

Efektivitas Ekstrak Etanol Biji Pinang Terhadap Densitas GLUT4 pada Sel-Sel Otot Rangka Mencit yang Terinduksi Hiperqlikemia

Effectiveness of The Ethanol Extract of Betel Nut on The GLUT4 Density in Skeletal Muscle Cells of Mice Induced Hyperglycemia

MULIA SAFRIDA SARI¹, AHMAD RIDWAN^{1*}

¹*Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Labtek XI,
Jl. Ganesha 10, Bandung 40132*

Diterima 07 Oktober 2016/Disetujui 19 November 2016

Betel nut (*Areca catechu*) was proven to have antihyperglycemic activity through increased PI3K pathway in the GLUT4 translocation in cells. However, research on the ethanol extract of betel nut in Indonesia is still limited. The main problem in this study was whether the ethanol extract of betel nut could improve glucose tolerance in a two-hour postprandial period and whether the ethanol extract of betel nut could induce GLUT4 translocation in skeletal muscle cells of mice induced hyperglycemia. Glucose tolerance test results showed that treatment of the ethanol extract of betel nut for 24 days with all doses tested: P50,100,150,200 and 250 mg/kg body weight could improve glucose tolerance in a two-hour postprandial period. The protein electrophoresis of that fasting and one hour postprandial state treatments resulted an increase in GLUT4/ β Actin density ratio of P250 group compared to negative and positive controls. In this case, GLUT4/ β Actin density ratio of P100,P200 and P250 were higher than that GLUT4/ β Actin density ratio of P50 and P150. Increased in GLUT4/ β Actin density ratio showed enhancement of the GLUT4 in skeletal muscle cells in fasting and one hour postprandial state after treated with ethanol extract of betel nut.

Key words: Hyperglycemia, Betel nut, *Areca catechu*, GLUT4.

PENDAHULUAN

Secara normal, glukosa merupakan substrat dan sumber energi yang akan dikonversi menjadi ATP melalui proses glikolisis, siklus krebs dan fosforilasi oksidatif di dalam mitokondria. Namun ketika glukosa berlebihan di dalam sel, senyawa ini dapat bersifat toksik yang menginduksi stress oksidatif sehingga menimbulkan kerusakan sel, jaringan bahkan organ. Kelebihan glukosa ini dikenal dengan hiperqlikemia. Dalam kondisi kronis, hiperqlikemia dapat mengakibatkan penyakit diabetes. Kondisi hiperqlikemia didiagnosis ketika konsentrasi glukosa plasma dalam keadaan puasa secara konsisten ≥ 7 mmol/l (126 mg/dl) atau ketika konsentrasi glukosa plasma setelah 2 jam mengkonsumsi 75gr glukosa secara konsisten $\geq 11,1$ mmol/l (200 mg/dl) (Brownlee 2005; Giugliano *et al.* 2008).

Diabetes kini dianggap sebuah epidemik, dengan populasi penderita diperkirakan meningkat hingga

380 juta pada tahun 2025 dan mencapai 429 juta pada tahun 2030 bahkan hingga 642 juta pada tahun 2040 (Tarr *et al.* 2013; Wild *et al.* 2004; IDF 2015). *International Diabetes Federation* (IDF) melaporkan Indonesia berada di urutan ketujuh negara dengan jumlah penderita diabetes tertinggi pada tahun 2015. Jumlah penderita diabetes Indonesia diperkirakan akan mencapai 16,2 juta pada tahun 2040 (IDF 2015).

Secara tragis, diabetes dapat mengakibatkan 4,9 juta kematian per tahun (IDF 2015). Hal ini disebabkan komplikasi diabetik meliputi neuropati, disfungsi erektil, nefropati, retinopati, makroangiopati seperti penyakit kardiovaskuler, stroke dan kaki diabetik (King *et al.* 2016; Ramesh *et al.* 2015; Mansour *et al.* 2014; Djrolo *et al.* 2014). Diabetes bahkan dapat dikaitkan dengan peningkatan mortalitas akibat timbulnya beberapa kanker seperti kanker payudara, kanker usus buntu (*colorectal cancer*) dan kanker prostat (Spangler & Kirk 2014).

Diabetes atau hiperqlikemia kronis ini dapat dipicu adanya abnormalitas dalam metabolisme glukosa terkait defisiensi insulin. Abnormalitas metabolisme glukosa selanjutnya akan menginduksi pembentukan

*Penulis korespondensi : +62-22-251 1575
E-mail: ridwan@sith.itb.ac.id

sitokin inflamasi dan peningkatan ROS di dalam tubuh. Sitokin inflamasi dan peningkatan ROS terinduksi hiperglikemia memiliki peran penting terhadap perkembangan resistensi insulin pada otot rangka dan menyebabkan gangguan pada pengangkutan glukosa lebih dari 75% di dalam tubuh melalui peningkatan proses fosforilasi serin/treonin pada IRS dan PI3K dalam jalur aktivasi protein pengangkut glukosa terutama protein GLUT4 (*Glucose transporter type 4*) (Wei *et al.* 2008; King *et al.* 2016). GLUT4 adalah protein 12 – transmembran yang membantu perpindahan glukosa darah perifer ke dalam sel melewati membran plasma. Pengangkutan glukosa dimediasi GLUT4 ini melibatkan aktivasi jalur PI3K terutama dalam sel-sel otot rangka. Jalur PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*) merupakan jalur penting dalam memediasi efek metabolik insulin. PI3K menstimulasi konversi PIP2 menjadi PIP3, meningkatkan aktivasi AKT melalui fosforilasi serin dan treonin. AKT tidak hanya berperan penting dalam proses pengambilan glukosa oleh jaringan-jaringan target insulin melalui translokasi GLUT4, tetapi juga menstimulasi proliferasi sel-sel β di dalam pankreas. Secara tidak langsung, peningkatan translokasi GLUT4 dapat menurunkan hiperglikemia dan menginduksi normoglikemia (Khorami *et al.* 2015; Elghazi *et al.* 2007).

Berdasarkan hasil review dari berbagai penelitian, dilaporkan bahwa *Areca catechu* atau pinang merupakan tanaman antidiabetik yang dapat menurunkan hiperglikemia (Mannan *et al.* 2014; Govindappa 2015).

Pinang merupakan tanaman herbal yang sering dimanfaatkan masyarakat Aceh untuk pengobatan tradisional. Pinang dilaporkan mengandung senyawa alkaloid arekolin yang memiliki aktivitas antihiperglikemik. Arekolin dapat masuk ke dalam sel-sel otot rangka dengan berikatan pada PAT-1 (*proton-coupled amino acid transporter-1*) (Voigt *et al.* 2013; Jensen *et al.* 2014). Selanjutnya, senyawa alkaloid arekolin mampu menginduksi pengambilan 2-deoksiglukosa dalam *L6 myotube* melalui peningkatan ekspresi GLUT4 dan gen-gen yang terlibat dalam jalur PI3K terkait proses translokasi GLUT4 (Prabhakar & Doble 2011).

Polifenol seperti epicatechin dan asam siringat dalam ekstrak etanol biji pinang juga memiliki aktivitas antioksidan (Zhang *et al.* 2014). Senyawa ini dibuktikan mampu menginduksi ekspresi protein GLUT4 pada membran sel otot rangka (Pradini 2010). Senyawa lain yang dijumpai melimpah di dalam pinang adalah golongan hidrokarbon alkana (hexadekana dan heptadekana) dapat menghambat kerja aldosa reduktase melalui pengikatan energi yang besar sehingga enzim tersebut tidak dapat mengikat energi untuk aktivitasnya dalam jalur poliol dan ROS tidak terbentuk (Aleykutty 2012).

Namun, hingga saat ini penelitian mengenai efektivitas pinang terhadap diabetes masih belum

banyak dilakukan di Indonesia. Oleh karena itu, penelitian ini penting dilakukan untuk melihat efek pemberian ekstrak etanol biji pinang terhadap translokasi GLUT4 pada keadaan hiperglikemia sehingga dapat memperkuat informasi mengenai khasiat biji pinang.

BAHAN DAN METODE

Sampel. Biji pinang diperoleh dari Apotik Bunda Langsa Aceh, sedangkan mencit-mencit yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini diperoleh dari rumah pemeliharaan hewan SITH ITB dengan mengikuti sidang etik sebelumnya.

Metode Penelitian meliputi :

Ekstraksi dan Analisis Fitokimia. Biji pinang kering 500 g dihaluskan, dimaserasi dengan pelarut etanol 96% selama 3 x 24 jam. Kemudian maserat difiltrasi, dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C untuk diperoleh ekstrak kental. Ekstrak ini dipanaskan di atas penangas air (*waterbath*) hingga pelarut menguap sempurna lalu digerus menjadi bubuk. Hasil ekstraksi dalam bentuk ekstrak kasar ini dilarutkan dalam etanol dan diidentifikasi senyawa - senyawa penyusunnya menggunakan uji GC-MS (*gas chromatography – mass spectrometry*) di Laboratorium AKA Bogor.

Penentuan Dosis Berdasarkan Toksisitas Akut Biji Pinang (LD50). Penentuan dosis yang aman diaplikasikan kepada hewan model didasari oleh penelitian yang telah dilakukan sebelumnya. Sa'roni & Adjirni (2005) melaporkan bahwa toksisitas akut (LD50) biji pinang terhadap mencit adalah 4,14 (3,13 – 5,18) mg/10 g BB atau 414 (313 – 518) mg/kg BB, sedangkan Pichini *et al.* (2010) menetapkan bahwa penginjeksian ekstrak alkoholik anhidrat biji pinang dengan dosis 0,5, 1 dan 3g/kg secara oral pada mencit hanya menunjukkan toksisitas akut yang kecil meskipun dapat menimbulkan reflek kornea, ataksia dan peningkatan ritme pernapasan namun penginjeksian oral ekstrak alkoholik anhidrat dengan dosis 100 mg/kg secara kronis selama tiga bulan menyebabkan peningkatan mortalitas. Berdasarkan nilai toksisitas akut ini, dosis yang aman digunakan terhadap mencit adalah kurang dari 313 – 518 mg/kg BB yaitu 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB, 150 mg/kg BB, 200 mg/kg BB dan 250 mg/kg BB.

Persiapan Hewan Model. Hewan model dalam penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus L*) galur Swiss Webster yang telah diadaptasikan dengan kondisi kandang selama 7 hari, dipelihara pada suhu 24 – 29°C dan diberi pakan standar sebanyak 10% BB dan air minum. Beberapa mencit diinduksi hiperglikemia dengan menginjeksikan streptozotisin *single dose*

dengan dosis 150 mg/kg BB secara intraperitoneal selama 15 hari. Mencit–mencit yang memiliki kadar glukosa >200 mg/dl digunakan sebagai hewan model hiperglikemia.

Pengaruh Ekstrak Etanol Biji Pinang pada Toleransi Glukosa Hewan Model. Mencit - mencit dikelompokkan menjadi 8 kelompok antara lain: kontrol normal (kelompok mencit normal yang diberikan akuabides), kontrol positif (kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan metformin), kontrol negatif (kelompok mencit hiperglikemia tanpa diberikan ekstrak etanol biji pinang) dan lima kelompok perlakuan (kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan ekstrak etanol biji pinang pada dosis yang berbeda) : P50 (diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 50 mg/kg BB), P100 (diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 100 mg/kg BB), P150 (diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 150 mg/kg BB), P200 (diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 200 mg/kg BB) dan P250 (diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 250 mg/kg BB). Kedelapan kelompok mencit diberi perlakuan ekstrak etanol dari biji pinang selama 24 hari secara *oral gavage*. Setelah 24 hari dilakukan pemeriksaan terhadap kadar glukosa darah dalam keadaan puasa, satu jam dan dua jam setelah penginjeksian glukosa oral (*postprandial*) untuk menguji toleransi glukosa dan densitas protein β aktin serta GLUT4.

Pengaruh Ekstrak Etanol Biji Pinang terhadap Densitas Protein Transporter Glukosa GLUT4 pada Sel Otot Hewan Model. Pengukuran densitas protein β aktin dan transporter glukosa GLUT4 dalam penelitian ini mengikuti metode yang dilakukan oleh Thamocharan *et al.* (2003) dan Pradini (2010).

Isolasi protein GLUT4. Mencit-mencit pada tiap kelompok penelitian dikelompokkan menjadi dua subkelompok untuk di-*euthanasia* dalam chamber CO₂ 100%, yaitu subkelompok yang di-*euthanasia* dalam keadaan puasa dan subkelompok yang di-*euthanasia* dalam keadaan setelah 1 jam pemberian glukosa oral. Otot-otot pada setiap subkelompok mencit diisolasi dari bagian paha (*regio femoralis*), disimpan dalam tabung *cryotube* untuk dibekukan dalam nitrogen cair pada suhu -190°C. Otot-otot dari subkelompok yang sama dipindahkan ke dalam mortar berdiameter 8 cm terisi 15 ml *buffer* sukrosa yang terdiri dari 250mM sukrosa; 20mM HEPES; 1mM EDTA; 100 μ M PMSF dan 7,5mM Tris. Segera setelah otot dipipihkan dan *buffer* sukrosa dibuang, nitrogen cair dituangkan ke dalam mortar untuk menghancurkan jaringan otot. Otot yang telah halus dilarutkan dalam 30 ml *buffer* sukrosa dan selanjutnya dipindahkan ke dalam tabung

sentrifugasi 40 ml (*Sorval* 40 ml). Suspensi dikocok terlebih dahulu supaya homogen sebelum disentrifugasi menggunakan *Superspeed Centrifuge* (*Sorval RC-5B plus*) dengan kecepatan 3000g pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipisahkan untuk kuantifikasi konsentrasi protein total dan deteksi protein β -aktin.

Pelet yang terbentuk dicuci sebanyak dua kali dengan 30 ml Tris-HCl pH 8,0 dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000g pada suhu 4°C selama 10 menit. Pelet dari hasil sentrifugasi ini dilarutkan dengan 15 ml Tris-HCl pH 8,0 lalu dihomogenisasi menggunakan *teflon homogenizer*. Suspensi dipindahkan ke dalam *beaker glass* 40 ml dan ditutup dengan aluminium foil dibiarkan selama \pm 16 jam pada suhu 4°C. Homogenat ditambahkan dengan 200 μ l LiBr 50 mM/10 ml suspensi, lalu diaduk menggunakan *plate stirrer* selama 2,5 jam pada suhu 4°C. Homogenat ini kemudian dipindahkan ke tabung sentrifugasi dan ditambahkan dengan 15 ml Tris-HCl pH 8,0. Setelah dihomogenkan, suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 10000g pada suhu 4°C selama 10 menit. Pelet hasil sentrifugasi dihomogenisasi menggunakan *teflon homogenizer* dan diresuspensi dengan 15 ml Tris-HCl pH 8,0. Suspensi disentrifugasi kembali dengan kecepatan 6000g pada suhu 4°C selama 10 menit. Pelet yang terbentuk dihomogenisasi dan diresuspensi dengan 15 ml KBr 25% B/V, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10000g pada suhu 4°C selama 30 menit. Pelet dari hasil proses ini dicuci satu kali dengan 10 ml *buffer* sukrosa dan disentrifugasi dengan kecepatan 17000g pada suhu 4°C selama 20 menit. Hasil akhir pelet dipindahkan ke dalam tabung eppendorf dan disuspensi dengan 100 μ l *buffer* sukrosa. Suspensi disonikasi selama siklus 2x50 detik lalu disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10000g pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipisahkan untuk kuantifikasi konsentrasi protein total dan deteksi protein GLUT4.

Dalam penelitian ini, konsentrasi protein total dikuantifikasi menggunakan metode *Bradford* dan deteksi protein β aktin serta GLUT4 menggunakan elektroforesis kemudian densitas pita kedua protein dikuantifikasi melalui *software ImageJ*. Selanjutnya nilai densitas pita GLUT4 dibandingkan dengan nilai densitas pita β aktin pada setiap kelompok untuk diperoleh rasio densitas GLUT4/ β aktin (Pradini 2010).

Elektroforesis dan pewarnaan protein. Sampel protein sebanyak \pm 8 μ g dicampur larutan *buffer* sampel dengan rasio 1:1, lalu didenaturasi dalam penangas air (*waterbath*) pada suhu 95°C selama 5 menit. Sampel protein kemudian dimasukkan dalam sumur gel elektroforesis poliakrilamid 10%. Elektroforesis dilakukan dalam aparatus elektroforesis yang mengandung *running buffer* dengan tegangan 100 volt hingga sampel protein yang terwarnai *commasie brilliant*

blue mencapai batas *stacking gel* dan *separating gel*. Tegangan lalu ditingkatkan menjadi 120 volt hingga penanda warna *commasie brilliant blue* mencapai batas bawah gel. Protein-protein yang terfraksinasi pada gel elektroforesis diwarnai dengan larutan *staining* selama 2 jam, kemudian diganti dengan larutan *destaining* selama 8 jam sampai tampak pita-pita protein.

Deteksi protein GLUT4. Protein GLUT4 dapat diestimasi berdasarkan berat molekul pita protein yang diperoleh pada gel elektroforesis. Protein GLUT4 memiliki berat molekul antara 50-63 kDa sedangkan protein β -aktin memiliki berat molekul 42 kDa (Pradini 2010).

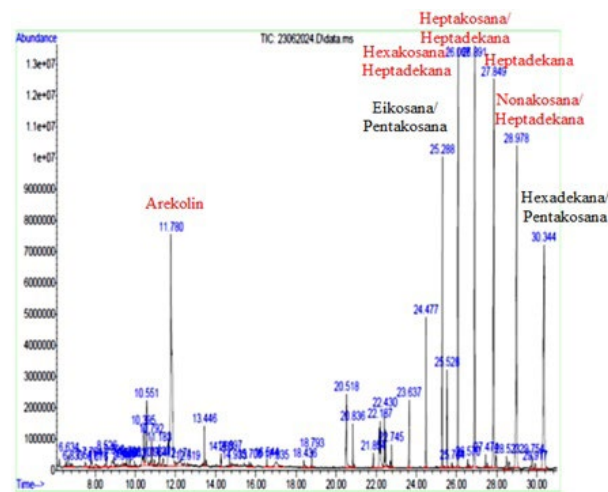
Analisis Statistika. Hasil pengukuran tes toleransi glukosa dalam keadaan puasa, 1 jam dan 2 jam *postprandial* dianalisis menggunakan Uji ANOVA ($p < 0,05$) dan dilanjutkan dengan uji Duncan ($p < 0,05$) untuk mengetahui signifikansi perbedaan rata-rata dengan tingkat kepercayaan 95%. Analisis data ini menggunakan software SPSS 17.0.

HASIL

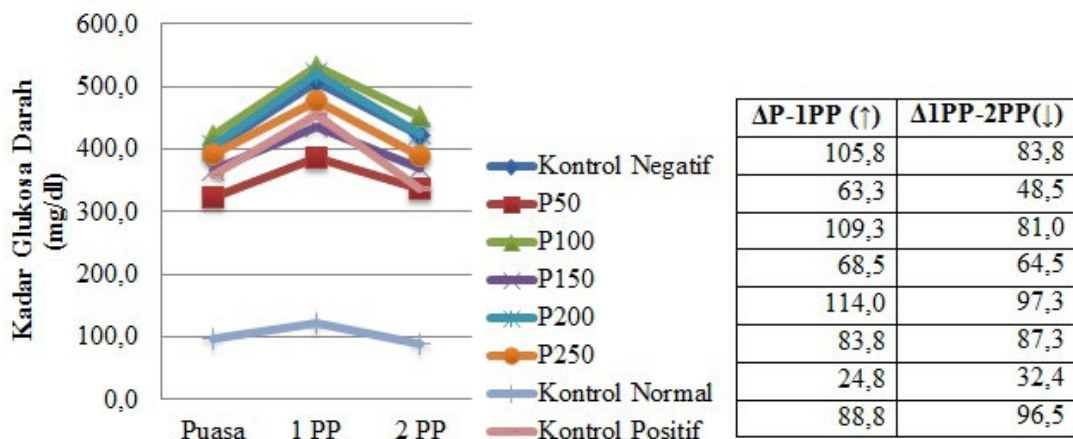
Ekstraksi dan Analisis Fitokimia Ekstrak Etanol Biji Pinang. Hasil analisis fitokimia menunjukkan bahwa keberadaan senyawa arekolin di dalam ekstrak etanol biji pinang terdeteksi pada waktu retensi menit ke 11.780 dengan kelimpahan sebanyak 7.447.753 atau 12,904% dari total keseluruhan senyawa yang terdeteksi dan senyawa golongan hidrokarbon heptadekana pada menit ke 26.067-28.978 dengan kelimpahan sebanyak 10.345.360-13.513.877 atau 9,602% - 11,956% dari total keseluruhan senyawa yang terdeteksi (Gambar 1).

Pengaruh Ekstrak Etanol Biji Pinang pada Toleransi Glukosa Hewan Model. Pemberian ekstrak etanol biji pinang selama 24 hari diketahui dapat memperbaiki toleransi glukosa pada mencit yang

diinduksi hiperglikemia. Efektivitas ekstrak etanol biji pinang dibuktikan dengan penurunan kadar glukosa darah pada kondisi dua jam *postprandial* meskipun masih melebihi level glikemia normal yaitu 350 - 450 mg/dl. Akan tetapi, kadar glukosa darah tersebut lebih rendah dibandingkan kadar glukosa darah satu jam sebelumnya antara 400-500 mg/dl. Hasil uji F Anova dan uji Duncan menunjukkan bahwa kadar glukosa darah antar kelompok mencit hiperglikemia baik yang diberi maupun tidak diberi ekstrak etanol biji pinang memiliki perbedaan yang signifikan pada kondisi satu jam dan dua jam *postprandial* ($P < 0,05$). Berdasarkan hasil tes toleransi glukosa, penurunan kadar glukosa darah yang lebih baik terjadi pada kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 200 dan 250 mg/kg BB (Gambar 2). Dalam hal ini, efek antihiperglikemik diinduksi oleh arekolin dan heptadekana, melalui penurunan stres oksidatif dan peningkatan keberadaan GLUT4 pada sel-sel otot rangka.



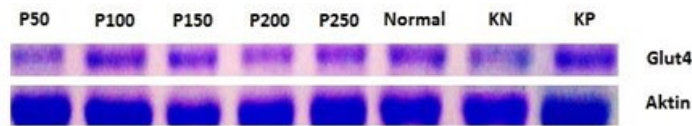
Gambar 1. Hasil GC-MS ekstrak etanol biji pinang



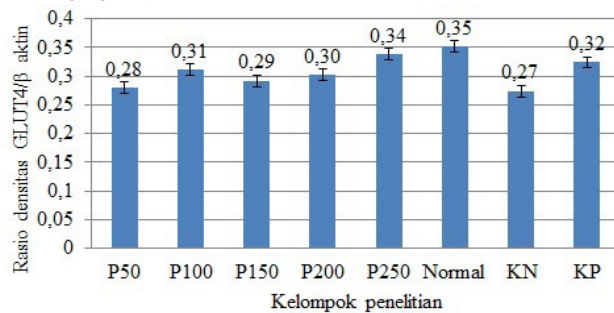
Gambar 2. Tes toleransi glukosa tiap kelompok hewan uji yang diberi perlakuan ekstrak etanol berbagai konsentrasi. (Kontrol negatif: kelompok mencit hiperglikemia tanpa pemberian ekstrak etanol biji pinang; kontrol positif: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan metformin (obat antidiabetes); P50: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 50 mg/kg BB; P100: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 100 mg/kg BB; P150: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 150 mg/kg BB; P200: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 200 mg/kg BB; P250: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 250 mg/kg BB; PP: Post prandial (setelah pemberian glukosa oral)

Pengaruh Ekstrak Etanol Biji Pinang terhadap Densitas Protein Transporter Glukosa GLUT4. Efektivitas ekstrak etanol biji pinang untuk meregulasi pengambilan glukosa ke dalam sel-sel otot melalui proses translokasi GLUT4 dapat pula diamati dari densitas GLUT4 baik dalam keadaan puasa (Gambar 3 dan Gambar 4) maupun 1 jam *postprandial* (Gambar 5 dan Gambar 6). Hasil kuantifikasi densitas protein tiap kelompok penelitian ini menjelaskan adanya kecenderungan semakin tinggi dosis ekstrak etanol biji pinang yang diberikan maka semakin meningkat pula densitas GLUT4 dalam sel-sel otot.

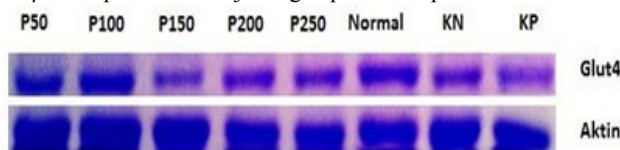
Meskipun ekstrak etanol biji pinang memiliki efektivitas yang rendah dalam menginduksi pengambilan glukosa, namun rasio densitas GLUT4/ β aktin pada kelompok P100, P200 dan P250 diperoleh lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan yang lain, bahkan kelompok P250 memiliki rasio densitas GLUT4/ β aktin yang lebih tinggi dibandingkan kontrol negatif dan kontrol positif baik dalam keadaan puasa maupun 1 jam *postprandial* (Gambar 4 dan Gambar 6). Meskipun densitas GLUT4 pada kelompok P250 lebih tinggi daripada kelompok kontrol negatif dan kontrol positif, tetapi GLUT4 tersebut diduga tidak fungsional disebabkan sekresi insulin berkurang akibat kerusakan pankreas terkait injeksi streptozotosin dan stres oksidatif.



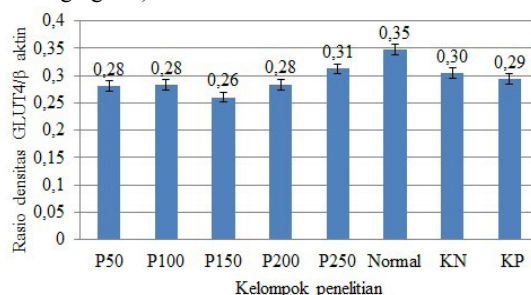
Gambar 3. Densitas protein GLUT4 (50kDa) pada hewan uji dengan perlakuan puasa. Protein aktin digunakan sebagai kontrol. (Kontrol negatif: kelompok mencit hiperglikemia tanpa pemberian ekstrak etanol biji pinang; kontrol positif: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan metformin (obat antidiabetes); P50: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 50 mg/kg BB; P100: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 100 mg/kg BB; P150: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 150 mg/kg BB; P200: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 200 mg/kg BB, P250: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 250 mg/kg BB).



Gambar 4. Rasio densitas GLUT4/ β aktin pada hewan uji dengan perlakuan puasa



Gambar 5. Densitas protein GLUT4 (50kDa) pada hewan uji dengan perlakuan satu jam *postprandial*. Protein aktin digunakan sebagai kontrol. (Kontrol negatif: kelompok mencit hiperglikemia tanpa pemberian ekstrak etanol biji pinang; kontrol positif: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan metformin (obat antidiabetes); P50: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 50 mg/kg BB; P100: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 100 mg/kg BB; P150: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 150 mg/kg BB; P200: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 200 mg/kg BB, P250: kelompok mencit hiperglikemia yang diberikan ekstrak etanol biji pinang dengan dosis 250 mg/kg BB).

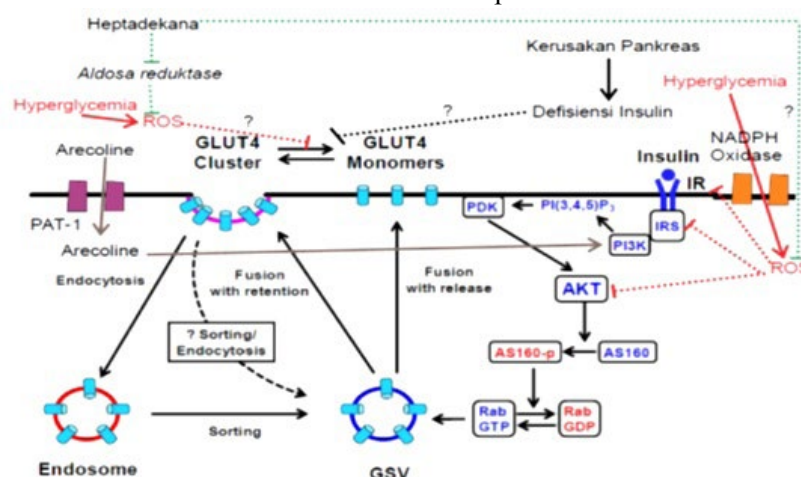


Gambar 6. Rasio densitas GLUT4/ β aktin pada hewan uji dengan perlakuan satu jam *postprandial*

PEMBAHASAN

Peningkatan glukosa darah dapat disebabkan adanya defisiensi insulin akibat kerusakan pankreas. Eleazu *et al.* (2013) menyatakan bahwa streptozotocin mampu menimbulkan kerusakan pankreas secara selektif dengan menghambat aktivitas glikosida hidrolase O-GlcNAcase sehingga menyebabkan glikosilasi pada protein intraseluler dan menginduksi apoptosis sel beta. Hasil pemeriksaan glukosa darah yang diperoleh dalam penelitian ini berbeda dengan hasil yang diperoleh Anthikat *et al.* (2014). Anthikat *et al.* (2014) membuktikan bahwa ekstrak biji pinang dengan dosis 250 mg/kg BB dan 500 mg/kg BB dapat menurunkan kadar glukosa darah setelah dua jam pemberian pada tikus hiperglikemia yang dipuaskan terlebih dahulu. Berbeda dengan penelitian tersebut, pada penelitian ini efek antihiperglikemia ekstrak etanol biji pinang terhadap mencit hiperglikemia diteliti dengan melihat toleransi mencit hiperglikemia terhadap glukosa setelah pemberian ekstrak etanol biji pinang selama 24 hari. Hasil tes toleransi glukosa pada penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol biji pinang selama 24 hari dengan dosis 50, 100, 150, 200 dan 250 mg/kg BB berperan memperbaiki toleransi glukosa pada periode dua jam *postprandial* terutama dosis 200 dan 250 mg/kg BB. Dapat diduga bahwa ekstrak etanol biji pinang mampu menginduksi homeostatik intrinsik terhadap kadar glukosa darah meskipun masih berada di atas level glikemia normal yang disebabkan level toksisitas glukosa yang sangat tinggi terkait kondisi hiperglikemia. Selain itu, ekstrak etanol biji pinang dapat berperan dalam meningkatkan translokasi GLUT4 pada sel-sel otot rangka mencit yang diinduksi menjadi hiperglikemia melalui peningkatan jalur PI3K (Prabhakar & Doble 2011) meskipun efektivitasnya rendah dalam menginduksi pengambilan glukosa. Peningkatan rasio densitas GLUT4/ β aktin diduga disebabkan kandungan arekolin dalam ekstrak etanol biji pinang yang mampu menginduksi translokasi GLUT4.

Selain arekolin, senyawa hexadekana dan heptadekana dalam ekstrak juga diduga dapat menghambat pembentukan ROS sehingga translokasi GLUT4 pada sel-sel otot rangka dapat terjadi. Aleykutty (2012) melaporkan bahwa senyawa hexadekana dan heptadekana dapat menghambat aktivitas enzim *aldosa reduktase* yang secara tidak langsung mengurangi antioksidan intraseluler dalam jalur poliol, melalui pengikatan energi dalam jumlah besar sehingga enzim tersebut tidak dapat melakukan aktivitas dan pembentukan ROS di dalam sel dapat tereduksi. Ketika stres oksidatif intraseluler berkurang, jalur-jalur yang berkontribusi dalam proses translokasi GLUT4 terutama jalur PI3K dapat berjalan dengan baik. Senyawa arekolin dalam pinang telah dibuktikan mampu menginduksi pengambilan 2-deoksiglukosa dalam *L6 myotube* melalui peningkatan ekspresi GLUT4 dan gen-gen yang terlibat dalam jalur PI3K untuk proses translokasi GLUT4 tanpa penambahan insulin (Prabhakar & Doble 2011). Pada penelitian ini diduga translokasi GLUT4 distimulasi oleh arekolin melalui jalur tidak tergantung insulin sehingga dapat meningkatkan keberadaan GLUT4 pada membran plasma sel-sel otot rangka. Peningkatan keberadaan GLUT4 pada membran plasma ini menginduksi pengambilan glukosa oleh sel-sel otot rangka mencit hiperglikemia yang diberi perlakuan ekstrak etanol biji pinang. Hal ini dibuktikan dengan adanya penurunan kadar glukosa darah dalam dua jam *postprandial* berdasarkan hasil tes toleransi glukosa meskipun kadar glukosa darah masih berada pada level yang tinggi. Meskipun arekolin diduga mampu menginduksi pengambilan glukosa melalui jalur PI3K tidak tergantung insulin, namun keberadaan insulin diduga mempengaruhi aktivitas GLUT4 secara fungsional sehingga berkurangnya sekresi insulin akibat kerusakan pankreas dapat menyebabkan pengambilan glukosa oleh GLUT4 tidak optimal dan keadaan hiperglikemia masih tetap terjadi (Damasceno *et al.* 2014) (Gambar 7). Hasil penelitian ini memberikan informasi bahwa ekstrak etanol biji pinang diduga kuat bersifat mampu mempertahankan homeostatis kadar glukosa darah melalui peningkatan translokasi GLUT4 meskipun masih berada dalam keadaan hiperglikemia.



Gambar 7. Peranan arekolin dan heptadekana dalam translokasi GLUT4 (Modifikasi Prabhakar & Doble 2011; Aleykutty 2012; Yang 2010)

Penelitian berikutnya mengenai kuantitas insulin endogen yang disekresikan selama periode satu jam dan dua jam *postprandial* serta mekanisme aksi dari senyawa-senyawa dalam ekstrak etanol biji pinang dapat memberikan informasi tambahan tentang peran insulin terhadap fungsional GLUT4 dalam pengambilan glukosa dan peran senyawa-senyawa dalam ekstrak etanol biji pinang terhadap peningkatan translokasi GLUT4 terkait jalur PI3K.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol biji pinang dapat berperan dalam meningkatkan densitas GLUT4 pada sel-sel otot rangka mencit yang diinduksi menjadi hiperglikemia dalam kondisi puasa dan satu jam *postprandial* dan dapat memperbaiki toleransi glukosa dalam kondisi dua jam *postprandial* meskipun kadar glukosa darah tetap berada di atas level glikemia normal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas Beasiswa Tesis Disertasi yang diberikan oleh LPDP Tahun 2016 dan SITHITB serta semua pihak yang terkait.

DAFTAR PUSTAKA

- Aleykutty NA. 2012. Docking studies on identified constituents of *Helicteres isora* as antidiabetic agents. *International Journal of Computer Applications* 45(20).
- Anthikat RRN, Michael A, Vageesh S, Balamurugan R, Ignacimuthu S. 2014. The effect of *Areca catechu*. L. extract on streptozotocin induced hyperglycaemia in Wistar rats. *Int J Pharm Bio Sci* 5:316-321.
- Brownlee M. 2005. The pathobiology of diabetic complications a unifying mechanism. *Diabetes* 54(6):1615-1625.
- Damasceno DC, Netto AO, Iessi IL, Gallego FQ, Corvino, SB, Dallaqua B, Sinzato YK, Bueno A, Calderon IDMP, Rudge MVC. 2014. Streptozotocin-induced diabetes models: pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. *BioMed research international* 2014.
- Djrolo F, Paraíso NM, Diarra O, Makoutode M. 2014. Diabetes complications and associated factors in type 2 diabetic patients in Cotonou. *Journal of Diabetes Mellitus* 4(04):311.
- Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN. 2013. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of Diabetes & Metabolic disorders* 12:60.
- Elghazi L, Rachdi L, Weiss AJ, Cras-Méneur C, Bernal-Mizrachi E. 2007. Regulation of β -cell mass and function by the Akt/protein kinase B signalling pathway. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 9(s2):147-157.
- Giugliano D, Ceriello A, Esposito K. 2008. Glucose metabolism and hyperglycemia. *The American journal of clinical nutrition* 87(1):217S-222S.
- Govindappa M. 2015. A review on role of plant (s) extracts and its phytochemicals for the management of diabetes. *Journal of Diabetes & Metabolism* 2015.
- International Diabetes Federation. 2015. IDF Diabetes Atlas. Brussels: International Diabetes Federation.
- Jensen A, Figueiredo-Larsen M, Holm R, Broberg ML, Brodin B, Nielsen CU. 2014. PAT1 (SLC36A1) shows nuclear localization and affects growth of smooth muscle cells from rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 306(1): E65-E74.
- Khorami SAH, Movahedi ARIYO, Khaza'ai HUZWAH, Mutalib A, Sokhini MOHD. 2015. PI3K/AKT pathway in modulating glucose homeostasis and its alteration in diabetes. *AMBS* 1:46-55.
- King GL, Park K, Li Q. 2016. Selective insulin resistance and the development of cardiovascular diseases in diabetes: The 2015 Edwin Bierman award lecture. *Diabetes* 65(6):1462-1471.
- Mannan A, Rupa BA, Azam NK, Ahmed N, Hasan N. 2014. A quick review on anti-diabetic plants and action of phytochemicals. *Inter J Adv Res* 2:227.
- Mansour M, Salam RF, Rashed L, Salam H. 2014. Role of toll receptors in diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes Mellitus* 2014.
- Pichini S, Marchei E, Palmi I, Pellegrini M, Calapai G, Oteri A, Caveo V, Caputi AP, Klein J. 2010. Smart drugs – English edition. Roma: Istituto Superiore di Sanità.
- Prabhakar PK & Doble M. 2011. Interaction of phytochemicals with hypoglycemic drugs on glucose uptake in L6 myotubes. *Phytomedicine* 18(4):285-291.
- Pradini A. 2010. The role of polyphenol on the presence of GLUT4 in skeletal muscle plasma membrane of diabetic-induced mice [Thesis]. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Ramesh R, AdhishwarKumaran N, KuzhandaiVelu V, Reeta R, SathishBabu M, Niranjana G. 2015. Association between hepato-biliary status and HbA1C in type 2 diabetes mellitus with coronary artery disease (CAD). *Journal of Diabetes Mellitus* 5(02):67.
- Sa'roni SR & Adjirmi A. 2005. Spesifikasi simplisia dan ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L) asal Tawangmangu serta toksisitas akut dan khasiat hemostatiknya pada hewan coba. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan* 15(1 Mar).
- Spangler JG & Kirk J. 2014. Correlation between diabetes prevalence and subsequent cancer mortality in North Carolina counties. *Journal of Diabetes Mellitus* 2014.
- Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. 2013. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *ISRN ophthalmology* 2013.
- Thamotharan M, McKnight RA, Thamotharan S, Kao DJ, Devaskar SU. 2003. Aberrant insulin-induced GLUT4 translocation predicts glucose intolerance in the offspring of a diabetic mother. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 284(5):E901-E914.
- Voigt V, Laug L, Zebisch K, Thondorf I, Markwardt F, Brandsch M. 2013. Transport of the areca nut alkaloid arecaidine by the human proton-coupled amino acid transporter 1 (hPAT1). *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 65(4):582-590.
- Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, Stump CS, Ibdah JA, Sowers JR. 2008. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294(3):R673-R680.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. 2004. Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care* 27(5):1047-1053.
- Yang J. 2010. Role of clusters in insulin-regulated GLUT4 trafficking in adipose cells: A new paradigm?. *International journal of biological sciences* 6(7):716.
- Zhang WM, Huang WY, Chen WX, Han L, Zhang HD. 2014. Optimization of extraction conditions of areca seed polyphenols and evaluation of their antioxidant activities. *Molecules* 19(10):16416-16427.