

Efek ekstrak metanolik dan fraksi metanolik sisa buah mengkudu terhadap peningkatan jumlah protein GLUT-4

The effect of mengkudu fruit methanolic extract and methanolic residual fraction on GLUT-4 protein elevation

Aguslina Kirtishanti*) dan Ryanto Budiono
Fakultas Farmasi Universitas Surabaya, Surabaya

Abstrak

Sampai saat ini masih terus dicari obat baru yang dapat ditoleransi dengan baik dan efektif oleh penderita Diabetes Mellitus. Alternatif yang diminati saat ini adalah tanaman obat tradisional. Tanaman obat tradisional yang dipakai pada penelitian ini adalah mengkudu. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peningkatan jumlah protein GLUT-4 pada tikus Diabetes Mellitus tipe 2 yang diberi ekstrak metanolik dan fraksi metanolik sisa buah mengkudu. Tikus dibuat diabetes dengan pemberian insulin eksogen secara intraperitoneal selama 10 hari. Setelah tikus mengalami Diabetes Mellitus yang ditandai dengan hiperglikemik kemudian tikus diberi ekstrak metanolik dan fraksi metanolik sisa dari buah mengkudu selama 4 hari secara oral. Pada hari ke 5 setelah terapi, glukosa darah puasa tikus putih jantan diukur kemudian tikus dikorbankan dan diambil jaringan otot paha untuk dibuat preparat imunohistokimia. Dari preparat imunohistokimia dihitung jumlah protein GLUT-4. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa ekstrak metanolik dan fraksi metanolik sisa buah mengkudu dapat meningkatkan jumlah protein GLUT-4 tapi tidak dapat menurunkan kadar glukosa darah puasa tikus putih jantan.

Kata kunci : buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L), ekstrak metanolik dan fraksi metanolik sisa, Diabetes Mellitus tipe 2, protein GLUT-4

Abstract

Investigating in the Diabetes Mellitus drug which one having good activity and tolerance to patients are still in researchers' concern. One of the main topics now days is the use of mengkudu plants as a traditional medicine of Diabetes Mellitus. This research was aimed to determine the increase of GLUT-4 protein in type 2 Diabetes Mellitus rats after given methanolic extract and methanolic residual of mengkudu fruit. The male rats were diabetic induced with exogenous i.p. insulin for 10 days. After showing hyperglycemic effect, the rats were given orally methanolic extract and methanolic residual fraction of mengkudu fruit for 4 days. On the fifth day, fasting blood glucose was measured and the rats were sacrificed to take the thigh muscle tissue for immunohistochemical calculation. The result showed that methanolic extract and methanolic residual of mengkudu fruit increase the amount of GLUT-4 protein, but can not reduce fasting blood glucose levels of male white rats.

Key words : mengkudu fruit (*Morinda citrifolia* L.), methanolic extract and methanolic residual, type 2 Diabetes Mellitus, GLUT-4 protein

Pendahuluan

Diabetes Mellitus adalah suatu gangguan metabolisme glukosa yang ditandai dengan hiperglikemia kronik. Penelitian ini difokuskan pada Diabetes

Mellitus tipe 2 karena jumlah kasus terbanyak di Indonesia adalah DM tipe 2 yaitu lebih dari 90 % penderita (Guyton and Hall, 2000). Penderita DM tipe 2 secara esensi mempunyai dua

kelainan dasar, yaitu : pertama, resistensi terhadap ambilan glukosa yang dimediasi insulin dan kedua, disfungsi sel beta (Hendromartono, 2002).

Pada penderita DM tipe 2 didapatkan bahwa ekspresi mRNA SREBP-1c (Sterol Regulatory-Element Binding Protein-1c) menurun. SREBP-1c merupakan faktor transkripsi untuk beberapa gen yang berbeda antara lain adalah gen GLUT-4 (Ducluzeau, 2001; Lay, 2002). GLUT-4 (transporter glukosa 4) adalah protein transpor untuk glukosa yang bertujuan membawa glukosa masuk ke dalam sel. Proses translokasi GLUT-4 ke permukaan sel target diawali dengan ikatan insulin dan reseptor insulin subunit α dimana ikatan tersebut menyebabkan subunit β dari reseptor insulin dan substrat lain yaitu *Insulin Receptor Substrate-1* (IRS-1) mengadakan autofosforilasi. Selanjutnya IRS-1 mengaktifkan phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3 Kinase) yang memediasi translokasi GLUT-4 ke permukaan sel target (Goldfine, 2001). Bila transkripsi GLUT-4 menurun maka ekspresi protein GLUT-4 juga menurun sehingga jumlah protein GLUT-4 dalam sel menurun. Hal ini menyebabkan terjadi peningkatan glukosa dalam darah yang disebut hiperglikemia.

Sampai saat ini masih terus dicari obat baru yang dapat ditoleransi dengan baik dan efektif oleh penderita Diabetes Mellitus. Alternatif yang diminati saat ini adalah tanaman obat tradisional. Tanaman obat tradisional yang dipakai pada penelitian ini adalah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). Penelitian yang dilakukan oleh Kirtishanti, 2004, menyatakan bahwa jus buah mengkudu dapat meningkatkan protein GLUT-4 pada otot skeletal tikus putih jantan. Penelitian tersebut dilanjutkan dengan menggunakan buah mengkudu yang diekstrak menggunakan pelarut organik yaitu metanolik dengan dasar pemikiran bahwa semua zat yang berkhasiat akan terlarut dalam pelarut metanolik, kemudian ekstrak metanolik tersebut difraksinasi menggunakan

pelarut non polar sampai yang bersifat semipolar dan akhirnya didapat fraksi metanolik sisa. Fraksi metanolik sisa juga diamati efeknya terhadap peningkatan jumlah protein GLUT-4 dengan dasar pemikiran bahwa zat yang bersifat polar saja yang tertinggal dalam fraksi metanolik sisa.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peningkatan jumlah protein GLUT-4 pada otot skeletal tikus putih jantan Diabetes Mellitus tipe 2 yang diberi ekstrak metanolik dan fraksi metanolik sisa dari buah mengkudu.

Metodologi

Bahan

Bahan yang digunakan meliputi adalah ekstrak metanolik dan fraksi metanolik sisa buah mengkudu, insulin eksogen (*long acting human insulin*) sebagai penginduksi timbulnya keadaan hiper-glikemik pada hewan coba, pakan tikus, aquadem, eter, formalin, alkohol 95 %, xylool, parafin cair, antibody diluent, reagen anti GLUT-4, reagen asesoris, kloroform, heksan dan aquabidestilata.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah accutrend strip glukosa dan accutrend meter untuk mengukur kadar glukosa darah puasa tikus putih jantan, evaporator, alat-alat bedah, objek glass, cover glass, mikrotom, spuit, jarum suntik, beaker glass, pengaduk, mikroskop cahaya.

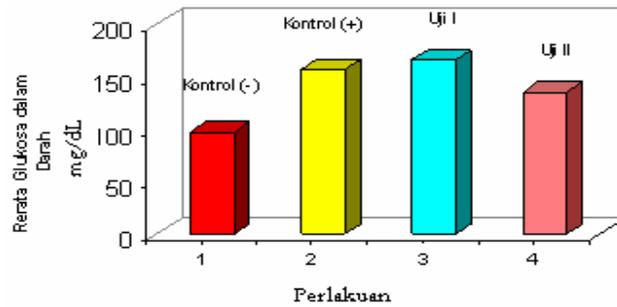
Sampel

Sampel penelitian yaitu menggunakan 40 ekor tikus putih jantan strain Wistar, umur 3 - 4 bulan dengan berat badan berkisar antara 120-160 g BB, sehat secara fisik. Sampel diambil secara *simple random sampling* yaitu sampel diambil secara acak sederhana karena populasi dianggap homogen (Zainuddin, 2000) .

Kriteria sampel

Sampel penelitian yang digunakan harus memenuhi kriteria sampel sebagai berikut :

- Kelompok kontrol negatif mempunyai kadar glukosa darah puasa pada rentang normal (55-140 mg/dL) (Mendez and Ramos, 1994).
- Kelompok kontrol positif mempunyai kadar glukosa darah puasa melebihi nilai normal dan



Gambar 1. Diagram batang rata-rata kadar glukosa darah pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok uji I dan kelompok uji II.

Tabel I. Data pengamatan kadar glukosa darah kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok uji I dan kelompok uji II

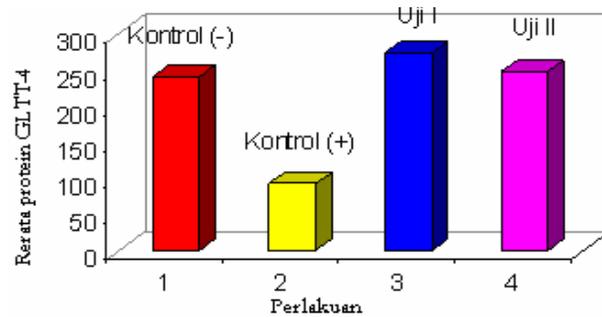
No. Tikus	Kadar Glukosa Darah (mg/dL)			
	Kontrol negatif	Kontrol positif	Uji I (metanolik)	Uji II (metanolik sisa)
1	90	175	155	-
2	95	154	-	114
3	100	178	210	160
4	70	180	-	-
5	115	162	-	-
6	94	167	139	-
7	102	124	166	161
8	105	131	186	-
9	110	141	138	102
10	92	-	165	140
Rata-rata	97,3	156,8	165,5	135,4
SD	12,49	20,76	25,72	26,71

- Kelompok uji yang diberi ekstrak metanolik dan fraksi metanolik sisa mempunyai kadar glukosa darah puasa pada rentang normal (55-140 mg/dL).

Jalannya penelitian

Penelitian menggunakan 40 ekor tikus putih jantan yang diadaptasikan selama satu minggu pada lingkungan percobaan. Setelah adaptasi 1 minggu maka 40 ekor tikus putih jantan dibagi dalam 4 kelompok masing-masing terdiri dari 10 ekor tikus yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok uji I dan kelompok uji II. Kelompok kontrol negatif hanya diberi aquadem, kelompok

kontrol positif diberi insulin eksogen 0,35 U/kg BB secara intraperitoneal (i.p) sebanyak 3 kali sehari selama 10 hari (Wu Yang Chang, *et al.*, 2002; Cheng, *et al.*, 2001) dan kelompok uji diberi insulin eksogen dengan dosis dan aturan pakai serta lama pemakaian yang sama dengan kelompok kontrol positif, kemudian pada hari ke tujuh pemberian insulin eksogen, tikus kelompok uji I diberi ekstrak metanolik buah mengkudu 15,5 % secara oral sehari 2 kali dengan volume pemberian 15 mL/kg BB selama 4 hari sampai hari ke sepuluh. Tikus kelompok uji II diberi fraksi metanolik sisa buah mengkudu 25,4 % dengan cara, volume dan lama pemberian yang



Gambar 2. Diagram batang rata-rata jumlah protein GLUT-4 pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok uji I dan kelompok uji II.

Tabel II. Anova satu arah kadar glukosa darah kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok uji I dan kelompok uji II

Kelompok	Kelompok	Signifikan
Kontrol negatif	Kontrol positif	0,000
	Uji I (ekstrak metanolik)	0,000
	Uji II (fraksi metanolik sisa)	0,012
Kontrol positif	Uji I (ekstrak metanolik)	0,841
	Uji II (fraksi metanolik sisa)	0,272
Uji I (metanolik)	Uji II (fraksi metanolik sisa)	0,087

sama dengan kelompok uji I. Kemudian semua kelompok tikus dipuaskan 12 jam lalu diukur kadar glukosa darah puasa pada hari ke 11. Setelah pengukuran kadar glukosa darah, semua tikus dikorbankan dan diambil otot skeletal bagian paha kemudian dibuat sediaan dengan pengecatan secara imunohistokimia untuk menghitung jumlah protein GLUT-4.

Hasil dan Pembahasan

Pemeriksaan kadar glukosa darah dilakukan pada hari ke 11, kemudian kadar glukosa darah dibandingkan antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan kelompok uji I dan uji II (Tabel I dan Gambar 2).

Data statistik anova satu arah yang disederhanakan untuk kadar glukosa darah dapat dilihat pada Tabel II.

Berdasarkan perhitungan statistik, kelompok kontrol negatif berbeda bermakna dengan kelompok kontrol positif, berarti insulin eksogen yang diberikan

sehari 3 kali selama 10 hari dapat menimbulkan keadaan hiperglikemia (analog Diabetes Mellitus tipe 2).

Kelompok kontrol negatif juga berbeda bermakna dengan kelompok uji I dan uji II, walaupun nilai rata-rata kadar glukosa darah puasa pada kelompok uji II masuk dalam rentang normal yaitu 55 -140 mg/dL. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol positif dengan kelompok uji I dan uji II, begitu juga tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok uji I dan uji II. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak metanolik dan fraksi metanolik sisa buah mengkudu belum dapat menurunkan kadar glukosa darah puasa tikus secara bermakna.

Pemeriksaan terhadap jumlah protein GLUT-4 dilakukan dengan menghitung protein GLUT-4 dalam sel otot skeletal yang telah dilakukan pengecatan secara imunohistokimia.

Tabel III. Data jumlah protein GLUT-4 pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok uji I dan kelompok uji II

No. Tikus	Jumlah protein GLUT-4			
	Kontrol negatif	Kontrol positif	Uji I (metanolik)	Uji II (metanolik sisa)
1	210	102	275	-
2	278	115	-	169
3	205	75	344	146
4	293	80	-	-
5	224	65	-	-
6	302	141	284	-
7	194	74	129	340
8	165	96	149	-
9	250	87	393	264
10	298	-	352	323
Rata-rata	241,9	92,8	275,1	248,4
SD	49,04	23,85	101,56	88,02

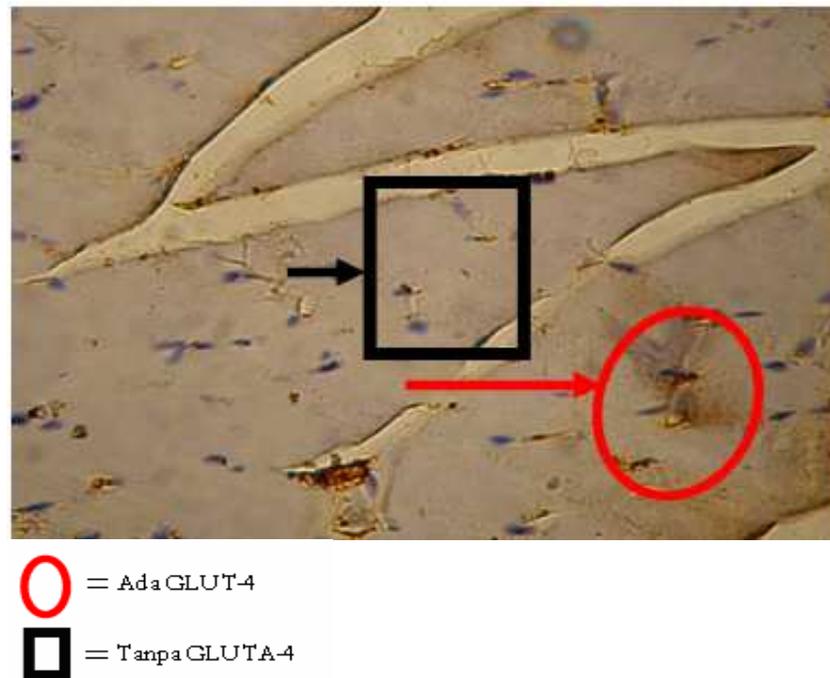
Tabel IV. Anacova jumlah protein GLUT-4 pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok uji I dan kelompok uji II

Kelompok	Kelompok	Signifikan
Kontrol negatif	Kontrol positif	0,014
	Uji I (ekstrak metanolik)	0,292
	Uji II (fraksi metanolik sisa)	0,647
Kontrol positif	Uji I (ekstrak metanolik)	0,000
	Uji II (fraksi metanolik sisa)	0,001
Uji I (metanolik)	Uji II (fraksi metanolik sisa)	0,396

Teknik imunohistokimia yang dipakai adalah metode *indirect* dengan prinsip pembentukan ikatan antigen-antibodi (Martoprawiro dan Willy, 2002). Antigennya adalah protein GLUT-4 yang ada dalam sel otot skeletal sedangkan antibodi primernya adalah antibodi poliklonal, anti GLUT-4 dan antibodi sekundernya adalah biotinylated yang sudah diberi label sehingga ikatan antigen-antibodinya dapat dilihat. Sel otot yang diamati adalah sel otot yang dianggap representatif dengan sel yang tidak terlipat, tidak ada sel yang bertumpuk-tumpuk dan irisan tidak tebal.

Sel otot yang mengandung protein GLUT-4 memiliki inti berwarna biru dan dikelilingi oleh sitoplasma yang berwarna coklat. Jumlah GLUT-4 dihitung setiap satu irisan otot. Pengukuran jumlah protein GLUT-4 menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Data jumlah protein GLUT-4 dari setiap kelompok perlakuan ditunjukkan pada Tabel III dan grafik diagram batang rata-rata jumlah protein GLUT-4 setiap kelompok perlakuan ditampilkan pada Gambar 2.

Data statistik anacova yang disederhanakan untuk jumlah protein GLUT-4 ditunjukkan pada Tabel IV.



Gambar 3 Hasil pewarnaan secara imunohistokimia terhadap Protein GLUT-4 (Irisan otot skeletal dengan inti sel berwarna biru dan dikelilingi oleh sitoplasma berwarna coklat dan tanpa dikelilingi sitoplasma berwarna coklat).

Berdasarkan data statistik anacova, jumlah protein GLUT-4 pada kelompok kontrol negatif berbeda bermakna dengan kelompok kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa keadaan hiperglikemia (analog dengan diabetes mellitus tipe 2) akibat pemberian insulin eksogen menyebabkan penurunan jumlah protein GLUT-4 pada otot skeletal tikus putih jantan. Jumlah protein GLUT-4 pada kelompok kontrol negatif, uji I dan uji II menunjukkan nilai yang hampir sama tingginya. Ini didukung dengan data statistik anacova bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan uji I dan uji II begitu juga tidak ada perbedaan bermakna jumlah GLUT-4 antara kelompok uji I dan uji II. Ini berarti bahwa pemberian ekstrak metanolik dan fraksi metanolik sisa buah mengkudu dapat meningkatkan jumlah protein GLUT-4

pada kelompok hewan coba yang sudah diberi insulin eksogen.

Bila dilihat dari nilai rata-rata jumlah protein GLUT-4 pada kelompok uji I lebih tinggi daripada kelompok uji II walaupun secara statistik tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Hal ini dapat disebabkan oleh karena pada kelompok uji I, buah mengkudu diekstrak menggunakan pelarut metanolik. Metanolik adalah pelarut yang dapat menarik seluruh kandungan yang ada pada buah mengkudu baik polar, semi polar dan non polar, sehingga seluruh zat yang berkhasiat untuk meningkatkan jumlah protein GLUT-4 dapat tersari dengan baik. Pada kelompok uji II digunakan fraksi metanolik sisa buah mengkudu dimana yang tertinggal dalam fraksi metanolik sisa adalah zat-zat yang bersifat polar saja sehingga diduga peningkatan jumlah protein GLUT-4

lebih sedikit dibanding ekstrak metanolik buah mengkudu.

Seharusnya peningkatan jumlah protein GLUT-4 akan menurunkan kadar glukosa darah puasa pada kelompok uji I dan uji II tapi dalam penelitian ini ternyata tidak demikian.

Hal ini dapat disebabkan karena peningkatan jumlah protein GLUT-4 belum bermakna untuk menurunkan kadar glukosa darah puasa. Diketahui bahwa protein GLUT-4 adalah protein transport untuk glukosa masuk ke dalam sel, tanpa GLUT-4 maka glukosa tidak dapat digunakan oleh sel dan kadar glukosa dalam darah akan meningkat. Penurunan kadar glukosa darah yang belum bermakna terhadap peningkatan jumlah protein GLUT-4 dapat dikarenakan beberapa hal yaitu lama pemberian ekstrak buah mengkudu yang berlangsung sebentar (4 hari) dan dosis ekstrak buah mengkudu belum optimal.

Hasil pewarnaan protein GLUT-4 secara imunohistokimia pada irisan otot skeletal tikus putih jantan dapat dilihat pada Gambar 3.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanolik buah mengkudu dengan konsentrasi 15,5 % dan fraksi metanolik sisa buah mengkudu dengan konsentrasi 25,4 % dapat meningkatkan jumlah protein GLUT-4 pada tikus putih jantan Diabetes Mellitus tipe 2 akibat insulin eksogen.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada LPPM Universitas Surabaya yang memberikan dana untuk penelitian ini sehingga dapat dikerjakan dengan baik.

Daftar Pustaka

- Cheng, J. T., Liu, I. M., Chi, T. C., Su, H. C., and Chang, C. G., 2001, Stimulation of Insulin Release in Rats by Die-Huang-Wan, A Herbal Mixture Used in Chinese Traditional Medicine, *J. of Pharmacy and Pharmacology* 53 : 273 - 276
- Ducluzeau, P. H., Perretti N., Laville, M., Andreelli, F., Vega, N., Riou, J. P., and Vidal, H., 2001, Regulation by Insulin of Gene Expression in Human Skeletal Muscle and Adipose Tissue, *Diabetes* 50 : 1134 - 1142
- Goldfine, A. B., 2001, Hospital Practice : Type 2 Diabetes : New Drugs, New Perspectives, *The McGraw-Hill Companies*, Boston, 1 - 6
- Guyton, A. C., and Hall, J. E., 2000, *Textbook of Medical Physiology*, 10th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, p. 884 - 886
- Hendromartono, 2002, The Role of PPAR Activator on Insulin Resistance, Surabaya *Diabetes Update-XI*, Surabaya, 1 - 4
- Kirtishanti A., 2004, *Efek Jus Buah Mengkudu (Morinda citrifolia L.) Terhadap Peningkatan Jumlah Protein GLUT-4 Pada Tikus Putih Jantan Hiperglikemik (Analog Diabetes Mellitus Tipe 2)*, Tesis, Universitas Airlangga, Surabaya
- Lay, S. L., Lefrere I., Trautwein, C., Dugail, I., and Krief, S., 2002, Insulin and Sterol-regulatory Element-binding Protein-1c (SREBP-1c) Regulation of Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes, *J. Biology Chemistry* 277 (38) : 35625 - 35634
- Martoprawiro, S. S, and Sandhika Willy, 2002, *Prinsip-prinsip Imunomikroskopis*, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Mendez, J. D., and Ramos, H. G., 1994, Animal Models in Diabetes Research, *Archives of Medical Research*, 367 - 375

- Wu Yang Chang, Hsu, J. H., Liu, I. M., Liou, S. S., Su, H. C., and Cheng, J. T., 2002, Increase of Insulin Sensitivity in Diabetic Rats Received Die-Huang-Wan, A Herbal Mixture Used in Chinese Traditional Medicine, *Acta Pharmacologica Sinica* 23(12) : 1181 - 1187
- Zainuddin M, 2000, *Metodologi Penelitian*, Universitas Airlangga, Surabaya

*Koresponden : Aguslina Kirtishanti
Alamat : Fakultas Farmasi Universitas Surabaya, Surabaya
Telp : 031-2981112