

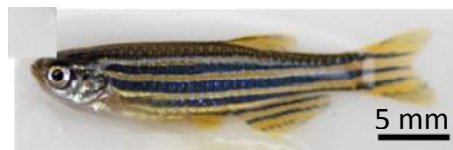
ZEBRAFISH (*Danio rerio*) SEBAGAI HEWAN MODEL DIABETES MELLITUS



NURULIAWATY UTAMI

¹Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI
Jl. Raya Bogor km. 46 Cibinong 16911
Telp. 021-8754627 Fax. 021-8754588

Penggunaan hewan model dalam dunia penelitian merupakan suatu hal yang telah lama dikenal. Hewan model merupakan hewan uji yang digunakan dalam sebuah penelitian untuk tujuan tertentu dengan harapan hewan tersebut mampu berperan atau menyerupai objek penelitian sesungguhnya. Salah satu hewan model yang saat ini mulai berkembang penggunaannya dalam bidang penelitian di Indonesia adalah zebrafish (*Daniorerio*). Zebrafish seperti terlihat pada gambar 1 merupakan vertebrata teleostei (ikan bertulang sejati dan memiliki tutup insang) air tawar dari ordo *Cypriniformes*. Ikan tersebut ditemukan di dekat sungai Gangga, India, pada tahun 1822 oleh Fisikawan Skotlandia, Francis Hamilton. Zebrafish memiliki ciri khas motif garis biru dan perak di sepanjang tubuhnya yang dianalogikan seperti hewan zebra (Parichy, 2015).



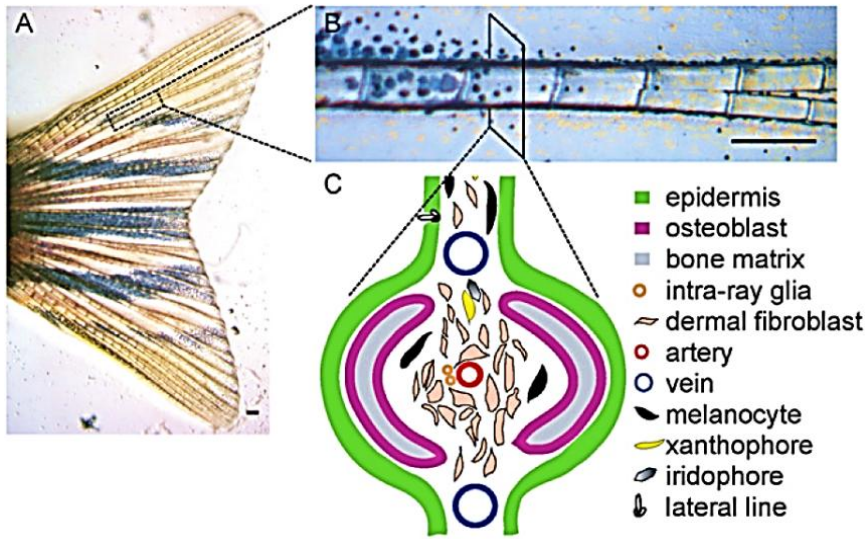
Gambar 1. Zebrafish (*Danio rerio*).

Sumber: (Parichy, 2015)

Zebrafish memiliki beberapa kelebihan sebagai hewan model, yaitu mudah ditangani dan dipelihara dalam kondisi laboratorium, tingkat fekunditas (jumlah sel telur yang dihasilkan oleh seekor hewan betina per tahun atau per satuan berat hewan) tinggi dengan waktu generasi yang singkat (± 3 bulan) sehingga betinanya mampu menghasilkan telur sekitar 100 hingga 200 buah, serta embrio dan larvanya yang transparan memudahkan pengamatan secara *in vivo* (Basu dan Sachidanandan, 2013). Hingga saat ini, zebrafish tercatat telah digunakan sebagai hewan uji untuk mempelajari perilaku penyakit infeksi (Sullivan dan Kim, 2008), penyakit gangguan metabolik,

biologi perkembangan (Seth dkk., 2013), penemuan obat baru/ *etnopharmaceutical* (Littleton dan Hove, 2013), genetik dan analisis ekspresi gen, bionformatika, dan masih banyak lagi.

Salah satu penyakit gangguan metabolik yang diketahui telah menggunakan zebrafish sebagai hewan modelnya adalah diabetes mellitus (Capiotti dkk., 2014; Elo dkk., 2007; Gleeson dkk., 2007; Intine dkk., 2013; Moss dkk., 2009; Olsen dkk., 2010; Schlegel dan Gut, 2015; Seth dkk., 2013). Para peneliti tersebut menggunakan agen diabetogenik seperti streptozotocin dan alloxan untuk membuat zebrafish menjadi hiperglikemia. Penelitian yang dilakukan oleh Seth, dkk. (2013) mengungkapkan bahwa zebrafish dan mammalia termasuk manusia memiliki kemiripan dalam perangkat biologis yang berkaitan dengan gangguan metabolik diabetes mellitus



Gambar 2. Struktur dan jaringan dalam sirip kaudal zebrafish. A, Sirip kaudal zebrafish yang disusun oleh 18 tulang sirip (*bony fin ray*). B dan C, Sayatan melintang beserta ilustrasinya dari sebuah tulang sirip yang terdiri dari beberapa tipe sel yang berbeda, yaitu epidermis, osteoblast, *bone matrix*, *intra-ray glia*, *dermal fibroblast*, *artery*, *vein*, *melanocyte*, *xanthophore*, *iridophore*, dan *lateral line*. Sumber: (Tu dan Johnson, 2011)

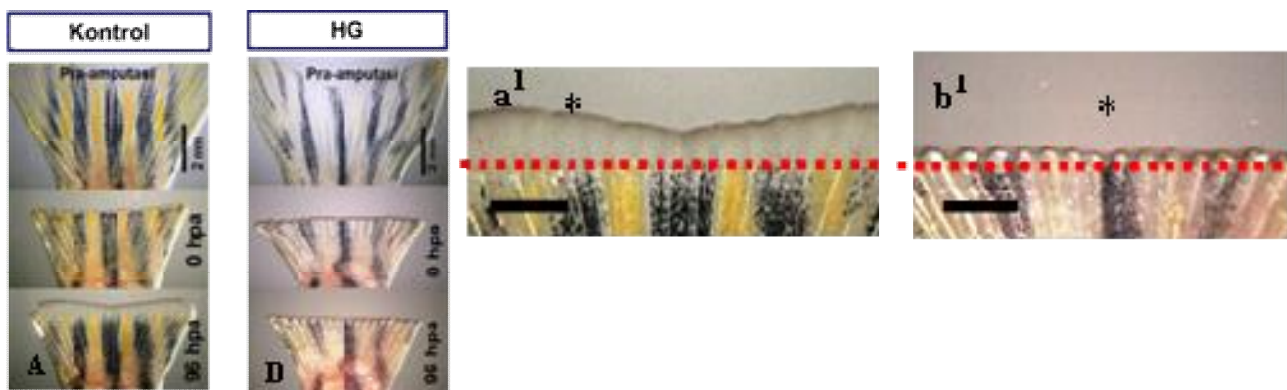
/ hiperglikemia. Organ pankreas pada zebrafish yang terdiri dari kompartemen eksokrin dan endokrinnya dihubungkan oleh sistem saluran yang bermuara ke saluran pencernaan sama seperti mammalia. Proyek sekuensing genom zebrafish *strain TuAb* yang dilakukan pada tahun 2001 oleh Sanger Institut menginformasikan bahwa lebih dari 71% gen yang mengodekan protein pada manusia memiliki setidaknya satu gen ortolog pada zebrafish (Howe, dkk., 2013).

Intine, dkk. (2013) dan Olsen dkk., (2010) diketahui

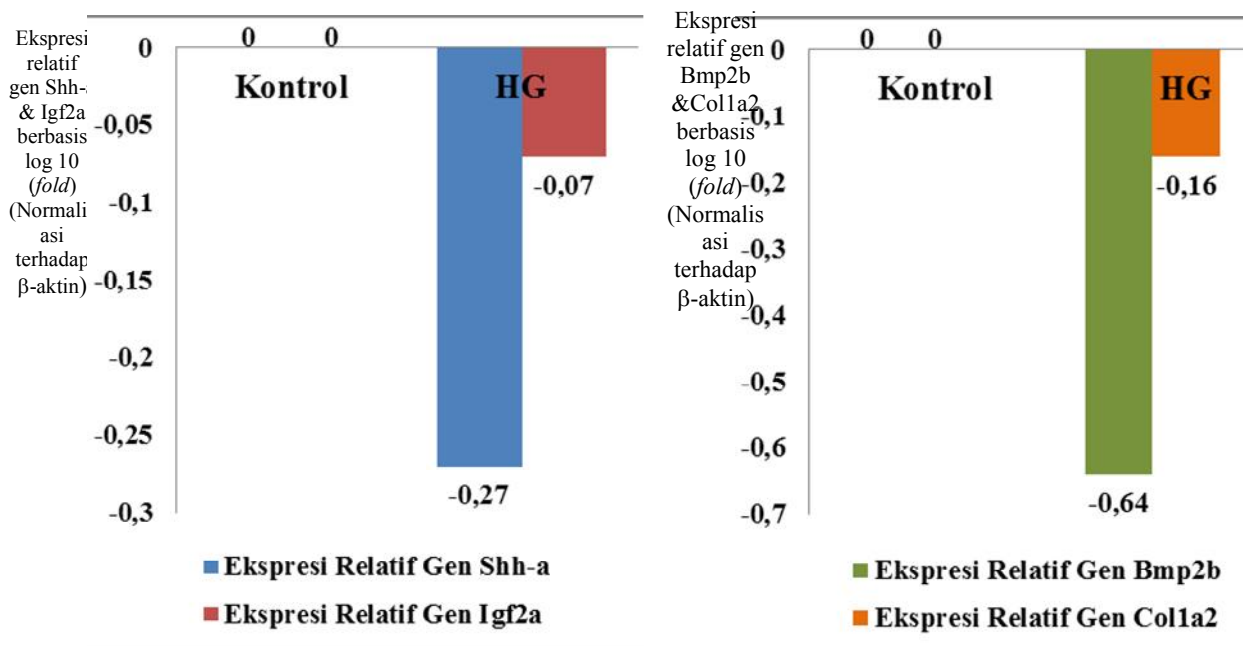
telah menggunakan zebrafish sebagai hewan model untuk diabetes. Penelitiannya memaparkan bahwa zebrafish yang diinduksi dengan streptozotocin sehingga hiperglikemia, tidak hanya menunjukkan komplikasi sekunder berupa diabetes retinopati dan diabetes nepropati, namun juga mengalami kesulitan dalam meregenerasi sirip kaudalnya, hal tersebut mirip seperti komplikasi yang dialami pada manusia penderita diabetes mellitus. Penderita diabetes mellitus, pada tahapan tertentu, terkadang dapat mengalami komplikasi berupa sulitnya proses

penyembuhan luka. Zebrafish memiliki kemampuan untuk meregenerasi bagian sirip kaudalnya (Gambar 2 dan 3) yang hilang atau jika terjadi luka hingga menjadi utuh kembali (regenerasi epimorฟิก), sehingga cocok sebagai hewan model untuk mempelajari penyembuhan luka yang termasuk ke dalam proses regenerasi (Gamberling, dkk., 2013).

Penelitian Ingram, dkk. (2002) menyebutkan bahwa keberadaan gen yang mengodekan protein regulator penting dan berasosiasi dengan proses penyembuhan luka pada mammalia diketahui ortolog dengan gen yang ada pada zebrafish, diantaranya *Shh (Sonic hedgehog)* dan *Igf2a (Insulin-like growth factor 2a)* yang terlibat dalam *Hedgehog (HH) signaling*. Selain itu, *Bmp2b (Bone morphogenetic protein 2b)* dan *Col1a2 (Collagen Type 1 alpha 2)* yang terlibat dalam *Bmp signaling* (Wu dan Lu, 2008) diketahui juga memiliki peran penting dalam proses penyembuhan luka pada mammalia (Yan dkk., 2010; Le, dkk., 2008; Simkin, dkk., 2015).



Gambar 3. Regenerasi sirip kaudal zebrafish seluruh perlakuan. Gambar diambil menggunakan mikroskop stereo pada saat pra-amputasi, 0 hpa (hour post amputation), dan 96 hpa. Keterangan: A = Kontrol (ikan normal), B = HG (ikan hiperglikemia), Gambar a1 dan b1 merupakan perbesaran dari gambar 96 hpa pada masing-masing kelompok perlakuan. Tanda * menunjukkan perbandingan regenerasi sirip ikan hiperglikemia terhadap kelompok Kontrol. Skala pada A dan B menunjukkan 2 mm sedangkan pada a1 dan b1 menunjukkan 1 mm. Garis putus-putus berwarna merah menunjukkan bidang amputasi. Sumber: (Utami, 2016)



Gambar 4. Ekespresi relatif gen-gen regenerasi (Shh-a, Igf2a, Bmp2b, dan Col1a2) pada sirip kaudal zebrafish yang hiperglikemia. Keterangan: Gen Shh-a dan gen Igf2a berada dalam satu jalur *signaling* dimana gen Shh-a berperan sebagai *upstream gene* (gen yang berperan sebagai faktor transkripsi bagi gen lain) sedangkan gen Igf2a sebagai *downstream gene* (gen yang ekspresinya dipengaruhi oleh suatu faktor transkripsi yang biasanya beupa gen lain), begitu pula dengan gen Bmp2b dan Col1a2, gen Bmp2b berperan sebagai *upstream gene* dan Col1a2 sebagai *downstream gene*. Histogram pada Gambar 4 menunjukkan bahwa keempat gen pada sirip kaudal zebrafish hiperglikemia mengalami penurunan level ekspresi relatif yang ditandai dengan angka minus (menunjukkan *downregulated relative gene expression*) dibandingkan terhadap kelompok kontrol (ekspresi relatif gen dinormalisasi terhadap gen β-aktin). Sumber: (Utami, 2016)

Brem dan Canin, (2007) mengungkapkan bahwa patogenesis molekuler terlibat dalam sulitnya

penyembuhan luka. Hal tersebut menimbulkan dugaan bahwa pada zebrafish hiperglikemia

yang kesulitan meregenerasi sirip kaudalnya kemungkinan juga mengalami gangguan

pada gen-gen marker regenerasi. Oleh karena itu, teknik *real time* PCR digunakan untuk mengetahui ekspresi gen *Shha*, *Igf2a*, *Bmp2b*, dan *Col1a2* (Gambar 4) pada sirip kaudal zebrafish yang hiperglikemia dan diketahui bahwa zebrafish yang hiperglikemia mengalami penurunan level ekspresi pada keempat gen regenerasi tersebut (Utami, 2016). Hasil penelitian tersebut, memperkuat dugaan bahwa sulitnya penyembuhan luka dan regenerasi yang diakibatkan oleh kondisi hiperglikemia pada penderita diabetes mellitus berkaitan pula dengan ekspresi gen-gen regenerasi yang terlibat dalam proses penyembuhan luka.

Dari beberapa penelitian tersebut, diketahui bahwa zebrafish merupakan hewan model yang cukup baik untuk digunakan dalam penelitian penyakit metabolik maupun berbasis molekuler, karena mampu menampilkan fitur-fitur yang dibutuhkan untuk mencapai tujuan penelitian. Ikan kecil tersebut juga diharapkan dapat digunakan untuk mengungkap serta mengembangkan ilmu pengetahuan dan solusi terkait patogenesis molekuler pada manusia.

Daftar Pustaka

- Basu, S. dan Sachidanandan, C. (2013) : Zebrafish: A Multifaceted Tool for Chemical Biologists, *Chemical Review*, **A-AC**, 1-29.
- Brem, H. dan Canic, M.T. (2007) : Cellular and Molecular Basis of Wound Healing in Diabetes, *The Journal of Clinical Investigation*, **117**, 1219-1222.
- Capiotti, K.M., Junior, R.A., Kist, L.W., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Silva, R.S.D. (2014) : Persistent Impaired Glucose Metabolism in a Zebrafish Hyperglycemia Model, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **171**, 58-65.
- Elo, B., Villano, C.M., Govorko, D., dan White, L.A. (2007) : Larval Zebrafish as a Model for Glucose Metabolism: Expression of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase as a Marker for Exposure to Anti-Diabetic Compounds, *Journal of Molecular Endocrinology*, **38**, 433-440.
- Gemberling, M., Bailey, T.J., Hyde, D.R., dan Poss, K.D. (2013) : The Zebrafish as a Model for Complex Tissue Regeneration, *Trends in Genetics*, **29**, 611-620.
- Gleeson, M., Connaughton, V., dan Arneson, L.S. (2007) : Induction of Hyperglycemia in Zebrafish (*Danio rerio*) Leads to Morphological Changes in the Retina, *Acta Diabetol*, **44**, 157-163.
- Ingram, W.J., Wicking, C.A., Grimmond, S.M., Forrest, A.R., dan Wainwright, B.J. (2002) : Novel Genes Regulated by Sonic Hedgehog in Pluripotent Mesenchymal Cells, *Oncogene*, **21**, 8196-8205.
- Intine, R.V., Oslen A.S., dan Sarras, M.P. (2013) : A Zebrafish Model of Diabetes Mellitus and Metabolic Memory, *Journal of Visualized Experiment*, **72**, 1-7.
- Le, H., Kleinerman, R., Lerman, O.Z., Brown, D., Galiano, R., Gurtner, G.C., Warren, S.M., Levine, J.P., dan Saadeh, P.B. (2008) : Hedgehog Signalling is Essential for

- Normal Wound Healing, *Wound Repair and Regeneration*, **16**, 768-773.
- Littleton, R.M. dan Hove, J.R. (2013) : Zebrafish: A Nontraditional Model of Traditional Medicine, *Journal of Ethnopharmacology*, **145**, 677-685.
- Moss, J.B., Koustubhan, P., Greenman, M., Parson, M.J., Walter, I., dan Moss, L.G. (2009) : Regeneration of the Pancreas in Adult Zebrafish, *Diabetes*, **58**, 1844-1851.
- Olsen, A.S., Michael, P.S., Robert, V.I. (2010) : Limb Regeneration is Impaired in an Adult Zebrafish Model of Diabetes Mellitus, *NIH Public Access, Wound Repair Regen*, **18**(5), 532-542.
- Parichy, D.M. (2015) : Advancing Biology through a Deeper Understanding of Zebrafish Ecology and Evolution, *eLife*, **4**, 1-11.
- Schlegel, A. Dan Gut, P. (2015) : Metabolic Insights from Zebrafish Genetics, Physiology, and Chemical Biology, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **72**, 2249-2260.
- Seth, A., Stemple, D.L., dan Barroso, I. (2013) : The Emerging Uses of Zebrafish to Model Metabolic Disease, *Disease Models & Mechanism*, **6**, 1080-1088.
- Simkin, J., Sammarco, M.C., Dawson, L.A., Schanes, P.P., Yu, L., dan Muneoka, K. (2015) : The Mammalian Blastema: Regeneration at Our Fingertips, *Regeneration*, **2015**, 93-105.
- Sullivan, S. dan Kim, C.H. (2008) : Zebrafish as a Model for Infectious Disease and Immune Function, *Fish & Shellfish Immunology*, **25**, 341-350.
- Tu, S. dan Johnson, S.L. (2011) : Fate Restriction in the Growing and Regenerating Zebrafish Fin, *Developmental Cell*, **20**, 725-732.
- Utami, N. (2016) : *Propolis dapat Meningkatkan Regenerasi Sirip Kaudal Zebrafish (Danio rerio) yang Diberi Induksi Kombinasi Alloxan dan Glukosa*, Thesis Program Magister, Institut Teknologi Bandung, 44 – 45.
- Wu, C.J. dan Lu, H.K. (2008) : Smad Signal Pathway in BMP-2-Induced Osteogenesis- a Mini Review, *J Dent Sci*, **3**, 13-21.
- Yan, C., Grimm, W.A., Garner, W.L., Qin, L., Travis, T., Tan, N., dan Han, Y.P. (2010) : Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Skin Wound Healing is Induced by Tumor Necrosis Factor- α through Bone Morphogenetic Protein-2, *The American Journal of Pathology*, **176**, 2247-2258.