

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN SIRIH MERAH (*Piper Crocatum Ruiz & Pav*) TERHADAP EKSPRESI GLUKOSA TRANSPORTER 2 PADA HATI DAN PANKREAS YANG DIINDUKSI STREPTOZOTOCIN-NIKOTINAMIDA

EFFECT OF RED BETEL LEAF ETHANOL EXTRACT (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) ON GLUCOSE TRANSPORTER 2 EXPRESSION OF LIVER AND PANCREAS INDUCED BY STREPTOZOTOCIN-NICOTINAMIDE

Eka Wisnu Kusuma¹, Rina Herowati², Arief Nurrochmad³

kusuma.3ka@gmail.com

^{1,2}Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta

³Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Abstrak

Diabetes melitus (DM) adalah penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia, berhubungan dengan penurunan ekspresi GLUT-2 di pankreas dan peningkatan ekspresi GLUT-2 di hati. Daun sirih merah bermanfaat untuk pengobatan DM.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antihiperglikemi, peningkatan ekspresi GLUT-2 di pankreas, dan penurunannya di hati dari ekstrak etanol daun sirih merah pada tikus yang diinduksi streptozotosin-nikotinamida. Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus putih jantan galur wistar, dibagi secara acak menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif, Ekstrak etanol daun sirih merah (EEDSM) 50 mg/kg bb dan 100 mg/kg bb. Pemberian STZ-NA hari ke-0, diukur kadar glukosa hari ke-5 selanjutnya diberi perlakuan selama 14 hari. Parameter yang diukur ekspresi GLUT-2 di pankreas dan di hati.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Pemberian ekstrak etanol daun sirih merah selama 14 hari secara kualitatif mampu meningkatkan ekspresi GLUT-2 dengan nilai pada kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif, EEDSM 50 mg/kg bb dan 100 mg/kg bb berturut-turut adalah 100%, 32,31%, 67,67%, 52,73% dan 60,01%. Pemberian EEDSM secara kualitatif mampu menurunkan ekspresi GLUT-2 di sel hati dengan nilai pada kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif, EEDSM 50 mg/kg bb dan 100 mg/kg bb berturut-turut adalah 13,21%, 100%, 52,05%, 87,08%, dan 78, 09%.

Kata Kunci : daun sirih merah, antihiperglikemi, STZ-NA, ekspresi GLUT-2

Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by hyperglycemia, decreased expression of GLUT-2 in pancreatic, and increased expression of GLUT-2 in liver. Red betel leaf seed is useful for treatment of diabetes.

This study aims to determine the effect of antihyperglycemic, increased expression of GLUT-2 in pancreas, and decrease in liver of the red betel leaf ethanol extract in STZ-NA induced rats. This research used 25 male white wistar rats, which randomly divided into five groups, normal control, negative control, positive control, EEDSM dose of 50 mg/kg bw and 100 mg/kg bw. Induced STZ-NA days 0, measured glucose levels next day 5 and treated were for 14 days. Measured parameters were GLUT-2 expression in pancreas and liver.

The results showed that EEDSM for 14 days qualitatively able to increase the expression of GLUT-2 in pancreatic cells with those in the normal control, negative control, positive control, EEDSM 50 mg/kg bw, and 100 mg/kg bw respectively to 100%, 32,31%, 67,67%, 52,73% and 60,01%. EEDSM qualitatively able to reduce the expression of GLUT-2 in liver cells with those in the normal control, negative control, positive control, EEDSM 50 mg/kg bw, and 100 mg/kg bw respectively to 13,21%, 100%, 52,05%, 87,08%, dan 78, 09%.

Keywords : Piper crocatum Ruiz & Pav, antihyperglycemic, STZ-NA, GLUT-2 expression

Pendahuluan

Diabetes melitus adalah salah satu penyakit degeneratif terbesar di dunia. Perkiraan data tahun 2013 menurut IDF (*International Diabetes Federation*) terdapat 382 juta orang yang hidup dengan DM di dunia, 175 juta di antaranya belum terdiagnosa, sehingga terancam berkembang progresif menjadi komplikasi tanpa disadari dan tanpa pencegahan. Pada tahun 2035 jumlah tersebut diperkirakan akan meningkat menjadi 592 juta orang (Depkes RI, 2014).

GLUT-2 atau glukosa transporter 2 adalah sebuah pembawa protein yang memberikan fasilitas glukosa untuk melintasi membran sel, memiliki afinitas rendah yang ditemukan di usus, hati, ginjal, sel β pankreas, di dalam neuron, serta dalam sistem saraf pusat. GLUT-2 pada sel β pankreas diperlukan glukosa untuk sekresi insulin. GLUT-2 berfungsi menangkap sinyal apabila terjadi peningkatan kadar glukosa darah dalam tubuh, berperan dalam merespon kadar glukosa yang meningkat dengan kemampuan dari sel β pankreas untuk mengeluarkan insulin, serta penyerapan glukosa postprandial dalam usus dan hati. GLUT-2 merupakan perantara penting dalam homeostatis glukosa (Thorens, 2015).

Daun sirih merah merupakan salah satu tanaman obat yang digunakan secara empiris oleh masyarakat sebagai obat tradisional. Daun sirih merah mempunyai kandungan flavonoid (flavon dan flavonol) yang lebih banyak dibanding dengan daun sirsak, daun ekor naga dan daun katuk sehingga baik dalam pengobatan (Neldawati *et al.*, 2013). Berdasarkan latar belakang diatas, maka penulis tertarik ingin menguji pengaruh daun sirih merah terhadap penurunan kadar glukosa darah serta jumlah GLUT-2 yang dibuktikan melalui pengamatan imunohistokimia pada model hewan uji.

Metode Penelitian

Alat Penelitian

Alat gelas *rotary evaporator*, penangas air, kipas angin, corong Buchner, cawan porselen, chamber, lampu UV dan densitometer KLT, pipa

kapiler kaca, sentrifuge, mikropipet 10 dan 50-250 μ L (transferpette, Brand, England), neraca analitik elektrik (Chyo Jupiter Chyo Jupiter C3-100 MD), *stopwatch*, *spektrofotometer vitalab micro* (Merck, Darmstadt, Germany), Surgical suture (Bio-Dynamic, Germany), mikrotom Leica model RM 2235, Germany ;Mikroskop Olympus CX-21, Tokyo, Japan, Oven dan inkubator Memmert, Germany, *MacBiophotonic Image J*.

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini meliputi Daun sirih merah yang diperoleh dari Kecamatan Tempuran, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah pada bulan april 2015, etanol 96%, air suling, *buffer citrate*, norma salin (NS), reagen *Dragendroff*, reagen anisaldehyd, asam sulfat, reagen *Lieberman Burchard*, timbal (II) asetat, HCl 2N, kloroform, asam asetat anhidrat, asam asetat glasial, asam sulfat pekat, asam klorida, dan FeCl₃, *buffer neutral formalin* (BNF), amoniak, reagen *Schiff*, *haematoxyllin*, alkohol, eosin, xylol, etanol absolut, H₂O₂ 0,3%, metanol, reagen GOD-PAP (DiaSys), antibody GLUT-2, STZ sigma Aldrich, nikotinamid (NA).

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur Wistar sebanyak 25 ekor yang berumur 6-8 minggu dengan bobot badan berkisar antara 200-250 g. Hewan percobaan secara acak dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok berjumlah 5 ekor tikus

Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini yaitu berupa penelitian eksperimental untuk mengetahui pengaruh daun sirih merah terhadap penurunan kadar glukosa darah serta jumlah GLUT-2 yang dibuktikan melalui pengamatan imunohistokimia

Preparasi Sampel dan Ekstraksi

Tanaman daun sirih merah diambil dari Kecamatan Tempuran, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah pada bulan April 2015. Pengelolaan bahan mencakup sortasi basah, pencucian, pengecilan ukuran, pengeringan dan sortasi kering. Setelah tahap sortasi kering simplisia digiling dengan mesin

penggiling dan diayak dengan ayakan mesh 40, kemudian disimpan dalam tempat kering dan tertutup rapat. Pembuatan ekstrak daun sirih merah dilakukan dengan metode maserasi dengan cara sebagai berikut, sebanyak 1 kg simplisia diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% selama 3 x 24 jam pada suhu kamar. Serbuk daun sirih merah yang telah ditimbang, dimasukkan ke dalam maserator kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 10 L dan ditutup lalu dibiarkan selama 3 hari pada tempat yang terlindung dari cahaya matahari sambil sering diaduk setiap 24 jam. Setelah 3 hari, ekstrak cair disaring. Filtrat kemudian dipindahkan ke dalam suatu bejana tertutup. Ekstrak yang didapat kemudian diuapkan dengan rotari evaporator hingga diperoleh ekstrak kental

Preparasi dan pewarnaan jaringan pankreas dan hati

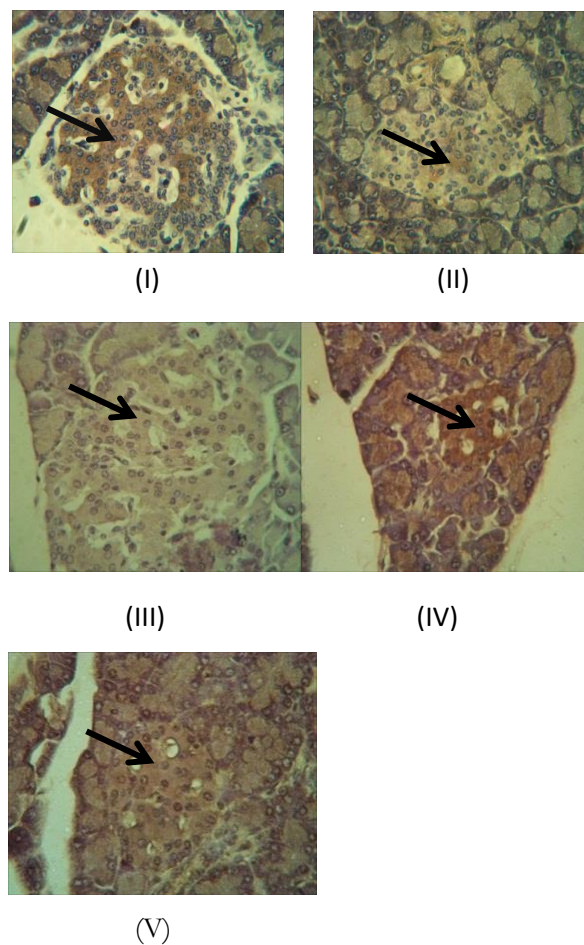
Organ pankreas dan hati difiksasi dengan *buffer neutral formalin* (BNF) 10% dilanjutkan pembuatan preparat imunohistokimia. Pengerjaan imunohistokimia, fotomikroskopi, dan kuantifikasi dilakukan di Laboratorium Histologi dan Biologi Sel, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta. Adapun prosedur *Immunohistochemistry* (IHC), fotomikroskopi, dan kuantifikasi protein GLUT-2 dilakukan dengan 4 tahapan yaitu: (1) preparasi *slide* sampel pankreas dan hati tikus; (2) melihat struktur anatomi sel yang akan diamati; (3) optimasi pengenceran/ *dilution* dan *operating time* antibodi anti GLUT-2; (4) *Immunohistochemistry* (IHC) terhadap sampel, fotomikroskopi dan kuantifikasi translokasi protein.

Analisa Data

Data yang diperoleh berupa perubahan morfologis jaringan yaitu jumlah dan ukuran sel-sel jaringan sel β pankreas dan hati. Dalam proses menentukan nilai luas dan intensitas translokasi protein GLUT-2 pada sel β pankreas dan hati, penelitian secara kualitatif menggunakan bantuan program komputer *MacBiophotonics Image J*.

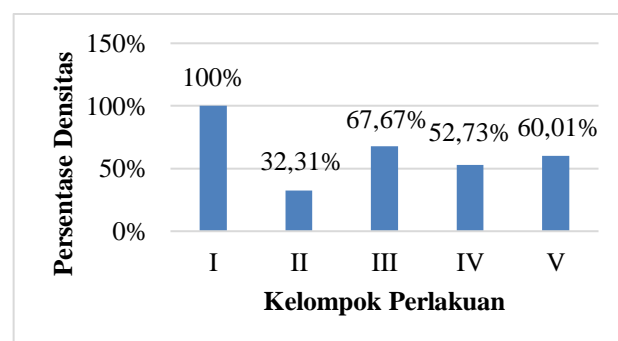
Hasil dan Pembahasan

Metode imunohistokimia digunakan untuk mendeteksi keberadaan molekul atau berbagai macam komponen yang terdapat di dalam sel atau jaringan dengan menggunakan prinsip reaksi antara antigen dengan antibodi. Pemeriksaan jumlah protein GLUT-2 dilakukan dengan menghitung protein GLUT-2 dalam sel pankreas tikus yang telah dilakukan pengecatan secara imunohistokimia menggunakan anti GLUT-2 sebagai antibodi.



Gambar 1. Hasil pewarnaan IHC terhadap sel β pankreas tikus jantan dengan perbesaran (13x40)

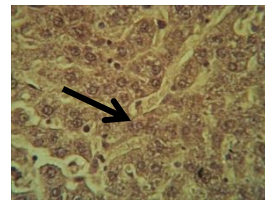
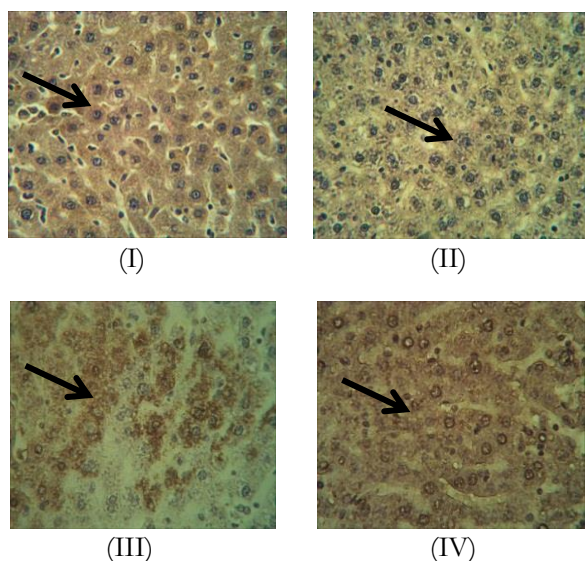
Keterangan I. Normal II. Kontrol negatif III. Kontrol positif IV. EEDSM dosis 50 mg/kg BB V. EEDSM dosis 100 mg/kg BB



Gambar 2. Persentase densitas protein GLUT-2 di pankreas Keterangan I. Normal II. Kontrol negatif III. Kontrol positif IV. EEDSM dosis 50 mg/kg BB V. EEDSM dosis 100 mg/kg BB

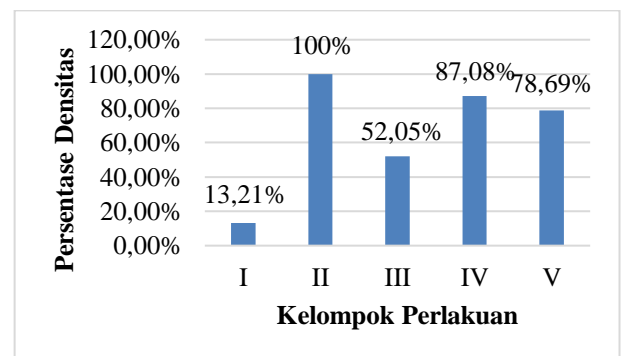
Warna cokelat yang tampak pada sayatan pulau Langerhans menunjukkan keberadaan insulin yang dihasilkan oleh sel-sel β pankreas. Pada kontrol normal, terlihat warna cokelat yang memenuhi pulau Langerhans dengan intensitas yang jelas. Jaringan endokrin pankreas atau pulau Langerhans memiliki sifat plastisitas yang tergantung dari massa sel β pankreas. Ukuran pulau Langerhans pada kontrol negatif yang cenderung lebih kecil dibandingkan normal diduga karena telah terjadi penurunan massa sel β pankreas. GLUT1 dan GLUT2 secara aktif mengangkut molekul glukosa di dalam sel dimana glikolisis dapat membentuk ATP. Kerusakan sel β pankreas dapat didefinisikan sebagai pengurangan sekresi insulin atau kegagalan untuk merespons glukosa plasma, dimana sel β pankreas rentan mengalami kerusakan oksidatif (Newsholme *et al.*, 2012).

Hasil kuantitatif nilai densitas sel pankreas memperlihatkan kontrol normal memiliki nilai 100%, kontrol negatif 32,31%, kontrol positif 67,67%, dosis 50 mg/kgbb 52,73%, dan dosis 100 mg/kgbb 60,01%. Hasil pada tabel diatas memperlihatkan ekspresi GLUT-2 ini tampak menyebar di sel pankreas termasuk di sitoplasma dan membran sel. Kelompok normal memiliki densitas GLUT-2 tertinggi karena merupakan kelompok yang tidak mengalami DM type 2, dan tidak diberi STZ-NA sedangkan kelompok negatif memiliki GLUT-2 terendah karena hanya mendapat STZ-NA tanpa mendapat terapi. Ekspresi GLUT-2 pertama kali terdeteksi di hati, usus, ginjal, sel β pankreas, serta dalam sistem saraf pusat, di neuron, astrosit dan *tanyocytes* (Thorens, 2015).



(V)

Gambar 3. Hasil pewarnaan IHC terhadap sel hati tikus jantan dengan perbesaran (13x40)
Keterangan I. Normal II. Kontrol negatif III. Kontrol positif IV. EEDSM dosis 50 mg/kg BB V. EEDSM dosis 100 mg/kg BB



Gambar 4. Persentase densitas protein GLUT-2 di hati
Keterangan I. Normal II. Kontrol negatif III. Kontrol positif IV. EEDSM dosis 50 mg/kg BB V. EEDSM dosis 100 mg/kg BB

Hasil kuantitatif nilai densitas sel hati memperlihatkan Kelompok perlakuan normal memiliki jumlah GLUT-2 yang berbeda dengan kelompok kontrol positif, kontrol negatif dan terapi. Hasil rata-rata GLUT-2 kelompok normal 13,21%, kontrol positif 52,05%, dosis 50 mg/kgbb sebanyak 87,08%, dosis 100 mg/kgbb 78,69% dan kontrol negatif 100%. Kelompok negatif memiliki nilai paling tinggi karena hanya diberi STZ-NA dan tidak diterapi, sedangkan kelompok kontrol normal memiliki nilai paling rendah karena tidak mendapat perlakuan induksi STZ-Na. Ekspresi GLUT-2 ditunjukkan oleh nilai densitas yang kuat dari warna coklat. Semakin banyak GLUT-2 maka semakin banyak glukosa yang dilepaskan dari hati menuju ke peredaran darah melalui transporter GLUT-2 sehingga kadar glukosa di darah semakin meningkat. Hati berperan penting dalam mengatur homeostatis karbohidrat dan faktor penting dalam proses sintesis, penyimpanan dan redistribusi karbohidrat. Peran utama hepatosit GLUT-2 adalah mengatur penyerapan glukosa, namun resistensi insulin dapat meningkatkan GLUT-2 yang dapat memperburuk disfungsi metabolit pada NAFLD (Karim S, *et al.*, 2012).

Simpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun sirih merah dapat meningkatkan ekspresi GLUT-2 pada sel β pankreas tikus yang diinduksi STZ-NA dan Pemberian ekstrak etanol daun sirih merah dapat menurunkan ekspresi GLUT-2 pada sel hati tikus yang diinduksi STZ-NA

Ucapan Terima Kasih

Peneliti menyampaikan terima kasih kepada Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta, yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian di laboratorium instansi tersebut di atas

Daftar Pustaka

- Depkes RI. 2014. Situasi dan Analisis Diabetes. Jakarta.
<http://www.depkes.go.id/folder/view/01/structure-publikasi-pusdatin-info-datin.html>
- Karim S. *et al.*, 2012. Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family, *World J Gastroenterol.* 18(46): 6771-6781
- Neldawati, Ratnawulan, Gusnedi. 2013. Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk berbagai Jenis Daun Tanaman Obat. *Pillar Of Physics*, 2: 76-83
- Newsholme. *et al.*, 2012. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defences and β -cell function: a critical role for amino acids. *Journal of Endocrinology*, 214(1), 11-20
- Thorens B, 2015. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis, *Journal Diabetologia.* 58 (2): 221-232

