) diabetes melitus (DM). (I merupakan kelompok kontrol yang hanya diberi pelarut streptozotisin (STZ), jumlah sel beta terlihat lebih banyak dibandingkan kelompok II. Kelompok II merupakan kelompok DM yang diinduksi dengan STZ, jumlah sel beta Langerhans pankreas terlihat berkurang dan terjadi hiperkromatin inti, inti membesar dan batas sel menjadi tidak jelas).

persentase sel beta Langerhans pankreas pada kelompok II terjadi akibat induksi STZ. Induksi STZ dengan dosis rendah secara berulang dapat menghasilkan hewan model yang mengalami kerusakan sel beta Langerhans pankreas secara perlahan-lahan, sehingga akan menimbulkan DM yang kronis. Salah satu mekanisme STZ sebagai penyebab terjadinya DM berkaitan dengan pembentukan radikal bebas diantaranya NO, O₂, dan H₂O₂ yang dapat menyebabkan fragmentasi DNA sel akibat sitotoksik STZ. Radikal bebas memiliki waktu paruh yang sangat pendek hanya dalam satuan mikrodetik (Utomo *et al.*, 1991). Radikal bebas sangat reaktif dan dapat menimbulkan kerusakan diberbagai bagian sel antara lain kerusakan membran sel, protein, dan DNA. Dampak kerusakan berupa proses penuaan yang menyebabkan terjadinya peroksida lipid. Streptozotocin merupakan zat yang dapat mengakibatkan alkilasi yang secara langsung memetilasi DNA, menyebabkan DNA *strand breaks*, sintesis DNA yang tidak terjadwal, penambahan DNA, aberasi kromosomal, *micronuclei*, *sister chromatid exchanges*, dan kematian sel beta Langerhans pankreas (Muhilal, 1991). Kerusakan sel beta Langerhans pankreas menyebabkan gangguan sintesis insulin. Insulin memegang peranan penting dalam pengaturan glukosa darah, kekurangan insulin menyebabkan terjadinya hiperglikemia (Guyton dan Hall, 2006).

Dalam sel, STZ serupa dengan glukosa yang diangkut oleh protein pengangkut glukosa yaitu *glucose transporter* (GLT2), akan tetapi tidak dikenali oleh protein pengangkut glukosa lainnya (Wang and Gleichmann, 1998; Schnedl *et al.*, 1994). Szkudelski (2001) menambahkan STZ memasuki sel beta pankreas melalui *glucose transporter* (GLUT 2) dan menyebabkan *alkylation*. Hal ini didahului oleh pembatasan pembentukan *adenosin trifosfat* (ATP) pada mitokondria akibat pembentukan radikal bebas, peningkatan *xanthine oxidase*, dan penghambatan siklus Krebs. Peningkatan jumlah sel beta Langerhans dapat terjadi akibat kemampuan tubuh untuk meregenerasi sel beta yang rusak. Regenerasi sel beta

yang rusak diawali dengan perbaikan sel-sel beta dan pembelahan sel beta yang baru (mitosis). Penurunan proporsi nekrosis sel beta terjadi secara bertahap.

KESIMPULAN

Induksi dosis rendah STZ secara berulang dapat menyebabkan peningkatan persentase nekrosis sel beta Langerhans pankreas. Peningkatan persentase nekrosis sel beta Langerhans pankreas menimbulkan DM yang bersifat kronis.

DAFTAR PUSTAKA

- Bolzan, A.D. and M.S. Bianchi. 2002. Genotoxicity of streptozotocin. Review. **Mutation Research**. 512:121-134.
- Guyton A.C. and J.E. Hall. 2006. **Text Book of Medical Physiology**. 11rded. W.B. Saunders Company, London.
- Izumi, K., K.A. Yamada, M. Matsukawa, and C.F. Zorumski. 2003. Effect of insuline on long-term potentiation in hippocampal slices from diabetic rats. **Journal Diabetologia** 46:1007-1012.
- McAnuff, M.A., F.O. Omoruyi, E.Y. Marrison, and H.N. Asemota. 2003. Hepatic function enzymes and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats fed bitter yam (*Dioscorea polygonoides*) steroidal saponin extract. **Diabetologia Croatia**. 32:1-7.
- Muhilal. 1991. Teori radikal bebas dalam gizi dan kedokteran. **Cermin Dunia Kedokteran**. 73:9-11.
- Rowland, N.E. and L.L. Bellush. 1989. Diabetes melitus: Stress, neurochemistry, and behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 13(4):99-206.
- Schnedl, W.J., S. Ferber, J.H. Johnson, and C.B. Newgard. 1994. Streptozotocin transport and cytotoxicity: Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. **Diabetes**. 43(11):1326-1333.
- Szkudelski, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. **Diabetes** 50(6):537-546.
- Utomo, H.A.Hanafiah, L.H.Oen, F.D. Suyatna, and N.Asikin. 1991. Radikal bebas, peroxide lipid dan penyakit jantung koroner. **Medika** 5:373-379.
- Wang, Z. and H. Gleichmann. 1998. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. **Diabetes**. 47(1):50-56.
- Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree, and H. King. 2004. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **DiabetesCare** 27:1047-1453.
- Wilson, G.L. and S.P. LeDoux. 1989. The role of chemical in the etiology of diabetes mellitus. **Journal Toxicologic Pathology**. 17:357-362.