

THE EFFECT OF COMBINATION FROM PURIFIED EXTRACT OF SAMBILOTO HERB (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) AND PEGAGAN HERB (*Centella asiatica* (L.) Urban) OF TRANSLOCATION OF GLUT-4 PROTEIN IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS-INSULIN RESISTANCE RATS

PENGARUH KOMBINASI EKSTRAK TERPURIFIKASI HERBA SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) DAN HERBA PEGAGAN (*Centella asiatica* (L.) Urban) TERHADAP TRANSLOKASI PROTEIN GLUT-4 PADA TIKUS DIABETES MELLITUS TIPE 2 RESISTEN INSULIN

Novena Yety Lindawati¹, Agung Endro Nugroho^{2*}) and Suwidjiyo Pramono²

¹Akademi Farmasi Nasional Surakarta, Jl. Yos Sudarso 338 Serengan Surakarta

²Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Skip Utara 55281

ABSTRACT

Sambiloto herb (Andrographis paniculata (Burm. f.) Nees.) and pegagan herb (Centella asiatica (L.) Urban) are excellent medicinal plants which are being developed as traditional for antidiabetic. The research aims to see the effect of combination from purified extract of sambiloto herb and pegagan herb of translocation of GLUT-4 protein in model type 2 diabetes mellitus rats-insulin resistance compared with the use of each purified extract. Test preparations were divided into 8 groups include three from combination purified extract of sambiloto herb and pegagan herb: I (912,1: 300), II (651,5: 500), III (390,9: 700) in mg/kg BW, IV (purified extract of sambiloto herb 1303 mg/kg BW), V (purified extract of pegagan herb 1000 mg/kg BW), VI (positive control metformin 45 mg/kg BW), VII (negative control CMC-Na 0.5%) and VIII (normal control). Parameters measured semi quantitative data translocation of GLUT-4 protein in cells muscles of the thigh (soleus muscle) rats using Immunohistochemistry methods. Test animals are of type 2 diabetes mellitus insulin-resistance was induced by fructose (1,8 g/kg BW) and fat-rich food (95% pellet, 5% egg yolks and 5 mL/ 200 g BW lard) for 70 days. Determination of insulin resistance used 3 parameters such as blood glucose levels, lipid levels (triglycerides, LDL, cholesterol, and HDL), and hypoglykemic tests with glibenklamid compared to normal controls animals. Insulin resistance test results using statistical analysis Independent Samples t-Test showed significant differences ($p < 0.05$) between normal rats with fat-fructose rats at day-50 and -70. This indicate fat-fructose rats indicated type 2 DM insulin resistance. Group of combination I (combination purified extract of sambiloto herb and pegagan herb (912,1: 300 mg/kg BB) showed effect of translocation of GLUT-4 protein was better than each purified extract with significantly $p < 0.05$ with oneway ANOVA.

Key words: Andrographis paniculata, Centella asiatica, GLUT-4 protein

ABSTRAK

Herba sambiloto (Andrographis paniculata (Burm. f.) Nees) dan herba pegagan (Centella asiatica (L.) Urban) merupakan tanaman obat unggulan yang sedang dikembangkan sebagai obat tradisional salah satunya sebagai antidiabetes. Penelitian bertujuan untuk melihat efek kombinasi ekstrak terpurifikasi herba sambiloto dan herba pegagan terhadap translokasi protein GLUT-4 pada tikus diabetes mellitus tipe 2 resisten dibandingkan dengan penggunaan dari masing-masing ekstrak. Dalam penelitian digunakan 8 kelompok perlakuan dimana 3 kelompok diberi kombinasi ekstrak terpurifikasi herba sambiloto dengan herba pegagan: kelompok I (912,1: 300); kelompok II (651,5 : 500); kelompok III (390,9 : 700) dalam mg/kg BB; kelompok IV (ekstrak terpurifikasi herba sambiloto 1303 mg/kg BB); kelompok V (ekstrak terpurifikasi

Corresponding author : Agung Endro Nugroho
E-mail: agungendronugroho@gmail.com

herba pegagan 1000 mg/kg BB), kelompok VI (kontrol positif metformin 45mg/kg BB), kelompok VII (kontrol negatif CMC-Na 0,5%), dan kelompok VIII (kontrol normal). Parameter yang diukur data semi kuantitatif translokasi protein GLUT 4 pada sel otot paha (*soleus muscle*) dengan metode Immunohistochemistry. Hewan uji diabetes mellitus tipe 2 resisten insulin dibuat dengan pembebanan fruktosa (1,8 g/kg BB) dan pakan kaya lemak (campuran pakan pelet 95% dan 5% kuning telur bebek serta lemak babi 5 mL/ 200 g BB) selama 70 hari. Penetapan kondisi resisten insulin hewan uji digunakan 3 parameter meliputi kadar glukosa darah, uji kadar lemak (trigliserida, LDL, kolesterol dan HDL), dan uji daya hipoglikemik glibenklamid yang dibandingkan dengan kontrol normal. Hasil uji resisten insulin dengan analisis statistik Independent Sample-t Test menunjukkan ada perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara tikus normal dengan tikus diit lemak-fruktosa pada hari ke-50 dan ke-70. Hal ini mengindikasikan tikus diit lemak-fruktosa terindikasi DM tipe 2 resisten insulin. Pengaruh kelompok I (kombinasi ekstrak terpurifikasi herba sambiloto dengan herba pegagan (912,1 : 300 mg/kg BB) terhadap translokasi protein GLUT-4 lebih baik jika dibandingkan dengan pengaruh dari masing-masing ekstrak dengan signifikan $p < 0,05$ dengan analisis oneway ANOVA.

Kata kunci: *Andrographis paniculata*, *Centella asiatica*, protein GLUT-4

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus tipe 2 resisten insulin merupakan suatu penyakit yang ditandai dengan kondisi obesitas (hiperlipidemia) mengakibatkan gangguan sinyal translokasi protein GLUT-4 pada membran sel otot menyebabkan desensitisasi jaringan otot dan lemak terhadap insulin. Kondisi ini dapat memicu hiperglikemia dan hiperinsulinemia (Choi *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2004). Kondisi resisten insulin memberikan dampak besar terhadap regulasi glukosa dalam kaitannya dengan ekspresi GLUT-4 (Lauritzen and Schetzer, 2010).

Herba sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees.) dan herba pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) merupakan tanaman obat unggulan yang sedang dikembangkan sebagai obat tradisional salah satunya sebagai antidiabetes. Kandungan andrografolid, zat aktif utama dalam herba sambiloto bertanggung jawab terhadap aktivitas farmakologi (Widyawati, 2007; Nirnanjan *et al.*, 2010) dan berkhasiat sebagai antidiabetes (Subramanian *et al.*, 2008). Triterpenoid (asiatikosida, madekasosida, dan asam asiatik) merupakan komponen utama herba pegagan yang banyak digunakan dalam pengobatan.

Kandungan andrografolid dalam herba sambiloto dapat meningkatkan penggunaan glukosa otot pada tikus diabetes melalui stimulasi transporter GLUT-4 sehingga dapat menurunkan kadar glukosa dalam plasma pada tikus. Senyawa andrografolid meningkatkan ekspresi mRNA maupun level protein GLUT-4, pembawa transport glukosa menembus sel (Yu *et al.*, 2008). Andrografolid juga merangsang GLUT-4 pada tikus DM tipe 1 yang diinduksi aloksan (Zhang *et al.*, 2009). Andrografolid dapat mengaktifkan α 1-ARs yang meningkatkan sekresi β -endorphin yang dapat merangsang opioid M-reseptor untuk mengurangi glukoneogenesis hepatic dan meningkatkan penyerapan glukosa dalam otot

soleus melalui peningkatan ekspresi GLUT 4 yang mengakibatkan penurunan glukosa plasma tikus diabetes tipe 1 yang diinduksi oleh streptozotisin (Ahmad *et al.*, 2007; Akbar, 2011).

Pada penelitian sebelumnya ekstrak terpurifikasi herba sambiloto dalam dosis 1303 mg/kg BB mampu menurunkan kadar glukosa darah preprandial tikus diabetes mellitus tipe 2 resisten insulin yang diinduksi diet lemak-fruktosa sebesar 45,76% dan postprandial sebesar 60,14% melalui peningkatan translokasi protein GLUT-4 *soleus muscle* namun belum mampu menurunkan kadar kolesterol (Nugroho *et al.*, 2012). Herba pegagan dapat mengendalikan kondisi hiperkolesterolemia dan hipertrigliseridemia sebagai komplikasi dari diabetes mellitus. Herba pegagan meningkatkan *uptake glucose* dengan meningkatkan respon reseptor insulin sehingga dapat digunakan untuk mengobati diabetes tipe 2 resisten insulin (Vohra *et al.*, 2011; Brinkhaus *et al.*, 2000).

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh kombinasi ekstrak terpurifikasi herba sambiloto dan herba pegagan terhadap translokasi protein GLUT-4 pada tikus diabetes mellitus tipe 2 resisten insulin. Kombinasi ekstrak bertujuan untuk menilai efektivitas pemberian terapi kombinasi apakah semakin baik dengan bekerja secara sinergis yang akan berefek potensiasi yaitu kedua obat saling memperkuat khasiatnya ataukah efeknya semakin berkurang dibandingkan dengan penggunaan masing-masing ekstrak. Penggunaan ekstrak terpurifikasi bertujuan untuk mendapatkan zat aktif utama (andrografolid dan asiatikosida) dalam kadar yang lebih besar dengan mengeleminasi *zat ballast* menggunakan beberapa jenis pelarut yang memiliki kepolaran yang berbeda. Parameter utama yang diukur data semi kuantitatif translokasi protein GLUT 4 pada sel otot paha (*soleus muscle*). Hewan uji diabetes mellitus tipe 2 resisten insulin dibuat dengan

pembebanan fruktosa dan pakan kaya lemak. Penetapan kondisi resisten insulin hewan uji digunakan 3 parameter meliputi kadar glukosa darah, uji kadar lemak (trigliserida, LDL, HDL, dan kolesterol), dan uji daya hipoglikemi glibenklamid.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan *Andrographis paniculata* (Burm. F) Ness, *Centella asiatica* (L.) Urban, tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar umur 1,5 bulan dengan berat badan 100-150 gram, antibodi anti GLUT-4 (IF8): sc-53566 Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA, *Starr Trek HRP Universal Detection (Trekkie Universal Link, Trekavidin-HRP, Betazoid DAB Chromogen, Betazoid DAM Substrate Buffer, dan background Sniper Biocare Medical, USA)*, reagen GOD-PAP (DiaSys), *Cholesterol Assay kit dan triglyceride assay kit* (Biovision Inc, San Fransisco, USA), glibenklamid tablet (Indofarma, Indonesia), Bahan yang digunakan sebagai kontrol positif adalah metformin p.a (E. Merck, Germany), etanol 90%, *n*-heksan teknis, akuadest, standar andrografolid p.a (Sigma Aldrich, USA; 98%), kloroform p.a, etanol p.a, methanol p.a, silika gel 60 F 254 (E. Merck, Germany), kertas saring, standar asiatikosida p.a (HPLC, Fluka, switzerland; 98,5%), *n*-butanol p.a, asam asetat p.a, fruktosa p.a (Nacalai, Japan) dan lemak babi, D-glukosa monohidrat (E. Merck, Germany), Na CMC (E. Merck, Germany), Na CMC.

Alat yang digunakan neraca analitik (Chyo jupiter C3-100 MD), alat penyari, *rotary evaporator*, alat-alat gelas, penangas air, kipas angin, corong Buchner, cawan porselen, chamber, lampu UV dan densitometer KLT, pipa kapiler kaca, ependorf, sentrifuge (STAT® S-280 R dan Kokusan® H-100BC, Tokyo), mikropipet 10 dan 50-250 µL (transferpette, Brand, England), neraca analitik elektrik (Chyo Jupiter C3-100 MD), *stopwatch*, *vortex*, *mixer*, *ultrasonic cleaner* (Brandon, Shelton), dan *spektrofotometer vitalab micro* (Merck, Darmstadt, Germany), *Surgical Suture* (Bio-Dynamic, Germany), mikrotom Leica model RM 2235, Germany; Mikroskop Olympus CX-21, Tokyo, Japan, mikroskop obtilab, Indonesia; *Slide Warmer*, USA, Oven dan inkubator Memmert, Germany, *MacBiophotonic Image J*.

Jalannya Penelitian

Ekstrak terpurifikasi herba sambiloto

Serbuk herba sambiloto 2 kg dimaserasi dengan etanol 90% (1:10) selama 7 hari, sari etanol disaring. Residu dimaserasi dengan pelarut etanol 90% (1:2) selama 24 jam. Maserat

dienapkan 2 hari selanjutnya dipekatkan hingga didapat ekstrak kental. Ekstrak kental ditambah pelarut *n*-heksan (1:10) dan divortex 5 menit diulang hingga warna hijau pada pelarut hilang. Fraksi tak larut *n*-heksan dipurifikasi kembali dengan menggunakan air panas (1:10). Fraksi tak larut air panas diuapkan hingga kering dan dilarutkan dalam alkohol 90% secukupnya, diuapkan dan dikeringkan kembali.

Ekstrak terpurifikasi herba pegagan

Herba pegagan 2 kg dimaserasi dengan etanol 90% (1:10) selama 7 hari, sari etanol disaring. Residu dimaserasi dengan pelarut etanol 90% (1:2) selama 24 jam. Maserat dienapkan 2 hari, dan selanjutnya dipekatkan hingga ekstrak kental. Ekstrak kental ditambah pelarut *n*-heksan (1:10) dan divortex 5 menit, diulang hingga warna hijau pada pelarut hilang. Fraksi tak larut *n*-heksan ini yang dinamakan ekstrak terpurifikasi herba pegagan.

Standarisasi ekstrak terpurifikasi herba sambiloto dan herba pegagan meliputi pemeriksaan organoleptis, uji susut pengeringan, uji kualitatif dengan KLT, dan uji kuantitatif menggunakan KLT-Densimetri dengan standar andrografolid dan asiatikosida.

Rancangan Penelitian

Hewan uji dikelompokkan menjadi dua kategori yaitu kelompok tikus normal dan kelompok tikus yang dikondisikan resisten insulin dengan diberi fruktosa sebanyak 1,8 g/kg tikus dan pakan kaya lemak yang terdiri dari campuran pakan pelet 95% dan kuning telur bebek 5% serta lemak babi 5 ml/ 200 g BB, yang diberikan selama 70 hari (tikus diit lemak-fruktosa) (Zavaroni, 1980; Nugroho *et al.*, 2012). Dilakukan pemantauan pakan dan berat badan secara periodik. Penetapan kondisi DM tipe 2 resisten insulin dengan melihat beberapa parameter, yaitu: uji kadar glukosa darah preprandial dan postprandial (2 jam setelah pemberian glukosa 1,75 g/kg BB), uji kadar trigliserida, LDL, HDL, dan kolesterol pada hari ke-0, 20, 50, dan 70 dari serum yang diambil dari darah tikus (dipuaskan selama 8-10 jam) melalui vena mata kemudian disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm, serta uji aktivitas hipoglikemik dari glibenklamid (10 mg/kg BB) menggunakan metode kolorimetri.

Tikus diit lemak-fruktosa (resisten insulin) dan tikus normal (non resisten insulin) dikelompokkan menjadi 8 kelompok: kelompok I : kombinasi ekstrak terpurifikasi herba sambiloto dan herba pegagan (912,1mg/kg BB : 300mg/kg BB) p.o., kelompok II: kombinasi ekstrak

terpurifikasi herba sambiloto dan herba pegagan (651,5mg/kg BB : 500 mg/kg BB) p.o., kelompok III : kombinasi ekstrak terpurifikasi herba sambiloto dan herba pegagan (390,9mg/kg BB: 700mg/kg BB) p.o., kelompok IV: ekstrak terpurifikasi herba sambiloto tunggal dengan dosis 1303mg/kg BB, p.o., kelompok V: ekstrak terpurifikasi herba pegagan tunggal dengan dosis 1000 mg/kg BB, p.o., kelompok VI : kontrol positif (diberi metformin dosis 45 mg/kg BB, p.o), kelompok VII : kontrol negatif, (diberi CMC-Na 0,5%, p.o), kelompok VIII: kontrol normal (tikus non resisten insulin).

Perlakuan sesuai dengan pembagian kelompok sebanyak satu kali sehari selama 7 hari selanjutnya diukur kadar glukosa darah untuk melihat persentase daya hipoglikemik yang paling optimal dan analisa translokasi protein GLUT-4 pada metode *Immunohistochemistry* (IHC) pada *soleus muscle*.

Analisa translokasi protein GLUT-4 pada *soleus muscle* dengan metode *Immunohistochemistry*

Sampel *solues muscle* tikus perlakuan dikelompokkan menjadi 6 kelompok terdiri dari kelompok ekstrak terpurifikasi herba sambiloto, kelompok ekstrak terpurifikasi herba pegagan, kelompok kombinasi ekstrak terpurifikasi herba sambiloto dan herba pegagan yang paling optimal berpengaruh terhadap kadar glukosa (Kombinasi I), kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol normal, dan kelompok kontrol positif. Masing-masing kelompok diambil 3 ekor tikus untuk diterminasi pada hari ke-78 dan diambil *solues muscle* untuk preparasi sampel. Masing-masing sampel dilakukan IHC, setelah proses pembuatan *slide* sampel, dilanjut deparafinisasi, H_2O_2 blocking, *slide* direndam dalam H_2O_2 larutan 0,3% dalam metanol selama 15 menit, kemudian dibilas dengan akuadest, dicuci 3 x 5 menit dengan PBS pH 7,4, dilakukan *background sniper* selama 10 menit, antibodi primer, yaitu anti GLUT-4 perbandingan 1:500 dalam PBS selama 24 jam pada suhu kamar, dicuci 3 x 5 menit dengan PBS pH 7,4, antibodi sekunder (*biotinylated*), menggunakan *trekkie universal link*, diinkubasi pada suhu kamar selama 20 menit, dicuci 3 x 5 menit dengan PBS pH 7,4, *TrekAvidin-HRP (Labeled)*, diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit, dicuci 3 x 5 menit dengan PBS pH 7,4, *Betazoid DAB chromogen*, diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit, dicuci dengan akuadest, diberikan *hematoxylin mayer* dalam akuadest (perbandingan 1 : 3) selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir selama 30 detik, dilakukan dehidrasi selama 15 menit (berturut-turut menggunakan etanol 30%, etanol 50%, etanol

70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, etanol absolut, dan larutan Xylol), dilakukan proses *mounting*. Fotomikroskopi dilakukan pada masing-masing sampel sebanyak 2 foto sehingga diperoleh 36 foto dengan perbesaran 400 kali. Kuantifikasi translokasi protein GLUT-4 menggunakan parameter luas dan intensitas translokasi protein GLUT-4 dibantu program komputer *adobe photoshop CS6* dan *Macbiophotonic Image J*.

Analisa Data

Data ditampilkan dalam bentuk rata-rata ($n=6$) \pm SEM dan hasilnya diuji secara statistik dengan menggunakan *oneway ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

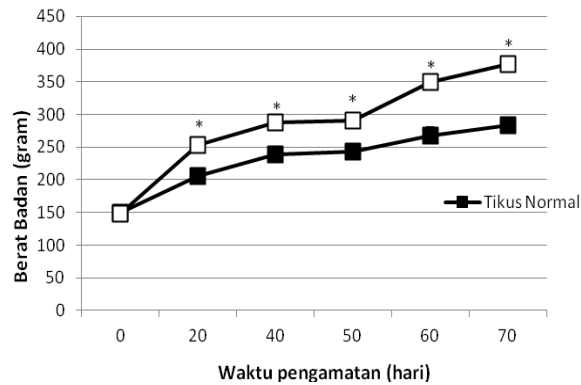
Standarisasi ekstrak terpurifikasi herba sambiloto dan herba pegagan

Rendemen ekstrak terpurifikasi herba sambiloto sebesar 4,98%, berbentuk ekstrak kental, berwarna hijau kecoklatan, berbau khas dan berasa sangat pahit. Nilai uji susut pengeringan sebesar $0,93\% \pm 0,16$ dan mengandung andrografolid sebesar $14,71\% \pm 1,36$. Rendemen ekstrak terpurifikasi herba pegagan sebesar 14,30%, berbentuk ekstrak kental, berwarna coklat tua, berbau tidak khas dan rasa agak pahit. Nilai uji susut pengeringannya sebesar $0,92\% \pm 0,43$ dan mengandung asiatikosida $0,78\% \pm 0,08$.

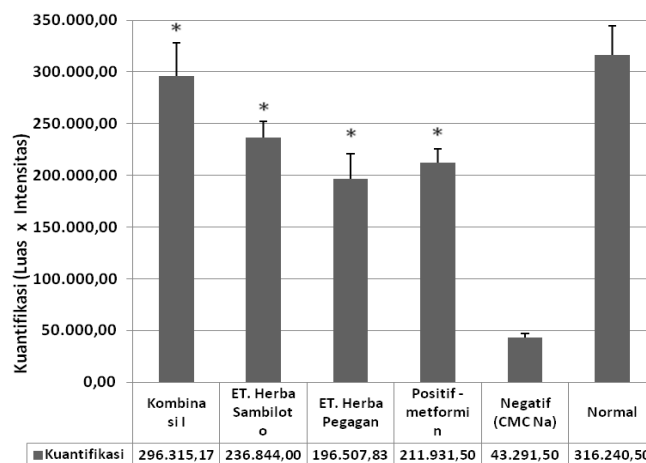
Uji Pendahuluan (Pengkondisian Hewan Uji DM tipe 2 Resisten Insulin) melalui Diet lemak Fruktosa dan Pemantauan Berat Badan

Terjadi peningkatan berat badan yang lebih tinggi pada kelompok tikus diit lemak-fruktosa dibandingkan dengan kelompok tikus normal secara signifikan ($p < 0,05$) pada hari ke-20, hari ke-40, hari ke-50, hari ke-60, dan hari ke-70 dengan analisis statistik *independent sample t-test*. Diet lemak-fruktosa dapat mempengaruhi kenaikan berat badan kelompok tikus diit lemak-fruktosa secara bermakna dibandingkan kelompok tikus normal (gambar 1).

Kelompok tikus diit lemak-fruktosa pada hari ke-70 memiliki nilai kadar glukosa darah preprandial, kadar glukosa darah postprandial, kadar kolesterol, kadar trigliserida, kadar LDL yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok tikus normal, dan kadar HDL yang lebih rendah dibandingkan kelompok tikus normal. Hasil uji resistensi dengan glibenklamid, daya hipoglikemik pada kelompok tikus diit lemak-fruktosa secara signifikan ($p < 0,05$) jika dibandingkan dengan kelompok normal (Nugroho *et al.*, 2013).



Gambar 1. Grafik hubungan antara kenaikan berat badan tikus diet lemak-fruktosa dan tikus normal. Terjadi kenaikan berat badan yang berbeda bermakna (*) antara kelompok tikus diit lemak-fruktosa dengan tikus normal.



Gambar 2. Grafik hasil kuantifikasi (luas x intensitas) translokasi protein GLUT-4 sel otot paha tikus dari kelompok Kombinasi I, Ekstrak Terpurifikasi Herba Sambiloto, Ekstrak Terpurifikasi Herba Pegagan, Kontrol Positif, Kontrol Negatif, dan Kontrol Normal. (*) menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok yang diberikan sediaan uji dengan kelompok kontrol negatif.

Hewan uji dapat dinyatakan dalam kondisi DM tipe 2-resisten insulin dengan melihat beberapa parameter yaitu kadar glukosa darah, kadar lemak total (kolesterol, trigliserida, LDL, dan HDL) dan uji hipoglikemik dengan glibenklamid. Hasil analisis pada parameter tersebut antara kelompok tikus diit lemak-fruktosa dan kelompok tikus normal menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$) dengan analisis *independent sample t-test*.

Pengaruh kombinasi ekstrak terpurifikasi herba sambiloto dengan herba pegagan terhadap translokasi protein GLUT-4.

Nilai kuantifikasi translokasi protein GLUT-4 berdasarkan luas dan intensitas dengan bantuan program *adobe photoshop CS6* dan *MacBioptonic*

ImageJ pada tiap kelompok sebagai berikut; kelompok I yang mewakili kelompok kombinasi yang memiliki daya hipoglikemik lebih tinggi ($296.315,17 \pm 32.145$), kelompok IV ($236.844,00 \pm 15.186$), kelompok V ($196.507,83 \pm 24.633$), kelompok VI ($211.931,50 \pm 13.696$), kelompok VII ($43.291,50 \pm 4.074$), dan kelompok VIII ($316.240,50 \pm 28.180$) (tabel II dan gambar 2).

Hasil analisa statistik *oneway ANOVA* pada nilai kuantifikasi translokasi protein GLUT-4 semua kelompok perlakuan jika dibandingkan dengan kelompok VII (tikus diit lemak-fruktosa yang tidak diberi sediaan uji) menunjukkan adanya perbedaan bermakna terhadap ($p < 0,05$). Hal ini berarti semua kelompok perlakuan memiliki kemampuan sebagai menurunkan kadar glukosa pada tikus diabetes melitus tipe 2 resisten

Tabel II. Hasil kuantifikasi (luas x intensitas) daerah translokasi protein GLUT-4 otot paha tikus untuk kelompok Kombinasi I, Ekstrak Terpurifikasi Herba Sambiloto, Ekstrak Terpurifikasi Herba Pegagan, Kontrol Positif, Kontrol Negatif, dan Kontrol Normal.

Fotomikroskopi subjek uji		Hasil kuantifikasi kelompok perlakuan (luas x intensitas)					
		Kombinasi I ETHS (912,1) + EHP (300) mg/kg BB	Ekstrak terpurifikasi herba sambiloto (1303 mg/kg BB)	Ekstrak terpurifikasi herba pegagan (1000 mg/kg BB)	Kontrol positif (metformin 45 mg/kg BB)	Kontrol negatif (CMC-Na 0,5 % b/v)	Kontrol normal (tikus non resisten insulin)
Tikus 1	Foto 1	259003	282779	160363	185039	37945	322663
	Foto 2	247891	237411	140065	189489	46285	430140
Tikus 2	Foto 1	412638	217299	172650	267466	58441	287782
	Foto 2	379690	182526	164147	180399	49338	234885
Tikus 3	Foto 1	227364	273986	293527	225371	30963	351761
	Foto 2	251305	227063	248295	223825	36777	270212
Rata-rata SEM		296.315,17 32.145	236.844,00 15.186	196.507,83 24.633	211.931,50 13.696	43.291,50 4.074	316.240,50 28.180

Keterangan : ETHS = Ekstrak terpurifikasi herba sambiloto; EHP = Ekstrak terpurifikasi herba pegagan

insulin. Nilai kuantifikasi translokasi protein GLUT-4 pada kelompok I tidak berbeda signifikan dengan kelompok normal (tikus non resisten insulin) ($p > 0,05$). Hal ini berarti pada kelompok I mampu menormalkan kondisi DM resisten insulin setelah 7 hari perlakuan sedangkan pada kelompok yang lain (kelompok IV, V, dan VI (metformin) terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), kemampuan ketiga kelompok ini dalam sebagai antidiabetes tipe 2 resisten insulin belum sampai ke kondisi normal selama 7 hari perlakuan.

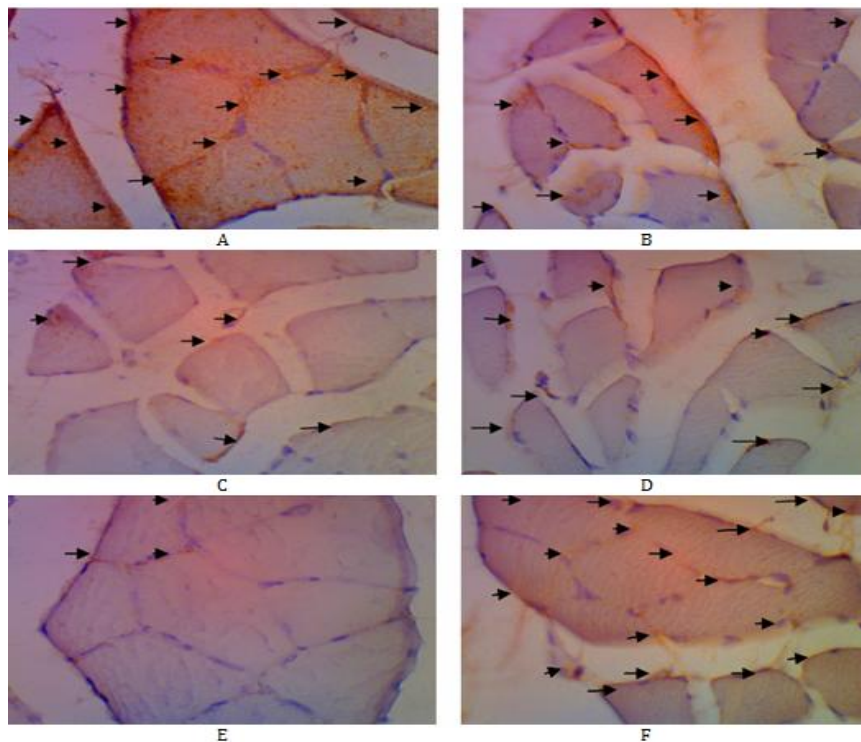
Hasil pengukuran kadar lemak (kolesterol, LDL, trigliserida, dan HDL) setelah pemberian sediaan uji selama 7 hari baik pada kelompok kombinasi maupun masing-masing ekstrak terpurifikasi mampu menurunkan kadar kolesterol, LDL, dan trigliserida serta menaikkan kadar HDL dengan signifikan ($p < 0,05$) dengan analisis *paired sample t-test*. Penurunan kadar kolesterol pada kelompok I lebih baik jika dibandingkan dengan kelompok lainnya ($p < 0,05$) dengan analisis *oneway ANOVA* sedangkan pada penurunan kadar LDL dan trigliserida kelompok kontrol positif lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain. Penurunan LDL dan trigliserida pada kelompok I penurunannya lebih baik jika dibandingkan dengan kombinasi lainnya. Kenaikan kadar HDL darah pada kelompok I dan Kontrol positif lebih tinggi secara signifikan dengan nilai $p < 0,05$ terhadap semua kelompok lain yang diberi sediaan uji dan jika dibandingkan kenaikan kadar HDL pada kedua kelompok tersebut (kelompok I dan Kontrol

positif) nilainya tidak berbeda signifikan ($p > 0$) (Nugroho *et al*, 2013).

Pengaruh pemberian kombinasi ekstrak terpurifikasi herba sambiloto dengan herba pegagan (dosis 912,1 mg/kg BB : 300 mg/kg BB) pada kelompok I memberikan hasil yang lebih baik sebagai antidiabetes tipe 2 resisten insulin dibandingkan dengan pengaruh dari masing-masing ekstrak terpurifikasi dengan menurunkan kadar asam lemak dalam darah yang menjadi pemicu resisten insulin sehingga translokasi protein GLUT-4 yang merupakan transpoter utama glukosa kembali pada kondisi normal dan menurunkan kadar glukosa darah. Aktivitas antidiabetik dari masing-masing ekstrak terpurifikasi saling memperkuat proses penyembuhan.

Andrografolid dalam ekstrak etanol herba sambiloto berperan dalam perbaikan sel-sel β -insulai Langerhans dan meningkatkan sekresi insulin (Yulinah *et al*, 2001; Hosain *et al*, 2007).

Ekstrak etanol herba sambiloto menurunkan kadar glukosa dan menurunkan kadar kolesterol, trigliserida, dan asam lemak bebas dengan mekanisme meningkatkan kadar glutathion S hidrosilase (GSH), glutathion S transferase (GST), dan glutathion reduktase (GR) hati sehingga dapat berfungsi sebagai antioksidatif; menekan glukoneogenesis dan glikogenesis; meningkatkan glikolisis dan glikogenesis serta meningkatkan sensitivitas insulin pada tikus resisten insulin yang diinduksi dengan diet lemak dan streptozotosin (Subramanian, 2009).



Gambar 3. Hasil fotomikroskopi translokasi protein GLUT-4 pada *soleus muscle* dengan perbesaran 400 kali (bercak coklat) pada masing-masing kelompok perlakuan; (a) Kombinasi I, (b) Ekstrak terpurifikasi herba sambiloto, (c) Ekstrak terpurifikasi herba pegagan, (d) Kontrol positif, (e) Kontrol negatif, dan (f) Tikus normal.

Ekstrak air herba sambiloto menunjukkan efek hipoglikemik pada kelinci dengan mekanisme mencegah absorpsi glukosa dari usus (Widyawati, 2007).

Frakasi total triterpenoid herba pegagan dapat digunakan sebagai obat diabetes mikroangiopati dengan meningkatkan mikrosirkulasi dan menurunkan permeabilitas kapiler (Jamil *et al.*, 2007; Anonim 2007). Ekstrak etanol dan ekstrak metanol herba pegagan menunjukkan hasil yang signifikan sebagai antidiabetes dengan mekanisme meningkatkan sekresi pankreas atau dengan meningkatkan *glucose uptake* (Chauhan *et al.*, 2010). Ekstrak etanol herba pegagan memiliki aktivitas antidiabetes dan mampu menurunkan berat badan hewan uji, kadar urea, protein, total lipid, dan kolesterol darah pada tikus wistar jantan (Gayathri *et al.*, 2011). Kapsul ekstrak herba pegagan membantu proses penyembuhan luka dan mengurangi timbulnya bekas luka pada penderita diabetes dengan mekanisme menstimulasi protein kolagen dan menghambat pertumbuhan jaringan berlebih dari bekas luka (Paocharoen, 2010). Asiatikosida dapat digunakan

sebagai antioksidan pada kondisi neuropati tikus diabetes (Thipkaew *et al.*, 2012).

KESIMPULAN

Pengaruh kombinasi ekstrak terpurifikasi herba sambiloto dan herba pegagan (dosis 912,1 mg/kg BB : 300 mg/kg BB) terhadap translokasi protein GLUT-4 pada sel otot paha tikus diabetes mellitus tipe 2 resisten insulin lebih baik secara bermakna jika dibandingkan dengan pengaruh dari masing-masing ekstrak ($p < 0,05$).

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, M., Razak, A., Akowuah, G. A., Asmawi, Z., Zhari, I., 2007, HPLC profile and antihyperglycemic effect of ethanol extracts of *Andrographis paniculata* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats, *J Nat Med*, (61) : 422-429.
- Akbar, S., 2011, *Andrographis paniculata*: A Review of Pharmacological Activities and Clinical Effect, *Alternative Medicine Review*, 16 (1) : 66-77.
- Anonim, 2007, *Centella asiatica* L., *Alternative Medicine Review*, 12 (1) : 69-74.

- Brinkhaus, B., Lindner, M., Schuppan, D., and Hahn, E. G., 2000, Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*, *Phytomedicine*, 7 (5) : pp. 427-448.
- Chauhan, P.K., Pandey, I.P., Dhatwalia, V.K., and Singh, 2010, Anti-Diabetic Effect of Ethanolic and Methanolic Leaves Extract of *Centella asiatica* on Alloxan induced Diabetic Rats, *International Journal of Pharma and Bio sciences*, VI (2) : 1-6.
- Choi, C. S., Lee, F. N., Youn, J. H., 2001, Free Fatty Acids Induced Peripheral Insulin Resistance without Increasing Muscle Hexosamine Pathway Product Level in Rats, *Diabetes*, (50) : 418-424.
- Gayathri, V., Lekshmi, P., Padmanabhan, R.N., 2011, Anti-diabetes activity of ethanol extract of *Centella asiatica* L., Urban (Whole plant) in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, Isolation of active Fraction and Toxicity evaluation of The Extract, *Int. J. Med. Arom. Plants*, ISSN 2249-4340, 1 (3) : 278-286.
- Hosain, A. Md., Roy, B. K., Ahmed, K., Chowdhury, S. A. M., and Rashid, M. A., 2007, Antidiabetic Activity of *Andrographis paniculata*, *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.*, 6 (1) : 15-20.
- Jamil, S. S., Nizami, Q., and Salam, M., 2007, *Centella asiatica* (Linn.) Urban: A Review, *Natural Product Radiation*, 6 (2) : pp. 158-170.
- Lauritzen, H. P., Schertzer, J. D., 2010, Measuring GLUT 4 Translocation in Mature Muscle Fibers, *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 299 (2) : E 169-79.
- Niranjan, A., Tewari, S. K., Lehri, A., 2010, Biological Activities of Kalmegh (*Andrographis paniculata* Nees) and Its active principles-A Review, *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1(2) : 125-135.
- Nugroho, A.E., Andrie, M., Warditiani, N.K., Siswanto, E., Pramono, S., A Ekstrak terpurifikasi and Lukitaningsih E., 2012, Antidiabetic and antihyperlipidemic effect of *Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees and Andrographolide in High-Fruktose-Fat-Fed Rats, *Indian J Pharmacol*, 44 (3) : 377-381.
- Nugroho, A.E., Lindawati, N.Y., Herliyanti, K., Widyastuti, L., Pramono, S., 2013, Anti-diabetic effect of a combination of andrographolide-enriched extract of *A. paniculata* and asiaticoside-enriched extract of *Centella asiatica* L. in high-fructose-fat-fed rats, *Indian Journal of Experimental Biology*, 51 : 1101-1108.
- Paocharoen, V., 2010, The Efficacy and Side Effects of Oral *Centella asiatica* extract for Wound Healing Promotion in Diabetic Wound Patients, *J Med Assoc Thai*, 93 (Suppl. 7) : S166-S170.
- Qin, B., Nagasaki, M., Ren, M., 2004, Cinnamon Extrac Prevents The Insulin Resistance Induced by High-Fructose Diet, *Horm. Metab. Res.*, 36 : 119-12.
- Subramanian, R., 2009, Effect of Ethanolic Extracts of *Andrographis paniculata* on Type 2 Diabetes Mellitus and Insulin Resistant Rats, *Desertation*, Universiti Sains Malaysia, Malaysia.
- Subramanian, R., Azmawi, M. Z., Sadikun, A., 2008, In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrografolid, *Acta Biochimica Polonia*, 55 (2) : hal 391-398.
- Thipkaew, C., Wattanathorn, J., and Muchimapura, S., 2012, The Beneficial effect of Asiaticoside on Experimental Neuropathy in Diabetic Rat, *American Journal of Applied Sciences*, 9 (11) : 1782-1788.
- Vohra, K., Pal, G., Gupta, V. K., Singh, S., and Bansal, Y., 2011, An Insight on *Centella asiatica* Linn.: A Review on Recent Research, *Pharmacologyonline*, (2) : 440-462.
- Widyawati, T., 2007, Aspek Farmakologi Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees), *Majalah Kedokteran Nusantara*, (40) : 3.
- Yu, B. C., 2008, Chang, C. K., Su, C. F., and Cheng, j. T., Mediation of β -endorphin in andrographolide-induced plasma glucose-lowering action in type I diabetes-like animals, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, (377) : 529-540.
- Yulinah, E., Sukrasno, Fitri, M. N., 2001, Aktivitas Antidiabetik Ekstrak Etanol Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees (Acanthaceae)), *JMS*, 6 (1) : 13-20.
- Zhang, Z., Jiang, J., Yu, P., Zeng, X., Larrick, J.W., Wan, Y. 2009, Hypoglycemic and beta cell protective effects of andrographolide analogue for diabetes treatment, *J. Transl. Med.*, (7) : 62-69.
- Zavaroni, I., Sander, S., Scott, S., Reaven, G. M., 1980, Effect of Fructose Feeding on Insulin Secretion and Insulin Action in The Rat, *Metabolism*, 29 (10) : 970-983.