

EFEK FRAKSI ETIL ASETAT DAUN KELOR TERHADAP EKSPRESI GEN PTP1B PADA OTOT TIKUS DIABETES DENGAN INDUKSI STREPTOZOTOCIN DAN NIKOTINAMID

Sholihatil Hidayati^{1*}, Rini Sulistyawati², Laela Hayu Nurani³

¹ Program Studi Sarjana Farmasi STIKES dr. Soebandi, Jember

² Analis Farmasi dan Makanan, Akademi Analis Farmasi Al Islam Yogyakarta

³ Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta 55164

*corresponding author email: sholihatilhidayati@yahoo.co.id

ABSTRAK

Daun kelor mengandung senyawa flavonoid yaitu kuersetin yang terbukti memiliki efek antidiabetes. Efek antidiabetes flavonoid diduga berkaitan dengan resistensi insulin. Penelitian dilakukan dengan induksi diabetes pada tikus dan dilanjutkan perlakuan fraksi etil asetat daun kelor (FEDK), setelah semua tikus dikorbankan dilakukan isolasi RNA, sintesis cDNA, dan analisis RT-PCR menggunakan primer PTP1B. Dari hasil qPCR diperoleh data ekspresi gen PTP1B pada kelompok diabetes dengan pemberian FEDK dosis 50 mg/kgBB menunjukkan hasil yang berbeda makna dibanding dengan kelompok kontrol diabetes tanpa perlakuan. FEDK dosis 50 mg/kgBB memiliki aktivitas menghambat ekspresi gen PTP1B dan potensial untuk dikembangkan sebagai kandidat agen antidiabetes.

Key words: Daun kelor, PTP1B, Antidiabetes, Fraksi etil asetat

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus merupakan gangguan metabolisme yang menjadi masalah kesehatan dan menyebabkan banyak kematian di dunia (Tamrakar *et al.*, 2014). Diestimasikan bahwa setengah dari pasien diabetes tidak menyadari tentang penyakitnya dan menyebabkan perkembangan komplikasi penyakit lebih lanjut. Komplikasi dari diabetes diantaranya komplikasi mikrovaskular dan makrovaskuler yang meliputi neuropati, nefropati, retinopati dan komplikasi makrovaskuler terdiri dari penyakit kardiovaskuler, stroke, dan penyakit arteri (Papatheodorou *et al.*, 2018). Diabetes tipe 2 merupakan tipe diabetes yang umum dan terjadi sekitar 90% pada seluruh kasus diabetes. Diabetes tipe 2 secara umum dikarakterisasi oleh resistensi insulin, dimana tubuh tidak mampu merespon insulin secara sempurna (Idf, 2020).

PTP1B merupakan *negative regulator* dari sinyal transduksi reseptor insulin yang memiliki peran penting dalam patogenesis terjadinya diabetes melitus. Peningkatan aktivitas PTP1B disebabkan oleh perkembangan resistensi insulin, yang mendorong terjadinya diabetes tipe 2 dan obesitas (Kim *et al.*, 2016). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa PTP1B, sebagai *negative regulator* pada sinyal insulin dan leptin,

sehingga PTP1B dapat menjadi target obat yang menjanjikan untuk penyakit diabetes tipe 2 dan obesitas. Dalam jalur sinyal insulin, PTP1B dapat dikaitkan dengan dan defosforilasi insulin reseptor (IR) teraktivasi atau insulin reseptor substrat (IRS). Pada jalur leptin, PTP1B mengikat dan mendefosforilasi Janus kinase 2 (JAK2), yang merupakan hilir reseptor. Ekspresi PTP1B yang berlebihan dalam kultur sel mengurangi stimulasi fosforilasi insulin dari IR dan/atau IRS-1, sedangkan penurunan ekspresi PTP1B meningkatkan sinyal yang distimulasi oleh insulin. Analisis genetik dari gen PTPN1, yang mengkode PTP1B pada manusia, menunjukkan hubungan yang signifikan terkait dengan metabolisme yang berhubungan dengan peran PTP1B secara *in vivo*. Dalam model murine, gangguan gen PTPN1 mengakibatkan resistensi terhadap obesitas yang disebabkan oleh diet dan peningkatan sensitivitas insulin. Tikus dengan model PTP1B memiliki kadar trigliserida yang lebih rendah secara signifikan bahkan saat makan dengan diet tinggi lemak, dan menunjukkan respons yang ditingkatkan terhadap penurunan berat badan yang dimediasi leptin dan penekanan pemberian makanan. Selain itu, molekul kecil penghambat PTP1B berperan sebagai insulin mimetic dan meningkatkan sensitivitas insulin (Jiang *et al.*, 2012)

Pencarian literatur sistematis mengungkapkan bahwa berbagai senyawa alami dilaporkan menunjukkan aktivitas penghambatan PTP1B. Pada tahun 2002, lima flavonoid alami dilaporkan sebagai inhibitor PTP1B (Jiang *et al.*, 2012).

Penelitian mengungkapkan bahwa berbagai senyawa alami dilaporkan menunjukkan aktivitas penghambatan PTP1B, salah satunya adalah flavonoid. Kelor merupakan tanaman yang kaya akan kandungan senyawa fitokimia seperti flavonoid, alkaloid dan saponin (Abalaka *et al.*, 2012). Kandungan fitokimia daun kelor meliputi: 4-(4'-*o*-acetyl- α -ramnopiranyloxy) benzilisoithiosianat, benzil isoithiosianat (Fahey, 2005), total polifenol, kuersetin, kaempferol dan lutein (Ramakrishnan, 2011), kuersetin-3-glikosida (isokuersetin), kuersetin-4-glikosida (spiraeosid), *chlorogenic acid* (Ndong *et al.*, 2007). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian fraksi etil asetat daun kelor terhadap ekspresi gen PTP1B.

BAHAN DAN METODE

1. Ekstraksi dan Fraksinasi

Sebanyak 1 kg serbuk daun *Moringa oleifera* Lamk. dimaserasi menggunakan 10 L etanol 80% selama 5 hari, kemudian disaring menggunakan penyaring vakum. Residu dimaserasi kembali dengan menggunakan etanol 80% sebanyak 2 L selama 24 jam. Maserat yang didapat dipekatkan hingga kental menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 60 °C.

Ekstrak etanol daun kelor sebanyak 10 gram dibagi dalam 10 tabung dilarutkan dalam pelarut n-heksan sebanyak 5 ml, kemudian divortex dan disentrifuge hingga diperoleh 2 fase yaitu fase supernatan sebagai fraksi larut n-heksan dan fase endapan sebagai fraksi tidak larut n-heksan. Supernatan dipisahkan dari endapan dan

ditempatkan di wadah terpisah. Fase endapan ditambahkan n-heksan, divortex dan disentrifuge lagi hingga jernih dan warna hijau pada supernatan hilang. Diambil fraksi tidak larut n-heksan dimasukkan dalam corong pisah dan dilarutkan dalam pelarut etil asetat sebanyak 5 ml dan dikocok selama 15 menit, didiamkan sampai memisah dan membentuk 2 lapisan atau fase yaitu fraksi larut etil asetat dan fraksi tidak larut etil asetat.

2. Induksi diabetes

Sebanyak 30 tikus Wistar berumur 2 bulan dipuasakan semalam. Induksi diawali dengan pemberian nikotinamid 100 mg/kgBB dalam larutan salin secara intraperitonean (i.p). 15 menit kemudian dilanjutkan dengan injeksi STZ dosis 65 mg/kgBB secara (i.p) dalam 0,1 M buffer sitrat, pH 4,5 yang dibuat baru. Kelompok kontrol (5 tikus) diinjeksi dengan buffer sitrat. Setelah 5 hari, hewan coba diukur kadar gula darah puasanya. Kadar gula darah puasa ≥ 200 mg/dL masuk dalam kategori positif diabetes (Hajiaghaapour *et al.*, 2015). Uji *ethical clearance* dilakukan di Komite Etik Fakultas Farmasi UAD.

3. Analisis ekspresi gen PTP1B

Ekspresi gen PTP1B dianalisis dengan RT-PCR. Bagian organ otot dikumpulkan dan dimasukkan dalam nitrogen cair. RNA total diisolasi dari jaringan menggunakan reagen TRIzol dan dideterminasi konsentrasinya pada panjang gelombang 260 nm dan larutan RNA disimpan pada suhu -80°C . Sintesis cDNA dilakukan dengan menggunakan iScript cDNA dan analisis realtime RT-PCR dengan Eva Green SMX. Sebagai standar internal digunakan GAPDH. Primer spesifik yang digunakan yakni : primer mRNA PTP1B (F: 5'-CGA GGG TGC AAA GTT CAT CAT-3'; R: 5'-GGT CTT CAT GGG AAA GCT CCT T-3'), primer mRNA GAPDH (F: 5'-TGG TGG ACC TCA TGG CCT AC-3'; R: 5'-CAG CAA CTG AGG GCC TCT CT-3') (Gao *et al.*, 2010).

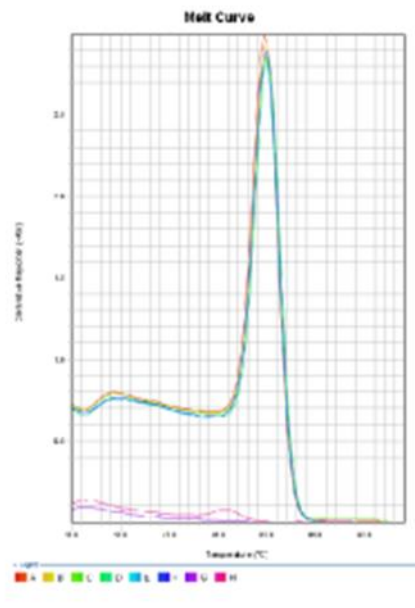
4. Analisa data

Analisis statistik menggunakan program SPSS 17.0 one way anova dengan tingkat kepercayaan 95%.

HASIL PENELITIAN

1. Optimasi suhu *annealing*

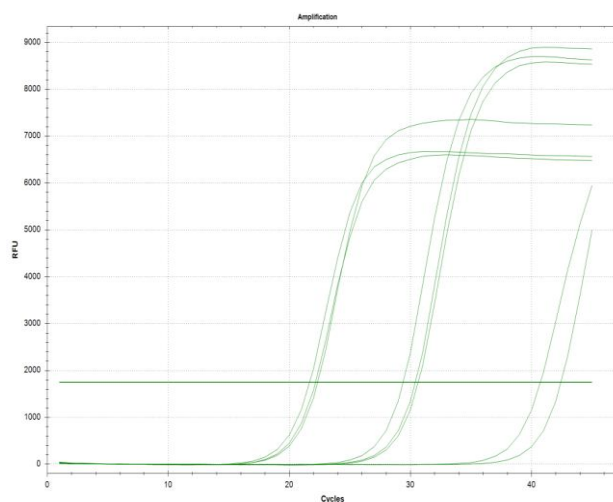
Analisis suhu *annealing* dilakukan dengan optimasi suhu dalam mesin qRT-PCR. Optimasi suhu dalam mesin qRT-PCR dibuat bertingkat dalam satu proses (Kartika, 2018). (Gambar 1.) menunjukkan puncak kurva leleh gen PTP1B yaitu titik maksimum sinyal fluorescence terdeteksi. Amplikon yang berbeda menghasilkan puncak kurva leleh DNA pada suhu yang berbeda. Puncak kurva leleh produk DNA gen PTP1B terdeteksi pada suhu 81°C dengan suhu *annealing* 56°C yang menunjukkan hasil *melt curve* yang stabil.



Gambar 1. Kurva melting curve gen PTP1B

Optimal tidaknya suhu *annealing* dapat dilihat dari grafik amplifikasi dengan membandingkan perlakuan triplo dari satu sampel yang sama (Kartika, 2018). Kurva hasil amplifikasi produk cDNA dengan RT-PCR (Gambar 2.), menunjukkan jumlah siklus PCR pada bagian x-axis dan jumlah amplifikasi sinyal fluorescence yang sebanding dengan jumlah produk cDNA yang teramplifikasi pada bagian y-axis. Titik pertemuan sinyal fluorescence melewati garis threshold di ekspresikan sebagai nilai gen target PTP1B mulai terdeteksi pada siklus 18.

Hasil RT-PCR dari primer PTP1B pada 2 sampel otot dengan perlakuan triplo didapatkan hasil kurva amplifikasi dengan Cq yang hampir sama. Hal ini menunjukkan bahwa suhu 56°C merupakan suhu *annealing* optimal.



Gambar 1. Kurva amplifikasi gen PTP1B

Pada penelitian ini, ekspresi gen PTP1B pada otot tikus model diabetes dengan induksi kombinasi streptozotocin dan nicotinamid yang diberi perlakuan fraksi etil asetat daun kelor dosis 50mg/kgBB mempunyai ekspresi lebih kecil dan berbeda signifikan dibandingkan tikus model diabetes tanpa perlakuan (Tabel 1.).

Table 1. Ekspresi gen PTP1B otot tikus diabetes setelah perlakuan

Kelompok	$\chi \pm SD$
Sehat	7,3767 $\pm$ 0,12503*
Diabetes	9,0067 $\pm$ 0,78053
Diabetes + Metformin	7,6433 $\pm$ 0,95007*
Diabetes + FEDK 25 mg/kgBB	8,0867 $\pm$ 0,31896
Diabetes + FEDK 50 mg/kgBB	7,6367 $\pm$ 0,75036*

*) Berbeda signifikan terhadap kelompok diabetes $P < 0,05$

PEMBAHASAN

Kelor merupakan jenis tanaman obat yang berpotensi sebagai antidiabetes (Sugunabai *et al.*, 2013). Beberapa penelitian terkait dengan efek antidiabetes daun kelor telah dilakukan. Pengamatan uji *in vitro* dengan klonal sel beta pankreas BRIN-BDII, menunjukkan bahwa ekstrak aseton daun kelor memiliki efek insulinotropik melalui K_{ATP} -dependent pathway yang ditunjukkan dengan peningkatan kadar Ca^{2+} intraseluler (Ojo dan Ojo, 2014). Penelitian lain secara *in vivo* membuktikan bahwa ekstrak daun kelor secara signifikan meningkatkan aktivitas superoxide dismutase (SOD) dan glutathion-s-transferase (GST), serta menurunkan lipid peroxidase (LPO) yang merupakan faktor karakteristik pada diabetes kronik (Jaiswal *et al.*, 2013). Evaluasi antidiabetes ekstrak metanol daun kelor terbukti dapat menurunkan kadar glukosa darah tikus serta menunjukkan adanya aktifitas antioksidan dengan penurunan kadar *nitric oxide* (NO) serum (Gupta *et al.*, 2012). Penelitian lain juga menyatakan bahwa ekstrak air daun kelor memiliki efek hipoglikemik melalui normalisasi peningkatan *hepatic pyruvate carboxylase enzyme* serta meregenerasi kerusakan hepatosit dan sel beta pankreas (Latif *et al.*, 2014).

Kelor memiliki kandungan senyawa fitokimia seperti flavonoid yaitu kuersetin (Sulistiyawati *et al.*, 2017). Flavonoid adalah senyawa polifenolik yang terdiri dari 15 karbon, dengan dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh jembatan tiga karbon. Flavonoid merupakan produk alami yang paling banyak dan secara luas terdapat di alam. Flavonoid termasuk flavonol, flavon, flavanon, isoflavon, katekin, antosianidin, dan chalcones. Efek potensial flavonoid, seperti antivirus, antitumor, antiplatelet, aktivitas anti-inflamasi dan antioksidan (Jiang *et al.*, 2012).

Beberapa flavonoid yang telah diuji menunjukkan penghambat efektif terhadap PTP1B, dengan nilai IC_{50} yang sebanding dengan kontrol positif, asam ursolat. Flavonoid ditemukan sebagai inhibitor PTP1B efektif yang potensial untuk pengobatan

diabetes tipe 2 (Proenca *et al.*, 2017). Evaluasi pada penghambatan PTP1B menunjukkan bahwa efek penghambatan dari xanthones yang terprenilasi lebih kuat daripada flavonoid, menunjukkan bahwa xanthones yang diprenilasi dapat dianggap sebagai kelas baru untuk penemuan dan pengembangan penghambatan PTP1B yang berbasis anti diabetes dan anti-obesitas (Quang *et al.*, 2015).

Pada penelitian ini dilakukan analisis ekspresi gen PTP1B pada otot tikus diabetes dengan pemberian fraksi etil asetat, hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dosis 50 mg/kgBB dapat menurunkan ekspresi gen PTP1B secara signifikan disbanding dengan kelompok control diabetes tanpa perlakuan serta tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat daun kelor memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat antidiabetes terutama diabetes tipe 2 yang memiliki mekanisme kerja sebagai penghambat PTP1B.

KESIMPULAN

Pemberian FEDK dapat menurunkan ekspresi gen PTP1B pada otot tikus yang mengalami diabetes dengan induksi kombinasi streptozotocin dan nicotinamid. FEDK dapat dikembangkan sebagai agen atidiabetes baru dalam pengobatan diabetes tipe 2.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh KEMENRISTEK DIKTI melalui program hibah penelitian kerjasama antar perguruan tinggi (PEKERTI).

DAFTAR PUSTAKA

- Abalaka ME, Daniyan SY, Oyeleke SB, Adeyemo S. 2012. The Antibacteria Evaluation of *Moringa oleifera* Leaf Extract on Selected bacterial Pathogens. *J Microbiol Res.* 2(2): 1-4
- Fahey JW. 2005. *Moringa oleifera*: A Review of The Medical Evidence for its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. *J Trees Life.* Vol. : 1:5
- Gupta R, Mathur M, Bajaj VK, Katariya P, Yadav S, Kamal R, Gupta RS. 2012. Evaluation of Antidiabetic and Antioxidant Activity of *Moringa oleifera* in Experimental Diabetes. *J Diab.* 4: 164-171.
- Jaiswal D, Rai PK, Mehta S, Chatterji S, Shukla S, Rai DK. 2013. Role of *Moringa oleifera* in Regulation of Diabetes-Induced Oxidative Stress. *Asian Pacific J Trop Med*, pp 426-423
- Jiang C, Liang L, Guo Y. 2012. Natural products possessing protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory activity found in the last decades. *Acta Pharmacol Sin.* 33: 1217-1245
- Kartika AI. 2018. Optimasi Annealing Primer mRNA RECK dengan Metode One-Step qRT-PCR. *Jurnal Labora Medika.* Vol. 2: 22-31

- Kim DH, Lee S, Chung YW, Kim BM, Kim H, Kim K, Yang KM. 2016. Antiobesity and Antidiabetes Effects of a *Cudrania tricuspidata* Hydrophilic Extract Presenting PTP1B Inhibitory Potential. *Biomed Res Int*. **2016**:1-11
- Latif AA, El Biaiy Bel S, Mahboub HD, Abd El Daim MA. 2014. *Moringa oleifera* Leaf Extract Ameliorates Alloxan-Induced Diabetes In Rats by Regeneration of β -cells and Reduction of Pyruvate Carboxylase Expression. *Biochem Cell Biol*. **92**(5): 413-419
- Ndong M, Uehara M, Katsumata S, Suzuki K. 2007. Effects of Oral Administration of *Moringa oleifera* Lamk. On Glucose Tolerance in Goto-Kakizaki and Wistar Rats. *J Clin Bioc Nutr*. **40**: 229-233
- Ojo OO dan Ojo CC. 2014. Insulinotropic Action of *Moringa oleifera* Involves the Induction of Membrane Depolarization and Enhancement of Intracellular Calcium Concentration. *J Exp Integr Med*. **5**(1): 36-41
- Proenca C, Freitas M, Ribeiro D, Sousa JLC, Carvalho F, Silva AMS, Fernandes PA, Fernandes E. 2017. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by flavonoids: A structure - Activity relationship study, *Food and Chem Toxicol*. doi: 10.1016/j.fct.2017.11.039.
- Quang TH, Yoon C, Ngan N, Cho K. 2015. Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors from the Roots of *Cudrania tricuspidata*. *Molecules*. **20**(6): 11173-11183
- Ramakrishnan BS, Venkataraman R. 2011, Screening of Antioxidant Activity, Total Phenolics and Gas Chromatography Mass-Spectrophotometer (GC-MS) Study of Ethanolic Extract of *Aporosa lindleyana*. *African J Res*. **5**(14): 360-364.
- Sugunabai J, Jayaraj M, Karpagam T, Varalaksmi B. 2014. Antidiabetic Efficiency of *Moringa oleifera* and *Solanum Nigrum*. *IJPPS*. Vol. **6**(1): 40-42
- Sulistyawati R, Nurani LH, Hidayati S, Mursyidi A, Mustofa. 2017. Standarisasi Kualitas Fraksi Etil Asetat Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lamk.). The 6th University Research Colloquium 2017. 67-72
- Tamrakar AK, Maurya CK, Rai AK. 2014. PTP1B inhibitors for type 2 diabetes treatment: a patent review (2011 – 2014). *Expert Opin Ther Pat*. **24**(10): 1101-1115
- www.idf.org/. 2020. Understanding Diabetes Complications. Diakses pada tanggal 28 Februari 2020