

Pengaruh Ekstrak Etanol Daun *Moringa Oleifera* terhadap Kadar Insulin Serum Tikus Hiperglikemik

Evi Kusumawati¹, Kisdjamiatun²

1 Poltekkes Kemenkes Kendari Jl. A.H. Nasution, Kambu, Kota Kendari, Sulawesi Tenggara

2 Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Jl. Dr Sutomo 18 Semarang

Email: evikusumawati10@yahoo.com

ABSTRAK

Latar belakang: Daun *Moringa oleifera* mengandung senyawa aktif yang meregenerasi sel β pankreas dan antioksidan yang menurunkan stres oksidatif sehingga dapat memperbaiki kadar insulin serum pada kondisi hiperglikemik.

Metode : *Randomized pre and post test controlled group design* dilakukan pada 18 tikus Sprague-Dawley jantan hiperglikemik yang dibagi dalam 3 kelompok (kontrol dan perlakuan 250 dan 500 mg/kg BB/hari ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* selama 21 hari). Kadar insulin serum dianalisis menggunakan *Paired t test/Wilcoxon test*. Perbedaan delta insulin serum dianalisis dengan *One way anova test* dan dilanjutkan dengan *Tukey test*

Hasil : Kadar insulin serum sesudah perlakuan dibandingkan sebelum perlakuan pada kelompok K, P1 dan P2 ($p < 0,05$). Kadar insulin serum pada ketiga kelompok ($p < 0,05$). Kadar insulin P1 dan P2 berbeda bermakna dibandingkan K, namun P1 tidak berbeda bermakna dengan P2.

Simpulan : Ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* dosis 250 mg/kg BB/hari merupakan dosis efektif untuk pengendalian hiperglikemik.

Kata kunci : *Moringa oleifera*, kadar insulin serum.

ABSTRACT

Background Active compounds of *Moringa oleifera* leaves regenerate pancreatic β cells. Antioxidant content decreases oxidative stress so that it can improve the levels of serum insulin in hyperglycemic condition.

Method : *Pre and post test randomized controlled group design* conducted on 18 male hyperglycemic Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups (control and treatment of 250 and 500 mg/kg/day of ethanol extract of *Moringa oleifera* leaves for 21 days). Serum insulin levels were analyzed using *Paired t test/Wilcoxon test*. Difference delta serum insulin were analyzed by *One way ANOVA test* and followed by *Tukey test*.

Results : Serum insulin levels after treatment compared to before treatment in group K, P1 and P2 ($p < 0,05$). The levels of Insulin serum in all three groups ($p < 0.05$). Levels of insulin levels P1 and P2 K significantly different, but not significantly different P1 with P2.

Conclusion : Ethanol extract of *Moringa oleifera* leaves dose of 250 mg/kg bw/day is an effective dose for hyperglycemic control.

Key words : *Moringa oleifera* leaves, insulin serum levels.

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus (DM) merupakan suatu kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin atau keduanya.¹ Streptozotocin (STZ) adalah bahan kimia toksik yang mengakibatkan terjadinya degeneratif dan nekrosis/apoptosis sel β pankreas pada hewan coba, sehingga menyerupai diabetes tergantung insulin (DM tipe 1)^{2,3,5} Induksi STZ 40 mg/kg BB, selama 48 jam menunjukkan adanya degranulasi total pada

sel β pankreas.^{5,6} Disfungsi sel β pankreas baik secara kualitatif maupun kuantitatif akan menyebabkan hiperglikemia yang berujung pada diabetes.⁷ Sel pankreas, berdasarkan kemampuan regenerasi termasuk dalam kelompok sel stabil yang mampu membelah diri dengan cepat dalam hal merespons cedera dengan indeks mitosis sel β meningkat pada 21 hari pertama^{8,9}

Tikus Sprague dawley (SD) digunakan sebagai tikus hewan coba yang mempunyai kemiripan secara fisiologi dan klinik dengan manusia,¹⁰ tetapi

tikus SD memiliki umur eritrosit lebih rendah dari pada manusia, yaitu $61,0 \pm 1,3$ hari.¹¹

Flavonoid pada daun *Moringa oleifera* yaitu *quercetin* dan *kaempferol*, merupakan senyawa aktif yang diduga berfungsi sebagai antioksidan dan antidiabetik yang mampu meregenerasi sel β dan menstimulasi sel progenitor pada saluran pankreas untuk berdiferensiasi membentuk sel pulau *Langerhans* baru atau sel endokrin pada tikus diabetes.^{2,12,13} *Triterpenoid* pada *Moringa oleifera* juga menstimulasi sel β pankreas untuk mensekresi insulin ke dalam sirkulasi darah.¹⁴ Kandungan antioksidan tertinggi pada *Moringa oleifera* terletak pada bagian daun,¹² dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, akan mengekstraksi semua senyawa bioaktif antidiabetes.¹³

Penelitian ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* dengan dosis bertingkat 250 dan 500 mg/Kg BB/hari terhadap kadar insulin serum pada tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi streptozotocin belum pernah dilakukan, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tersebut yang hasilnya diharapkan dapat menunjang ilmu pengetahuan lebih lanjut.

BAHAN DAN METODE

Alat : Kandang, alat untuk preparasi sampel darah : tabung insulin 2 ml, alat untuk membawa sampel: *Cool box*, *dry ice*, alat untuk memeriksa kadar insulin serum: *Elisa Reader Insulin*,

Bahan : pakan standar *rodentia* PAR_G BR II, *streptozotocin* cat.#572201 dari Calbiochem, darah tikus SD, *reagensia Rat Insulin ELISA Kit* (Cat# 90060), ekstrak etanol daun *Moringa oleifera*

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan pendekatan *pre and post test only control group design* dengan ruang lingkup bidang Patologi Klinik yang dilakukan di PAU UGM, Laboratorium RS. Karyadi Semarang dan Laboratorium Cebior Undip.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis bertingkat ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* yang diberikan personde dengan skala nominal, sedangkan variabel terikat adalah kadar insulin serum yang diukur menggunakan metode *ELISA* dan dinilai dengan *ELISA Reader* berdasarkan serapan panjang gelombang dengan satuan $\mu\text{IU/mL}$. dengan skala rasio.

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus *Sprague Dawley*, jenis kelamin jantan, berat badan 150-225 gram, umur 3 bulan dengan kadar gula darah >132 mg/dl (hiperglikemia).

Besar sampel menurut WHO adalah 5 ekor, pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan 18 ekor, tiap kelompok 6 ekor. Randomisasi : 18 ekor tikus hiperglikemik dikelompokkan secara random menjadi 3 kelompok, yaitu :

K :Kelompok hewan kontrol hiperglikemik, dengan induksi STZ tanpa pemberian ekstrak etanol daun *Moringa oleifera*.

P1 : Kelompok hewan perlakuan dengan induksi STZ dan pemberian ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* sebanyak 250 mg/Kg BB/hari.

P2 : Kelompok hewan perlakuan dengan induksi STZ dan pemberian ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* sebanyak 500 mg/Kg BB/hari.

Tigapuluh ekor tikus diadaptasi selama 7 hari dan diberi makan standar PAR_G BR II, selanjutnya dibuat hiperglikemik dengan diinduksi STZ 40 mg/Kg BB secara *intraperitoneal*, setelah 48 jam diukur kadar glukosa darah hingga ditemukan tikus hiperglikemik, kemudian dilakukan randomisasi dan dijadikan 3 kelompok. Hewan perlakuan yang hiperglikemik diukur kadar insulin serum *pre* sebelum diberi perlakuan ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* dosis 250 dan 500 mg/Kg BB/hari. Setelah 21 hari dilakukan pemeriksaan kadar insulin serum *post*.

PROSEDUR KERJA

Ekstraksi Etanol Daun *Moringa oleifera*

Ekstraksi daun kelor dilakukan dengan prosedur ekstraksi maserasi (etanol 70%), Bahan diserbuk, kemudian ditimbang, masukkan ke dalam alat *homoginizer*, tambahkan pelarut (etanol 70%) sebanyak 5 kali berat bahan atau sampai secukupnya, lakukan pengadukan selama 30 menit, diamkan selama 24 jam, saring, pisahkan filtrat dari bagian yang tidak larut (ampas), diulang 2 (dua) kali, filtrat dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* suhu pemanas 70°C (dibawah titik didih pelarut), filtrat kental dituang ke dalam cawan porselin, dikeringkan dengan pemanas *water bath* sambil terus diaduk pada temperatur 70°C (dibawah titik didih pelarut), timbang ekstrak dan dikemas

Pemeriksaan kadar insulin serum

Kadar insulin serum diukur dengan menggunakan *ELISA Reader*. Cara pengukuran kadar insulin serum, darah beku dari sampel *dicentrifuge*, konjugat enzim 11x diencerkan sebanyak 1x, siapkan *wellplate* sebanyak jumlah standart (12 sampel standart *duplo*) dan jumlah sampel penelitian, pipet 10 µl sampel dan kalibrator ke masing-masing *wellplate*, tambahkan 100 µl konjugat enzim ke semua *wellplate*, inkubasi *wellplate* selama 2 jam pada suhu ruang diatas *shaker*, buang 100 µl konjugat enzim, kemudian *wellplate* dicuci dengan *wash buffer* sebanyak 5x, setelah dicuci, tambahkan 200 µl *Tetra Metil Blue*

(TMB), larutan akan menjadi biru dan inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang, tambahkan 50 µl *stop solution*, *wellplate* dimasukkan ke *ELISA Reader* dengan panjang gelombang 450 nm.

Pengambilan darah tikus SD

Darah diambil dari sinus orbita pada pagi hari (setelah tikus dipuaskan) dengan alat mikrohematokrit.

METODE ANALISIS DATA

Data yang terkumpul dilakukan *cleaning*, *coding* dan *tabulasi* dan selanjutnya dilakukan analisis deskriptif dan analisa statistik.

Analisis diskriptif dengan menghitung nilai *mean*, *median* dan *simpang baku* dari variabel tergantung (insulin serum), selanjutnya disajikan dalam tabel dan grafik.

Uji normalitas dari variabel dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* ($n < 30$ sampel)

Distribusi data normal, analisis untuk mengukur *pre* dan *post* kadar insulin serum dengan *paired t test*, analisis untuk uji beda antar kelompok dengan uji *Anova*, kalau ada beda signifikan dilanjutkan uji *post hoc Tukey-HSD*. uji *Anova*, kalau ada beda signifikan dilanjutkan uji Distribusi data tidak normal, analisis untuk mengukur *pre* dan *post* kadar insulin serum dengan uji *Wilcoxon*, analisis untuk uji beda antar kelompok dengan uji Kruskal Wallis, kalau ada beda signifikan dilanjutkan uji *Mann-Whitney*. Data dianggap berbeda secara bermakna bila $p \leq 0,05$ dengan derajat kepercayaan 95%.

Tabel 1. Data analisis uji komparatif kadar insulin serum

Kelompok	Kadar Insulin µIU/mL						
	n	Rerata±sb		p	Rerata delta ±sb	Rerata Geometrik	P
		Awal	Akhir				
K	6	0,09*	0,05*	0,038	-0,03 ± 0,01	0,03	0,007
P1	6	0,08*	0,30*	0,028	0,18± 0,16	0,10	
P2	6	0,12 ± 0,03	0,30 ± 0,13	0,031	0,18± 0,14	0,09	

*Data disajikan dalam median karena distribusi data tidak normal

HASIL

Pengaruh ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* terhadap kadar insulin serum dapat dilihat pada tabel 1. Kadar insulin serum pada kelompok K menurun secara bermakna pada akhir pengamatan, sebaliknya peningkatan bermakna terjadi pada kelompok P1 dan P2. Hasil uji *one way anova* menunjukkan adanya perbedaan bermakna rerata delta kadar insulin serum pada ketiga kelompok penelitian ($p < 0,007$). Uji Post Hoc ditampilkan pada tabel 2. Rerata delta kadar insulin serum kelompok perlakuan (P1 dan P2) lebih tinggi secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol (K), sementara perbedaan bermakna tidak ditemukan antara kelompok P1 dan P2.

PEMBAHASAN

DM adalah penyakit degeneratif yang tidak bisa disembuhkan dan berlangsung seumur hidup. Pemberian terapi obat anti diabetes oral dan injeksi insulin pada DM tipe 1 berfungsi meningkatkan kadar insulin darah,²¹ sedangkan *Moringa oleifera* memiliki kemampuan memperbaiki sel β pankreas yang mengalami degenerasi.^{4,17,18,21} Derajat kerusakan sel β pankreas dapat ditentukan dari pemeriksaan kadar insulin.^{1,22}

Hasil penelitian diperoleh bahwa peningkatan insulin secara bermakna. Pengamatan kadar insulin selama 21 hari menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* berasosiasi dengan peningkatan kadar insulin serum (tabel 5.1). Hal ini lebih diperjelas dengan temuan kadar insulin serum lebih tinggi secara bermakna pada kelompok perlakuan dibandingkan kontrol (tabel

5.2). Temuan ini sejalan dengan penelitian Gupta R, et al., yang menunjukkan bahwa pemberian ekstrak metanol pods (kelopak biji) *Moringa oleifera* dosis 300 mg/kg BB/hari selama 21 hari lebih efektif meningkatkan kadar insulin serum pada tikus hiperglikemia akibat induksi STZ, dibandingkan dosis 150 mg/kg BB/hari.¹⁸ Perlakuan ekstrak *aqua* daun *Moringa oleifera* dosis 200 mg/kg BB/hari selama 60 hari signifikan meningkatkan kadar insulin pada tikus diabetik yang mengalami deplesi insulin akibat induksi STZ dan signifikan menurunkan kadar insulin pada tikus diabetik yang mengalami hiperinsulinemia akibat pemberian tinggi fruktosa.¹⁷

Penelitian yang baru saja dilakukan ini, memperlihatkan bahwa ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* dosis 250 mg/kg BB/hari sudah optimum karena dalam waktu yang singkat dan dengan dosis yang lebih rendah sudah mampu mengendalikan hiperglikemik yang dihubungkan dengan pengamatan kadar insulin serum. Peningkatan kadar insulin serum diduga terjadi akibat dari perbaikan sel β pankreas oleh ekstrak etanol daun *Moringa oleifera*, karena daun *Moringa oleifera* memiliki kandungan antioksidan.¹⁵ Antioksidan yang terdapat dalam *Moringa oleifera* antara lain vitamin C, E dan *flavonoid* (*quercetin* dan *kaempferol*),^{15,19} sehingga daun *Moringa* memiliki aktivitas yang kuat sebagai *scavenger* oksidan yang mampu menghambat reaksi oksidasi ROS dan meningkatkan aktivitas SOD, GSH dan catalase yang menyebabkan penurunan stres oksidatif dalam sel.^{15,20}

Tabel 2. Data analisa *post hoc* terhadap transformasi delta insulin serum pada kelompok penelitian

Kelompok		Perbedaan Rerata	P*	CI
K	P1	2,228*	0,018	0,38 – 0,47
	P2	2,461*	0,009	0,61 – 4,30
P1	P3	-0,232	0,936	-1,52 – 1,99

*Uji Tuckey

Penurunan stres oksidatif dalam sel berarti menurunkan proses kerusakan/degenerasi sel β pankreas sehingga akan mempercepat proses regenerasi sel β pankreas.⁴⁹ *Flavonoid* pada daun *Moringa oleifera* yaitu *quercetin* dan *kaempferol*, diduga berfungsi meregenerasi sel β dan menstimulasi sel progenitor pada saluran pankreas untuk berdiferensiasi membentuk sel pulau *Langerhans* baru atau sel endokrin pada tikus diabetes.^{4,20} *Triterpenoid* yang ditemukan pada daun *Moringa oleifera* diduga mampu menstimulasi sekresi insulin dari sel β pankreas ke sirkulasi darah.¹⁸ Ekstraksi dengan etanol akan mengekstraksi semua senyawa kimia/bioaktif yang ada pada daun *Moringa oleifera*, yaitu *flavonoid*, *sterol*, *triterpenoid*, *alkaloid*, *saponin* dan *fenolat*, yang diduga dari masing-masing senyawa itu memiliki cara kerja yang saling bersinergi dalam pengendalian hiperglikemik.^{17,22}

STZ di dalam sel β pankreas akan meningkatkan respon inflamasi dan alkilasi DNA yang menyebabkan defosforilasi ATP, sehingga sel β mengalami degenerasi, pada akhirnya kondisi ini akan mengganggu sintesis insulin yang akan

menyebabkan penurunan kadar insulin serum. Rendahnya kadar insulin serum dan tingginya kadar HbA1c dalam sirkulasi akan menyebabkan hiperglikemia dan peningkatan stres oksidatif yang akan mempengaruhi kerentanan jaringan sel sehingga akan menambah kerusakan pada sel β pankreas.

Melihat hasil penelitian yang diperoleh, diasumsikan bahwa pemberian ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* dapat memperbaiki kadar insulin serum pada penderita hiperglikemik sebagai akibat dari penurunan jumlah sel β pankreas yang mengalami degenerasi.

KESIMPULAN

Ada peningkatan bermakna kadar insulin serum setelah pemberian ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* dosis berbeda 250 dan 500 mg/KgBB/hari dibandingkan sebelum perlakuan. Kadar insulin serum lebih tinggi secara bermakna pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol sementara perbedaan bermakna tidak ditemukan antara kelompok P1(perlakuan dosis 250 mg ekstrak etanol daun *Moringa oleifera*) dan P2 (perlakuan dosis 500 mg ekstrak etanol daun *Moringa oleifera*).

DAFTAR PUSTAKA

1. Purnamasari D. Diagnosis dan klasifikasi diabetes melitus dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. 5 ed. Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S. Editor Jakarta: Internal Publishing; 2009. 1880-3.
2. Rifaai RA, El-Tahawy NF, Saber EA and Ahmed R. Effect of Quercetin on the Endocrine Pancreas of the Experimentally Induced Diabetes in Male Albino Rats: A Histological and Immunohistochemical Study. J Diabetes Metab 2012.
3. Ali S, Rohilla A, Dahiya A, Kushnoor A and Rohilla S. Streptozotocin Induced Diabetes : Mechanisms of Induction. IJPRD. 2012.
4. Haligur M, Topsakal S. and Ozmen, O. Early Degenerative Effects of Diabetes Mellitus on Pancreas, Liver, and Kidney in Rats: An Immunohistochemical Study. Hindawi Publishing Corporation Experimental Diabetes Research. 2012.
5. Artinano A, Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. Br J Nutr ; 2009. 102(9):1246-53.

6. Astuti P, Fitria LS. Mulyati. Pembuatan Hewan Model Standar Untuk Diabetes Melitus Tipe 1 Pada Tikus Galur Sprague dawley Sebagai Respon Streptozotocin.Laboratorium Penelitian Dan Pengujian Terpadu Univ.Gadjah Mada.Yogyakarta 2009
7. Maitra AA. The Endocrine System. In: Robbins and Cotran. Pathologic Basic of Disease. 7ed: Philadelphia : Elsevier Inc. 2005.
8. Mitchell RN, Cotran RS. Pemulihan Jaringan : Regenerasi dan Fibrosis Sel. Buku Ajar Patologi Robbins/Robbins Basic Pathology 7th ed. Philadelphia : Elsevier inc. New York, USA. 2007. 65-84
9. Brockenbrough JS, Weir GC, Weir SB. Discordance of Exocrine and Endocrine Growth After 90% Pancreatectomy in Rats. J Diab. 1988; 37(37): 32-6
10. Zafar M, Naqvi SNH, Ahmed M and Kaimkhani ZA. Altered Kidney Morphology and Enzymes in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. Int J Morphol. 2009;27(3):783-90.
11. Derelanko MJ. Determination of erythrocyte life span in F-344, Wistar, and Sprague-Dawley rats using a modification of the [3H]diisopropylfluorophosphate ([3H]DFP) method, Fundam Appl Toxicol Elsevier Science 1987;9(2):271-6.
12. Gupta RM, Bajaj VK, Katariya P, Yadav S, Kamal R, Gupta RS. Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of Moringa oleifera in experimental diabetes. J Diabetes 2012;4(2): 164-71.
13. Divi SM, Bellamkonda R, Dasireddy SK. Evaluation of antidiabetic and ntyhyperlipidemic Potential of Aqueous Extract of Moringa oleifera in Fructose Fed Insulin Resistant and STZ Induced Diabetic wistar Rats : A Comparative Study. AJPCN. 2012;5(1).
14. Tende JA, Ezekiel I, Dikko AAU and Goji ADT. Effect of Ethanolic Leaves Extract of Moringa oleifera on Blood Glucose Levels of Streptozocin-Induced Diabetics and Normoglycemic Wistar Rats. Br J of Pharm and Toxicol. 2011;2(1):1-4.
15. Soegondo S. Farmakoterapi pada pengendalian glikemia diabetes melitus tipe 2 dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. 5 ed., Sudoyo AW, Setiyohadi, B., Alwi, I., Simadibrata M., Setiati, S., editor. Jakarta: Internal Publishing; 2009. 1884-90.
16. Kangralkar VA, Shivraj D. Patil, Bandivadekar RM. Oxidative stress and diabetes: a review., Int J of Pharm Applic. 2010;1(1);38-45
17. Sushma G, Shivaprasad HN, Nargund LVG, Bharumathy M, Midun T. Moringa oleifera attenuates oxidative stress in STZ-induced diabetic rats., IJPRS.2013;2(1): 36-44
18. Shih MC, Chang CM, Kang SM dan Tsai ML. Effect of Different Parts (Leaf, Stem and Stalk) and Seasons (Summer and Winter) on the Chemical compositions and Antioxidant Activity of *Moringa oleifera*., Int. J. Mol. Sci. 2011;12; 6077-88
19. Amin A, Lotfy M, Ghoneim DM, Adeghate E, Al-Akhras M, Al Saadi M, Al Rahmoun S, Hameed R. Pancreas-protective effects of chlorella in STZ-induced diabetic animal model: insights into the mechanism., J Diabetes metab. 2011; 1(3); 36-45.