

PENGEMBANGAN METODE UJI ANTIHIPERGLIKEMIA DENGAN ZEBRAFISH

Farida Hayati^{1*}, Cyntia A Putri¹, Rizki Awaluddin¹,
Ardilla Maizulfiani¹, Diah Dwi Dharma¹

¹Universitas Islam Indonesia

*farida.hayati@uui.ac.id

ABSTRAK

Penelitian menggunakan *zebrafish* banyak dilakukan beberapa waktu terakhir ini. Salah satunya adalah pemanfaatannya sebagai model untuk mengukur aktivitas antihyperglikemia. Penelitian ini mengembangkan metode uji antihyperglikemia dengan induksi menggunakan aloksan dan pembebanan glukosa. Variasi pembebanan glukosa dilakukan melalui perbedaan konsentrasi glukosa 1% dan 2% dengan pemberian aloksan sebelumnya 400mg/100ml air. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan setiap hari sampai hari ke 5. Hasil optimasi menunjukkan metode terbaik induksi hyperglikemia adalah dengan perendaman 10 ikan dalam 0,4% aloksan selama 1 jam, kemudian dipindahkan dalam larutan glukosa 2% dalam 2 liter air selama 24 jam. Induksi tersebut diulang selama 5 hari, kemudian ikan dipuasakan sebelum pengambilan darah melalui eksisi kepala. Pengukuran kadar glukosa darah menunjukkan adanya peningkatan kadar glukosa darah yang signifikan setelah pembebanan aloksan dan glukosa dari kadar 68,87 mg/dL menjadi 210 mg/dL setelah induksi.

Kata kunci : zebrafish, hyperglikemia, aloksan, kadar glukosa darah

ABSTRACT

Research using zebrafish become an important model for pharmacology activities. One of them is its use as a model to measure antihyperglycemia activity. This study developed an optimal model for antihyperglycemia test involving the following factors : the concentration of glucose 1% and 2% by previous alloxan 400 mg/100ml water. Blood glucose level were measured daily until day 5. The result showed that the optimal hyperglycemia zebrafish model was induced in 0.4% alloxan for 1 h (n=10), then in 2% water glucose solution 2 liters for 24 h. It repeated for 5 days, and blood glucose level were measured in day 6. It's a significant increase in blood glucose level from 68.87 mg/dL to 210 mg/dL.

Keywords : zebrafish, hyperglycemia, alloxan, blood glucose level

PENDAHULUAN

Pada tahun 2030 diperkirakan prevalensi Diabetes Melitus (DM) di Indonesia mencapai 21,3 juta orang. Sedangkan hasil Riset kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013, menunjukkan bahwa proporsi penderita DM usia >15 tahun di Indonesia naik hampir dua kali lipat dibanding tahun 2007. Hasil Riskesdas 2013 juga menunjukkan bahwa 6,9% penderita DM di Indonesia, 26,3 %nya merupakan penderita DM yang sudah terdiagnosis pada Riskesdas sebelumnya, dan 73,7 % merupakan penderita DM yang baru (Kementerian Kesehatan RI, 2013). Hasil penelitian di Indonesia pada tahun 2010 menunjukkan bahwa 5,7% dari populasi penduduk dewasa di Indonesia menderita Diabetes Mellitus (Pramono *et al.*, 2010). Selama dekade terakhir, prevalensi diabetes telah meningkat lebih cepat pada negara berkembang dibandingkan dengan negara-negara berpenghasilan tinggi. Mayoritas diabetes terjadi hampir

seluruhnya dikalangan orang dewasa, tetapi sekarang terjadi juga pada anak-anak (WHO, 2016).

Pengembangan obat-obat antidiabetes dengan berbagai metode terus dilakukan, baik obat konvensional maupun obat herbal. Pengujian efek antidiabetes menjadi penting untuk pengembangan obat baru antidiabetes. Metode yang sedang dikembangkan saat ini yaitu menggunakan ikan zebra (*Danio rerio*) sebagai model. Dalam beberapa dekade ini ikan zebra telah digunakan sebagai organisme model dalam studi biomedis. Beberapa penelitian telah menggunakan ikan zebra sebagai model pengukuran efek antidiabetes (Sarras *et al.*, 2015; Marques *et al.*, 2014; Jörgens *et al.*, 2012). Menurut penelusuran literatur, belum ada penelitian pengembangan uji antidiabetes dengan menggunakan ikan zebra yang telah dilakukan di Indonesia. Oleh karenanya penelitian ini diharapkan dapat mengembangkan suatu metode uji antidiabetes menggunakan hewan uji ikan zebra dari Indonesia.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

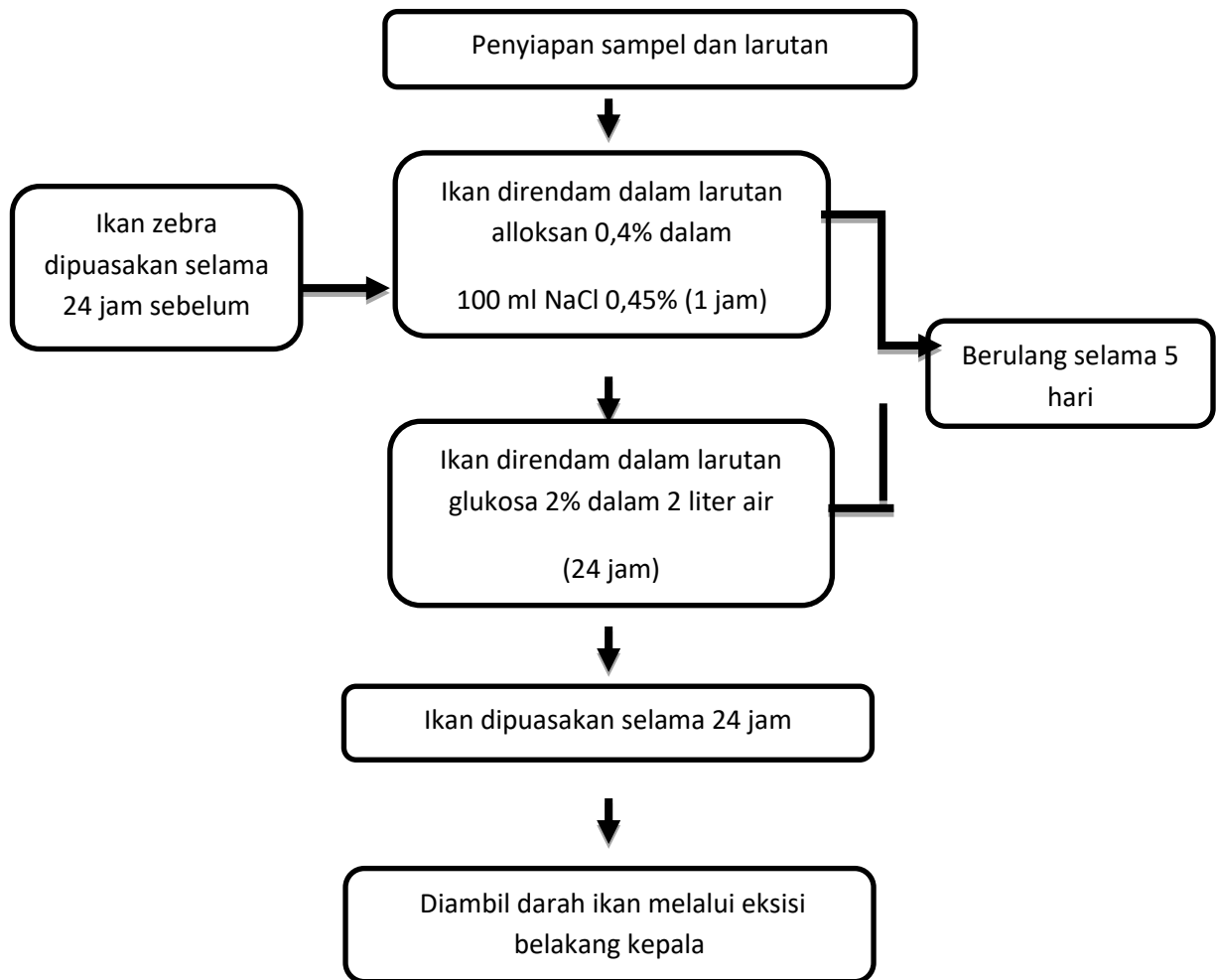
Glukometer (Autocheck®), Gunting, alat gelas, timbangan, Ikan zebra, alloxan monohidrat (®Sigma-Aldrich), glukosa anhidrat (®E-Merck), NaCl 0,45% 100 ml, Aquarium, metformin

Cara Penelitian

Penelitian menggunakan subyek uji ikan zebra/*zebrafish* yang telah diidentifikasi terlebih dulu di LIPI Bogor. Ikan zebra diatur dengan pencahayaan terprogram dan biasa terjaga pada 14 jam terang-10 jam gelap. Pengaturan waktu pencahayaan ini digunakan oleh ikan untuk waktu aktivitas dan waktu terangnya. Selain itu, juga digunakan oleh ikan waktu gelap sebagai waktu untuk *mating* dan bertelur pada saat terang. Pencahayaan yang terus menerus dapat memunculkan pertumbuhan alga pada aquarium. Sehingga, waktu terang atau gelap yang terus menerus tidak disarankan. *Zebrafish* membutuhkan temperature air antara 25oC dan 28 oC. walaupun dilaporkan bahwa temperatur optimal ialah 26 oC dengan suhu ruangan sedikit lebih tinggi misalkan 27 oC. Peningkatan suhu dapat menyebabkan rendahnya kandungan oksigen yang terlarut.

Pada optimasi metode yang pertama Ikan zebra dibagi menjadi 3 kelompok, masing-masing terdiri atas 10 ekor ikan. Kelompok terdiri atas kelompok normal, kelompok induksi 1 (glukosa 1%), kelompok induksi 2 (glukosa 2%). Induksi dilakukan melalui perendaman larutan aloksan 400 mg dalam 100 ml NaCl 0,45% selama 1 jam dan dipindahkan ke dalam

larutan glukosa 1% / 2% dalam 2 liter air. Proses induksi dilakukan berulang selama 5 hari (larutan diganti setiap 24 jam) dan diukur kadar glukosanya setiap hari. Berdasarkan hasil optimasi yang pertama ditentukan lama pembebanan aloksan dan glukosa, dan ditambahkan pengukuran kontrol positif metformin. Sebelum pengukuran kadar glukosa darah ikan zebra dipuasakan selama 24 jam. Pemeriksaan kadar glukosa darah menggunakan alat glukometer.

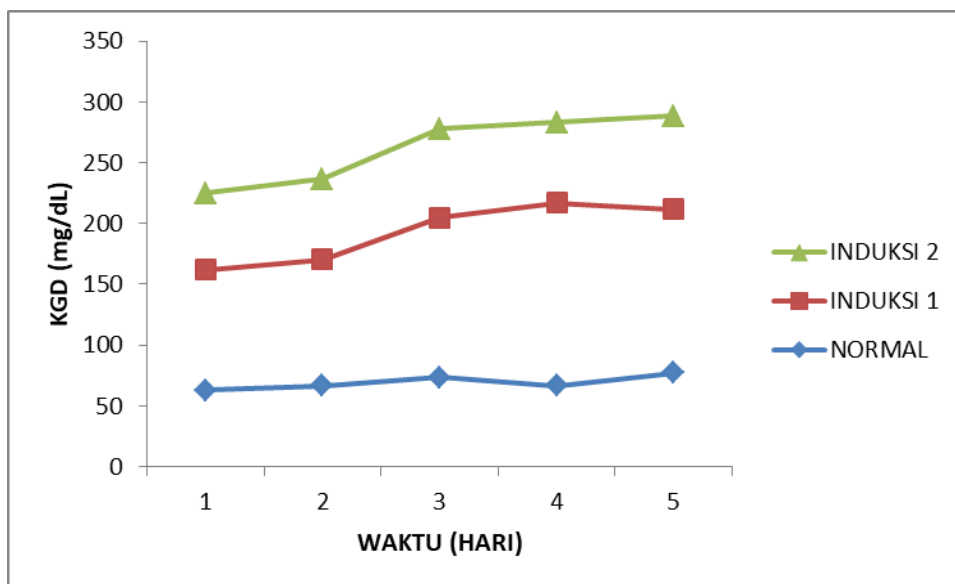


Gambar 1. Skema induksi hiperglikemi pada ikan zebra dengan menggunakan aloksan dan glukosa

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan metode yang valid untuk menginduksi hiperglikemia pada ikan zebra. Induksi dilakukan dengan aloksan 400 mg dalam 100 ml NaCl 0,45% selama 1 jam, dilanjutkan dengan perendaman dengan variasi konsentrasi glukosa 1% dan 2% selama 24 jam. Aloksan merupakan senyawa yang banyak digunakan dalam penelitian untuk menginduksi Diabetes Mellitus karena kemampuannya merusak pankreas.

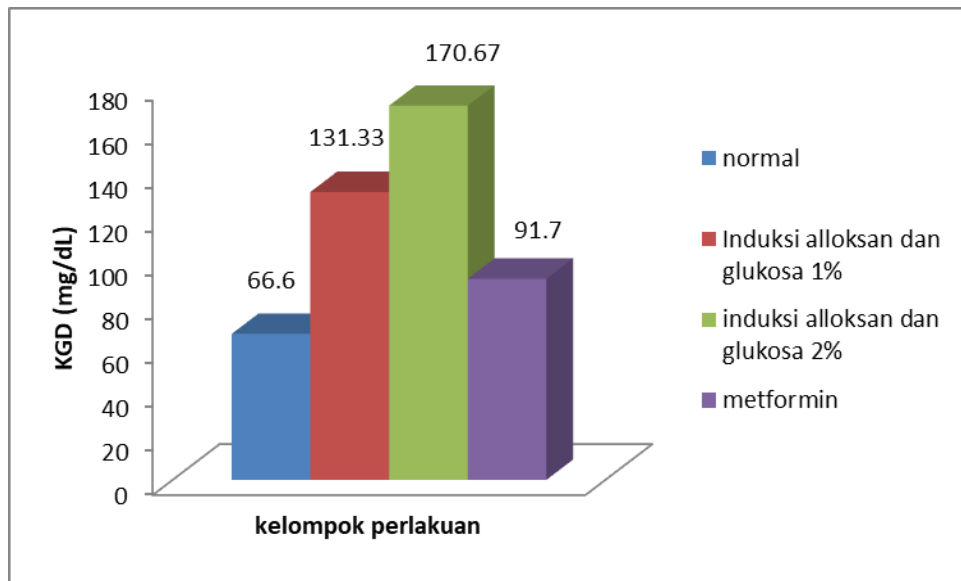
Faktor utama yang mengakibatkan kerusakan pada sel β pankreas adalah pembentukan oksigen reaktif yang diawali oleh proses reduksi aloksan dalam sel β pankreas. Proses reduksi aloksan menghasilkan asam dialurat, yang kemudian mengalami reoksidasi menjadi aloksan, menentukan siklus redoks untuk membangkitkan radikal superoksida yang juga akan direduksi oleh aloksan, kemudian radikal superoksida mengalami dismutasi menjadi hidrogen peroksida yang berjalan spontan dan kemungkinan dikatalisis oleh superoksida dismutase. Salah satu yang menjadi target dari oksigen reaktif adalah DNA pulau *Langerhans* pankreas yang akan menyebabkan kerusakan sel dari pulau *Langerhans* sehingga sekresi insulin terganggu (Nugroho, 2006). Aloksan adalah senyawa yang kurang stabil dalam menaikkan kadar glukosa darah. Penambahan glukosa setelah aloksan digunakan untuk mempertahankan kadar glukosa darah lebih stabil. Pada penelitian ini dilakukan variasi kadar glukosa 1% dan 2% dengan kadar aloksan yang tetap.



Gambar 2. Kadar Glukosa Darah (mg/dL) ikan zebra setelah diinduksi oleh aloksan 400mg/100ml dan glukosa (Induksi 1 : glukosa 1%, induksi 2 : glukosa 2%) selama 5 hari

Kenaikan kadar glukosa darah diperoleh dengan cepat setelah adanya kerusakan sel beta pankreas. Gambar 1 menunjukkan bahwa kenaikan kadar glukosa darah sudah terjadi sejak hari pertama pembebanan aloksan dan glukosa. Kadar glukosa darah meningkat setiap harinya dan mencapai kondisi hiperglikemia. Kadar glukosa darah normal ikan zebra sebesar 50-75 mg/dL (Jörgens *et al.*, 2012) sementara hasil penelitian menunjukkan untuk rata rata kadar glukosa darah normal sebesar 69,20 mg/dL.

Selanjutnya penelitian dilakukan dengan pembebanan aloksan dan glukosa 2% selama tiga hari dan hasilnya dibandingkan dengan metformin sebagai kontrol obat. Pada hari ketiga dianggap sudah terjadi peningkatan kadar glukosa darah yang signifikan dibandingkan normal, dan kenaikan setelah hari ketiga tidak terlalu tajam, Metformin adalah salah satu obat yang banyak digunakan dalam mengatasi Diabetes Mellitus. Fungsi pemberian metformin adalah untuk memastikan bahwa metode yang sedang dikembangkan betul-betul valid, mampu menetapkan aktivitas antihyperglykemia untuk obat yang sudah teruji klinis.



Gambar 3. Kadar Glukosa darah Ikan zebra setelah pembebanan aloksan dan glukosa selama tiga hari

Pemberian Metformin mampu menurunkan kadar glukosa darah sampai 91,7 mg/dL. Walaupun sudah mengalami penurunan namun belum mencapai nilai normal. Metformin diberikan selama satu hari, sehingga kemungkinan belum maksimal menurunkan kadar glukosa darah.

KESIMPULAN

Metode uji antihyperglykemi dengan menggunakan *zebrafish* atau ikan zebra valid dan dapat digunakan dalam penelitian. Induksi aloksan 400mg/100ml diberikan selama 1jam dilanjutkan dengan glukosa 2% 24 jam, diulang selama tiga hari berturut-turut.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah membiayai penelitian melalui Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi dengan no kontrak 032/ST-DirDPPM/70/DPPM/ Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi KEMENRISTEKDIKTI IV/2017.

DAFTAR PUSTAKA

- Jörgens K, Hillebrands JL, Hammes HP, Kroll J. Review *Zebrafish*: A Model for Understanding Diabetic Complications. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2012;120:186–7.
- Kementerian Kesehatan RI, 2013, Pusat data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI : Waspada Diabetes, 1-7
- Marques K, Almeida D, Moraes D, Peres F, Wilges L, Reis M, et al. Hyperglycemia Induces Memory Impairment Linked To Increased Acetylcholinesterase Activity In Zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2014;274:319–25.
- Nugroho A. Review Hewan Percobaan Diabetes Mellitus : Patologi Dan Mekanisme Aksi Diabetogenik. *Biodiversitas*. 2006;7:378–82.
- Pramono, L.A., Setiati, S., Soewondo, P., Subekti, I., Adisasmita, A., Kodim, N., Sutrisna, B., 2010, Prevalence and Predictors of Undiagnosed Diabetes Mellitus in Indonesia, *Acta Med Indones-Indones J Intern Med*, 216-223
- Sarras MP, Leontovich AA, Intine RV. Use of *Zebrafish* as A Model to Investigate The Role of Epigenetics In Propagating The Secondary Complications Observed In Diabetes Mellitus. *Comp Biochem Physiol*. 2015;178:3–7.
- World Health Organization.. Global Report on Diabetes. WHO. USA; 2016.